



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB**  
**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO EM**  
**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO**

**THIAGO TAVARES BORBA MAGALHÃES**  
**LUCAS BEZERRA VIEIRA DE ALMEIDA**

**MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM PACIENTES COM**  
**ARBOVIROSES RECORRENTES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS: ÍONS**  
**MARCADORES DE RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO PARA DENGUE (I, II E III), ZIKA E**  
**CHIKUNGUNYA VÍRUS**

**BRASÍLIA**

**2019**



**THIAGO TAVARES BORBA MAGALHÃES**  
**LUCAS BEZERRA VIEIRA DE ALMEIDA**

**MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM PACIENTES COM  
ARBOVIROSES RECORRENTES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS: ÍONS  
MARCADORES DE RÁPIDA IDENTIFICAÇÃO PARA DENGUE (I, II E III), ZIKA E  
CHIKUNGUNYA VÍRUS**

**Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e  
Pesquisa.**

**Orientação: Profa. Dra. Aline Maria Araújo  
Martins.**

**BRASÍLIA**  
**2019**

*Um enorme agradecimento ao apoio de todos que deram suporte ao projeto nas mais variadas formas.*

*Aos colaboradores, Fábio Santos, Marcos Eberlin e Kelly Magalhães, muito obrigado pelo suporte e pela capacitação.*

*E, finalmente, à nossa orientadora, Aline Martins, muito obrigado por ser a melhor de todas. Você deixou tudo mais fácil.*

## RESUMO

As doenças infecciosas são um grande problema de saúde pública no mundo atualmente, em especial as transmitidas por meio de vetores. O *Aedes aegypti* é um mosquito capaz de transmitir algumas doenças virais, entre elas a Dengue, a Zika e a Chikungunya, sendo importante alvo de políticas públicas. A confirmação diagnóstica clínica dessas doenças é insidiosa, entretanto todas necessitam de intervenção precoce para redução de danos subsequentes, principalmente nas fases agudas. A espectrometria de massas é uma técnica analítica capaz de fornecer um diagnóstico seguro e rápido ao identificar características moleculares semelhantes em pacientes infectados, que podem ser relacionadas a caracteres específicos da interação com o hospedeiro. Há moléculas presentes nos vírus bem como outras produzidas no momento da invasão ao organismo que podem ser utilizadas para identificar padrões específicos de cada uma das infecções e confirmar o diagnóstico no momento da atividade viral da doença. Deve-se, para isso, identificar moléculas diferenciais em cada uma das doenças virais e utilizá-las para a resposta diagnóstica precoce. O presente trabalho demonstra que, nas infecções pelos vírus da Dengue, Zika e Chikungunya, existem íons marcadores específicos que apresentam diferentes espectros e podem ser utilizados para definição de rápido diagnóstico. Foram utilizadas quinze amostras de pacientes infectados com dengue, quinze com Zika, quinze com Chikungunya e quinze pacientes hígidos como grupo controle. Para uma melhor eficácia da análise estatística, foram realizados testes para determinar melhores condições para execução dos experimentos da pesquisa avaliando métodos de extração, matriz, concentração de amostra e potência do feixe de laser utilizado. O trabalho pode determinar que na amostra de sangue de pacientes distintos infectados por Zika vírus houve reprodutibilidade no método para o íon marcador 650 m/z do espectro, além de importantes relações de proporcionalidade entre outros íons. Da mesma forma, pacientes infectados com Chikungunya vírus apresentaram reprodutibilidade do íon marcador 633 m/z da mesma relação, bem como o sorotipo II da dengue que apontou os íons 879 m/z e 991 m/z. Além disso, foram observadas as porções polares com bons resultados para dengue tipo II em 725 m/z, assim como os peptídeos com reprodutibilidade de íons marcadores nas bandas 567 e 672 o m/z para a Chikungunya. Foram analisados pacientes coinfectados para observação de reprodutibilidade de *fingerprint* por esta técnica. Conclui-se, portanto, que há uma especificidade apresentada por esses íons referentes a diferentes moléculas que possibilitam identificar de maneira rápida o *fingerprint* metabólico destas doenças. Essa utilização de biomarcadores para rápido diagnóstico molecular de arboviroses representa uma das melhores alternativas para o futuro de seu diagnóstico.

**Palavras-Chave:** Zika. Chikungunya. Dengue. Espectrometria de massas. *Fingerprint* metabólico. Diagnóstico molecular.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
3. METODOLOGIA	11
3.1. DEFINIÇÃO DO MÉTODO	11
Bligh-Dyer – Matrizes:	12
Bligh-Dyer – Concentrações:	13
Bligh-Dyer – Percentual dos feixes de <i>laser</i> :	14
MTBE – Matrizes:	15
MTBE – Concentrações:	15
MTBE – Percentual dos feixes de <i>laser</i> :	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1. FASE LIPÍDICA	17
PERFIL LIPÍDICO CHIKV	19
PERFIL LIPÍDICO ZIKV	20
PERFIL LIPÍDICO DENV II	21
PERFIL LIPÍDICO CO-INFECTADOS	22
PERFIL LIPÍDICO COMPARATIVO	23
4.2. FASE POLAR	23
FASE POLAR CHIKV	24
FASE POLAR ZIKV	25
FASE POLAR DENV II	26
FASE POLAR COINFECTADOS	27
FASE POLAR COMPARATIVO	28
4.3. PERFIL PEPTÍDICO	28

PERFIL PEPTÍDICO CHIKV	29
PERFIL PEPTÍDICO DO ZIKV	30
PERFIL PEPTÍDICO DENV II	31
PERFIL PEPTÍDICO COINFECTADOS	32
PERFIL PEPTÍDICO COMPARATIVO	33
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE	39
1. GRÁFICOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DO MÉTODO	39
2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:	54

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas apresentam alto potencial de transmissibilidade e seu impacto está relacionado às interações patógeno vs homem, patógeno vs ambiente, homem vs ambiente (FAUCI e MORENS, 2012). A ocupação e modificação desordenada do ambiente pelo homem favorece o aumento descontrolado da população dos insetos vetores nos meios urbanos, contribuindo para os surtos cada vez mais frequentes de doenças infecciosas, bem como o aparecimento de doenças neurológicas associadas a arboviroses, como a Síndrome de Guillain-Barré e a mielite transversa (VIEIRA et al, 2018). No Brasil, além dos surtos de dengue terem aumentado na última década, tem se notificado a emergência de outras arboviroses, como Zika e Chikungunya, ambas transmitidas por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*.

O vírus da dengue (DENV), que possui uma distribuição intimamente relacionada à concentração populacional das regiões em que se dissemina (ARAÚJO et. al., 2017) é o agente etiológico da doença tropical com maior índice de transmissão por vetor nos últimos anos e possui quatro subtipos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) bem descritos na literatura (VASCONCELOS e PINHO, 2017). Em 2018, foram notificados 265.934 casos prováveis de dengue, destes 174.724 foram confirmados (65,7%). Foram confirmados nesse período, 3616 casos com sinais de alarme, 321 casos de dengue grave e 155 óbitos por dengue. Em 2019, até o mês de março, 273.193 casos prováveis foram notificados, um aumento expressivo em relação a 2018, que no mesmo período teve 71.525 notificações de casos prováveis. Apesar desse aumento de 282% do número de casos, ainda assim não se considera que o país esteja em estado de epidemia devido ao fato que a taxa de incidência está dentro do canal endêmico que leva como base a série histórica dos últimos 8 anos. Até março de 2019 também foram confirmados 2452 casos de dengue com sinais de alarme, 210 de dengue grave, e 80 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Analisando esses dados epidemiológicos, é possível perceber a necessidade de desenvolvimento de maneiras rápidas e eficazes de se diagnosticar a doença.

A dengue é uma doença de característica sazonal, pois a sua prevalência está relacionada aos períodos de maior incidência de chuvas e acúmulo de água em ambientes com presença humana – sendo a maior prevalência em áreas urbanas –, acometendo e incapacitando principalmente adultos jovens em idade economicamente ativa (OLIVEIRA;

ARAÚJO e CAVALCANTI, 2018), reforçando ainda mais a importância da rápida identificação da doença e a aplicação de medidas de recuperação do paciente.

O Zika vírus (ZKV), da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, foi introduzido recentemente nas Américas sendo notificada a ocorrência no Brasil em 2015. Os primeiros surtos foram detectados no Nordeste, principalmente no estado de Pernambuco, porém em poucos meses o surto se disseminou por todas as regiões do país causando uma epidemia e se constituindo em um problema de saúde pública nacional (OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2016). Em 2018, foram notificados 8680 casos de doença aguda pelo vírus Zika, sendo 1097 destes em gestantes. No mesmo período foram registrados 5 óbitos pela doença. Em 2019, até março, foram registrados 2344 casos prováveis de Zika no país, sendo 393 destes em gestantes. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019)

O Chikungunya vírus (CHIKV), um vírus pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*, também tem incidência crescente no território brasileiro. Os principais sintomas dessa infecção são forte artralgia, febre alta, cefaleia, náusea e vômitos (KUCCHARZ e CEBULA-BYRSKA, 2012). O primeiro caso de transmissão autóctone de CHIKV nas Américas foi registrado em 2013 na região do Caribe (BORTEL, 2014). Um ano depois, esta epidemia já havia se espalhado por outros países da América do Sul, como Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Suriname, Paraguai e Brasil (CDC, 2014).

Assim como para o vírus da Zika, o principal vetor da Chikungunya é o *Aedes aegypti*, que juntamente com o *Aedes albopictus* apresenta elevada competência vetorial para o CHIKV (VEGA-RÚA et al., 2014). Em 2018, foram registrados 87.687 casos prováveis de febre Chikungunya, e ao final do ano haviam 52 óbitos confirmados laboratorialmente, e 32 estavam sob investigação. Em 2019, até março, houveram 15.352 casos suspeitos no país, com 2 óbitos confirmados e 14 em investigação. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019)

A comunidade científica brasileira e mundial vem trabalhando intensamente desde a disseminação inicial do Zika vírus pelo mundo para entender como desenvolver estratégias mais eficazes de diagnóstico e tratamento (VALLE et al, 2016). A área da metabolômica, pela técnica do íon marcador por espectrometria de massas, consiste na identificação dos metabólitos marcadores produzidos pela interação do vírus com seu hospedeiro e se apresenta como uma ferramenta de grande importância no diagnóstico molecular, no entendimento do vasto espectro de respostas metabólicas causadas por essas arboviroses em seu hospedeiro.

A identificação rápida entre vírus pode ser bastante difícil do ponto de vista protéico devido à sua semelhança natural, mesmo com uma técnica específica como a espectrometria de massas. No entanto, os arbovírus possuem um envelope lipídico que fornece grande substrato de estudo e levanta a possibilidade de se encontrar marcadores moleculares específicos em diferentes vírus, como o CHIKV e o ZKV, para que se desenvolvam técnicas de diagnóstico rápido, o que poderia mudar a velocidade na tomada de decisão das condutas médicas e resultar em menores consequências a curto e médio prazo. O presente trabalho objetiva, portanto, identificar íons marcadores moleculares, em especial os lipídicos, nos vírus da dengue (sorotipos I, II e III), Zika e Chikungunya para possibilitar diagnósticos moleculares que identifiquem distintamente as arboviroses.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os vírus da Dengue, Zika e Chikungunya promovem infecções que, em sua natureza, são simples, mas podem gerar sinais, sintomas e consequências que são relevantes à saúde de forma individual e coletiva. A entrada do Zika vírus e do Chikungunya vírus no ambiente latino-americano levanta preocupações de saúde pública, já que há ambientação – clima, características da urbanização e educação da população, entre outros – ideal para desenvolvimento e proliferação do vetor nessas regiões geográficas (COLÓN-GONZÁLEZ et al, 2017), além da associação paralela com o Dengue vírus que já faz parte do acervo de preocupação da saúde pública nesses países.

Acredita-se que a origem da infecção pelo CHIKV tenha se dado na Oceania. No entanto, a disseminação no continente africano já é bem estabelecida e estudos mostram que nessa região a infecção em primatas pode ser importante para a manutenção do ciclo viral. Vários macacos permanecem infectados e podem servir de reservatório e, mais raramente, ocasionar transmissão interespecífica direta, situações que podem ocorrer com a introdução do vírus em novos ambientes (EASTWOOD et al, 2017).

Sabe-se que a introdução de novos microrganismos em determinados ambientes pode oferecer riscos. É necessário, portanto, refinar o acesso e a qualidade no atendimento de saúde pública. Estudos apontam que o atendimento em saúde deve reforçar assuntos como a proteção contra o vetor e utilização de métodos contraceptivos em locais de grande incidência, em especial do ZKV. Tais orientações podem levantar questões éticas sobre

planejamento familiar e intervenções na gestação e apontam forte necessidade de mais estudos sobre o assunto (TAMBO et al, 2017).

A forma de transmissão simples e o diagnóstico clínico limitado pela semelhança entre as doenças dificultam as intervenções e acentuam o risco à saúde pública. O mesmo mosquito transmissor, o *Aedes aegypti*, é capaz de disseminar as três doenças com maior contensão biológica na saliva para o CHIKV e menor para o ZKV, facilitando ainda mais sua disseminação (GÖERTZ, 2017). Este comportamento leva a problemas maiores de disseminação, já que há detecção do ZKV em secreção vaginal acima de 14 dias e em eritrócitos acima de 81 dias após primo-infecção (MURRAY et al, 2017).

O Dengue vírus encontra-se disseminado em mais de 120 países do mundo há predileção pelo clima tropical, predominante no Brasil. A relação do clima não está bem estabelecida em relação ao vírus, mas sim diretamente dirigida ao vetor. O mosquito encontra no ambiente tropical, com chuvas abundantes e temperatura ideal de reprodução, uma ótima situação de proliferação. O aumento da urbanização em países em desenvolvimento favorece ainda mais a formação de ambientes apropriados para a disseminação do vetor, já que o aumento populacional sem o devido controle favorece acúmulo de lixo e pouca disseminação de informação referente à reprodução do mosquito, levando ao aumento do número de insetos e, conseqüentemente, do aumento da incidência da doença (BHATT et al, 2013), como demonstrado pelo trabalho de Brady (2019), que aponta que 80% dos moradores de grandes cidades apresentam infecção de algum sorotipo do Dengue vírus em algum momento da vida.

Desde que a Dengue foi encarada como importante para a saúde pública, foram adotadas diversas campanhas com o intuito de reduzir sua incidência e morbimortalidade. Atualmente, essas campanhas têm se tornado mais efetivas, gerando uma redução do número de internações por dengue clássica e hemorrágica no país (CORREIA et al, 2019), entretanto ainda assim existem discrepâncias regionais em relação a dengue, que associada ao aumento em 2019 das notificações de casos suspeitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019) mostram que há carências tanto no controle no vetor e na identificação nas diferentes regiões do Brasil.

Toda essa situação impôs a tentativa de busca por novos critérios de diagnóstico clínico, principalmente para gestantes e ZKV e idosos e CHIKV, com resultados na literatura com sensibilidade e especificidade relativamente baixas, o que leva à busca de melhores alternativas (GODAERT et al, 2017). A literatura aponta que coinfeções podem favorecer a

velocidade de replicação de alguns vírus como o Chikungunya (SILVA et al, 2017), o que torna mais necessária a necessidade de diagnósticos rápidos para determinação da conduta clínica a ser estabelecida.

As três doenças possuem sérias consequências a médio e longo prazo. Estudos apontam que a infecção pelo ZKV em recém-nascidos pode resultar em microcefalia, perda de massa cefálica com calcificações, pigmentação de retina e hipertonia precoce com envolvimento extrapiramidal (MOORE et al, 2017), além de permitir reação imunológica cruzada e favorecer o desenvolvimento da síndrome de Guillain-Barré, doença neurológica periférica, com acometimento ascendente e que pode comprometer vias respiratórias (MALTA et al, 2017).

O CHIKV é capaz de deixar sequelas musculares caracterizadas por dor muscular espontânea incapacitante por até três anos após a infecção inicial. Quanto mais tarde são realizadas as intervenções clínicas para a doença, maior a tendência estatística das complicações a médio prazo permanecerem. Estudos mostram que essa situação de incapacitação força à busca por rápidos diagnósticos por meios não clínicos que ajudem no monitoramento de respostas mais rápidas (GIRY et al, 2017).

A dengue pode apresentar-se na forma febril, que é uma apresentação mais branda autolimitada, mas existe o risco de desenvolver-se para apresentações mais graves, podendo gerar quadro grave de hemorragia, choque, e disfunções graves de órgãos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Se diagnosticada tardiamente, a síndrome de choque da dengue raramente é reversível (VITA et al. 2009), portanto é de grande importância o diagnóstico rápido e atenção aos sinais de alerta.

A partir dessa necessidade, o diagnóstico laboratorial foi empregado, mas com várias limitações. Seu resultado não apresenta possibilidade de confirmação nos primeiros dias de infecção devido ao próprio processamento imunológico do organismo humano e as condutas médicas ainda são baseadas no diagnóstico clínico (WOROBAY, 2017). Como tentativa de ultrapassar essa limitação, surgiram os estudos moleculares vírus das arboviroses, principalmente quanto à interação vírus-hospedeiro.

A espectrometria de massas pode demonstrar ainda eventos mais específicos como a interação molecular entre duas estruturas e sua resposta metabólica (GAO; CAZARES e FISH, 2017). Estudos apontam que a proteômica e a transcriptômica, em outra linha de estudo, são capazes de determinar moléculas muito específicas e fornecer resultados com alta especificidade (KAN et al, 2017). Contudo, a semelhança entre a carga proteica de vírus com

proximidade filogenética dificulta os estudos e o achado de um marcador proteico específico.

Como alternativa, a lipidômica é uma opção que pode ser de grande importância. Estudos apontam que sua especificidade é grande a ponto de diferenciar doenças semelhantes em um mesmo tecido corporal como descrito por Passos-Castilho et al (2015). O uso dessa técnica torna possível a identificação de alvos moleculares em tecidos orgânicos, já que as respostas celulares à presença viral podem provocar o surgimento de metabólitos de origem lipídica (CLAUS e LIEBERT, 2014).

### 3. METODOLOGIA

Em um microtubo, 200 µL do plasma foram ressuspensos em aproximadamente 150 µL de água MilliQ. A esta suspensão foram adicionados 190 µL de clorofórmio (grau HPLC) e 375 µL de metanol (grau HPLC). Após 2 minutos no vórtex foram adicionados 187,5 µL de clorofórmio (grau HPLC) e 150 µL de água MilliQ. A mistura bifásica foi coletada separadamente. A fase inferior, apolar e contendo lipídeos em solução de clorofórmio, foi transferida para outro microtubo e concentrada para eliminar o solvente (procedimento adaptado de Bligh & Dyer, 1959). A fração metabólica, rica em metabólitos polares, foi coletada. Ambos os extratos foram armazenados a -20°C. O extrato apolar foi redissolvido em metanol/clorofórmio 2:1 no momento da análise. Para o preparo das placas de MALDI, volumes de 1 µL da solução do extrato foram depositados, em triplicata, em poços da placa de MALDI, seguida de secagem em temperatura ambiente. Também foram utilizadas a matriz de DHB e o feixe de *laser* com potencial de 60% do total.

#### 3.1. DEFINIÇÃO DO MÉTODO

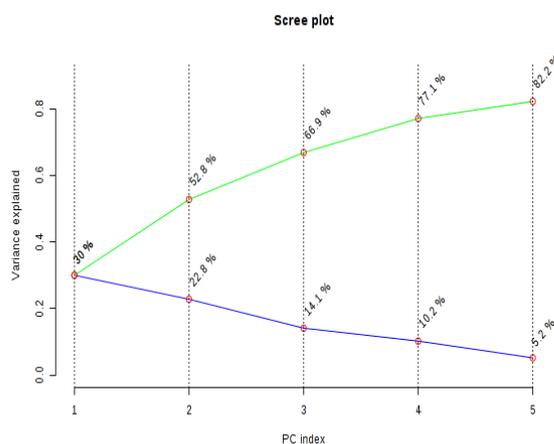
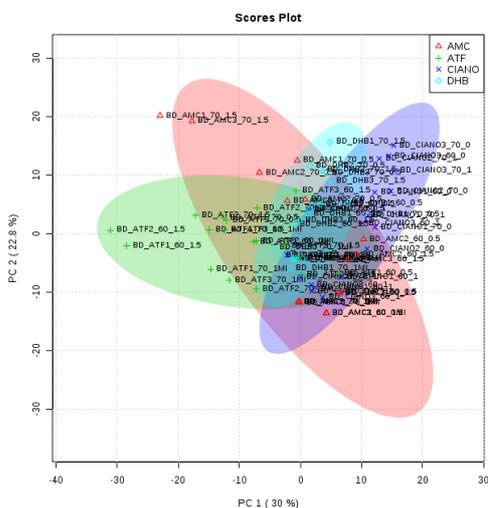
Inicialmente, foram realizadas avaliações para o refinamento do método e para estabelecer as condições ótimas de execução. O equipamento a ser utilizado – MALDI/TOF MS – permite variações em seus parâmetros de uso como o feixe de *laser*, a concentração de amostra utilizada e a matriz agregada à amostra. A definição dos melhores parâmetros é fundamental para o melhor resultado alcançado e foi realizada no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massa, da Universidade de Campinas – UNICAMP, de 5 a 10 de fevereiro de 2018.

Além das variáveis do MALDI/TOF MS, também foi verificado outro método de extração lipídica baseado na utilização de metil-terc-butil-eter (MTBE). Para tanto, foram adicionados 225  $\mu\text{L}$  de MeOH frio a 50  $\mu\text{L}$  de amostra, misturando-os por 10 seg. Depois, foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de MTBE, também misturado por mais 10 seg. O resultado foi levado ao vórtex por 10 min e, logo depois, foram adicionados 188  $\mu\text{L}$  de água milliQ, com nova mistura de 20 seg. A solução foi centrifugada a 14000 rpm por 10 min a 4<sup>o</sup> C. Após centrifugação, foi realizada coleta da fase orgânica (superior) que foi seca com speed-vac por 1 h e 30 min. O material obtido foi ressuspenseo em 100  $\mu\text{L}$  de MeOH e levado ao vórtex por mais 5 min. Logo após, foi novamente centrifugado a 14000 rpm por 5 min a 4<sup>o</sup> C.

Para a análise do método, foram comparadas quatro matrizes diferentes: o ácido dihidroxibenzoico (DHB), a 9-aminoacridina (AMC), o ácido  $\alpha$ -ciano-hidroxicinâmico (CIANO) e o ácido transferrúlico (ATF). Também foram comparadas as concentrações (0,5  $\mu\text{L}$ ; 1  $\mu\text{L}$ ; 1,5  $\mu\text{L}$ ) e a intensidade do feixe de *laser* do aparelho (60% e 70%). Todas as amostras foram comparadas em triplicata com igual número de disparos (10 em cada amostra) para comparação entre os espectros (Apêndice 1).

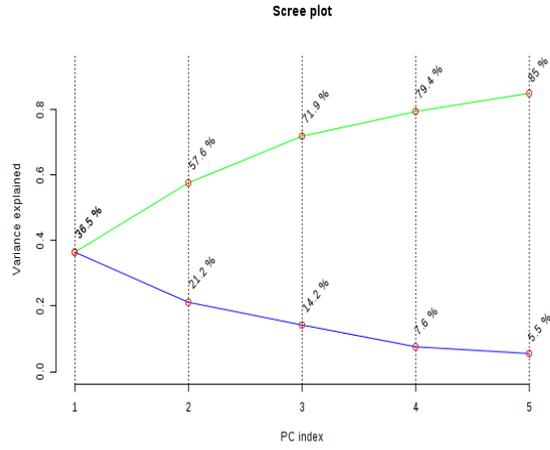
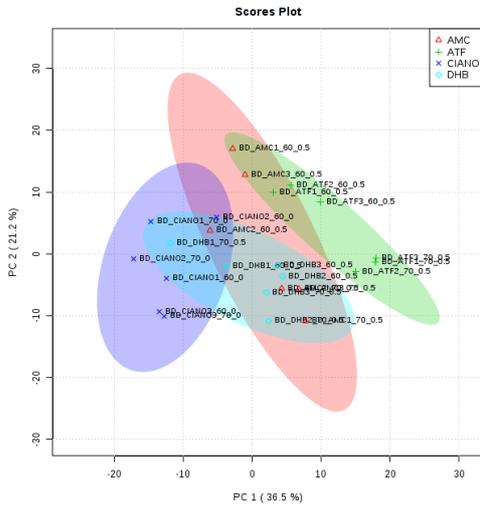
Foram realizadas avaliações estatísticas para determinar a margem de segurança para a análise dos dados encontrados, pelo *software* Metaboanalyst. Foram utilizados relação massa/carga com erro de 0.4, desvio-padrão relativo não paramétrico, escala de Pareto e margem de erro de 0.5%. Para os métodos de extração Bligh-Dyer e MTBE, foram comparadas as variâncias das matrizes utilizadas no MALDI, das concentrações aplicadas e do percentual de feixes de *laser* utilizados com os seguintes resultados, para só então ser escolhido método definitivo, como demonstrado a seguir.

### Bligh-Dyer – Matrizes:

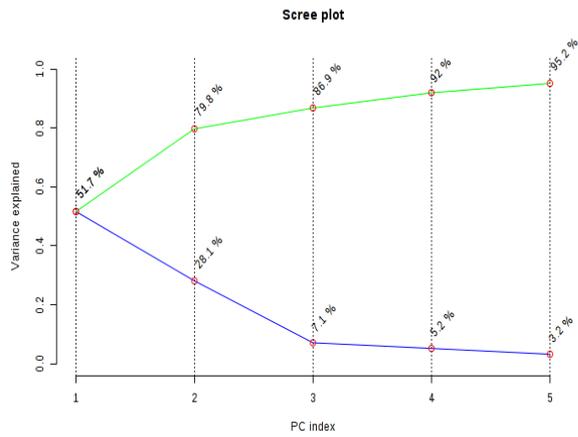
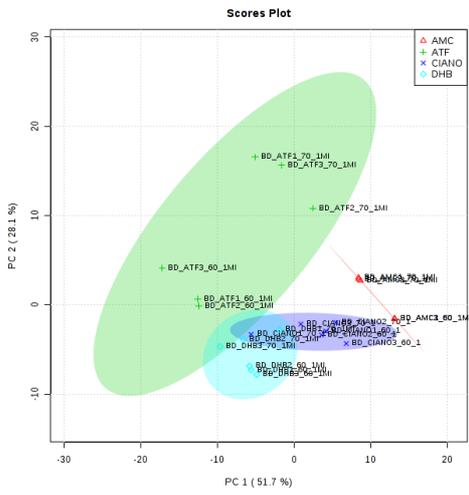


## Bligh-Dyer – Concentrações:

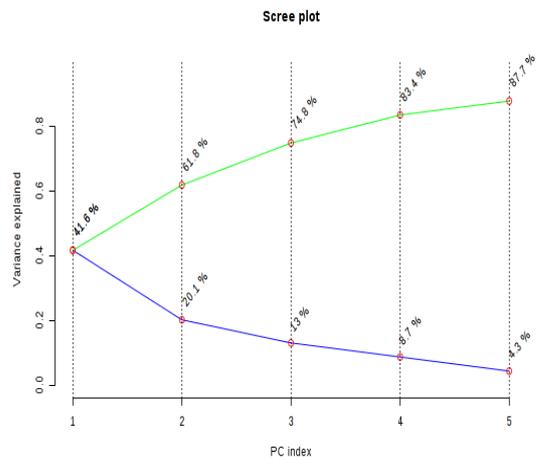
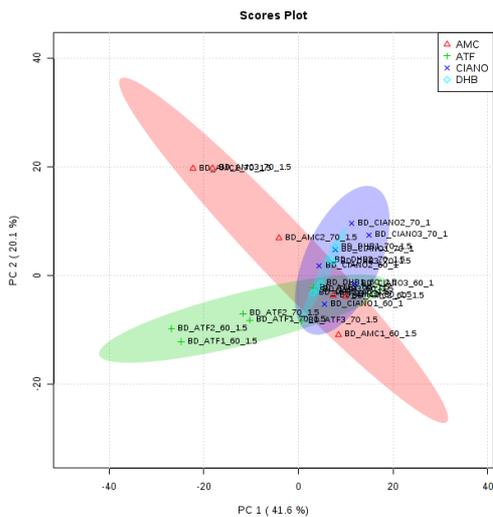
### • 0.5 µL:



### • 1 µL:

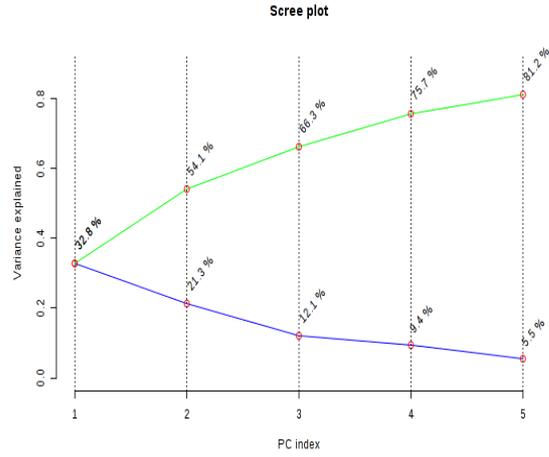
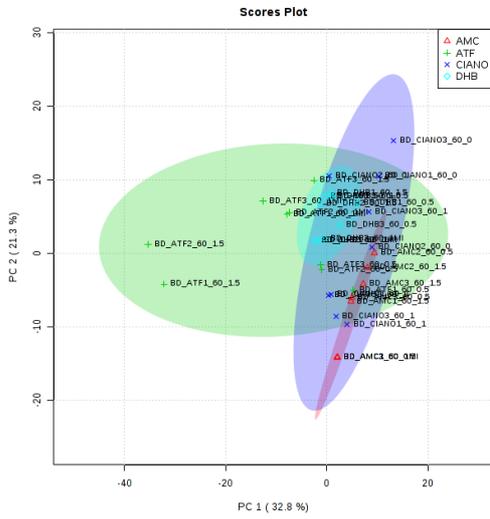


### • 1.5 µL:

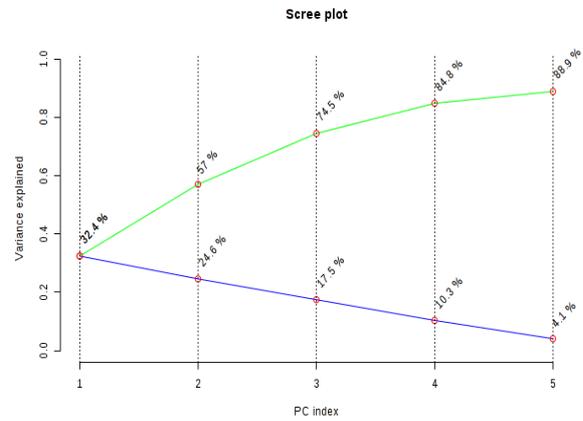
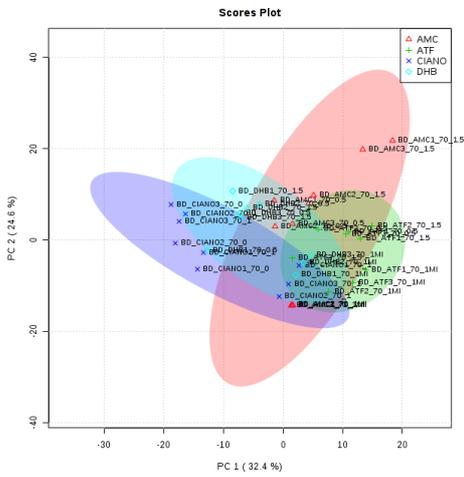


## Bligh-Dyer – Percentual dos feixes de *laser*:

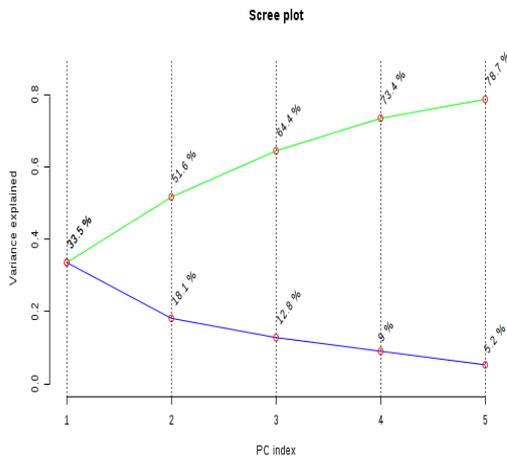
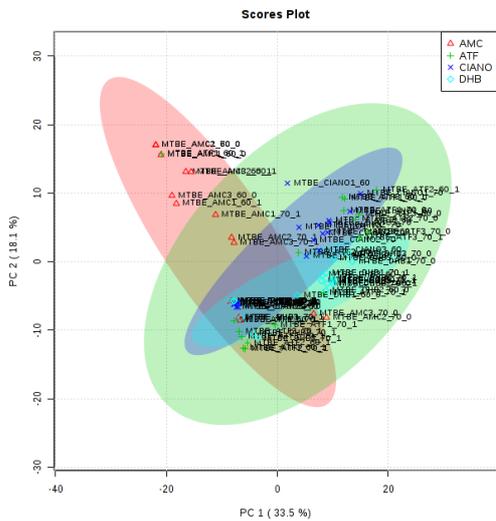
- Aplicação de 60%:



- Aplicação de 70%:

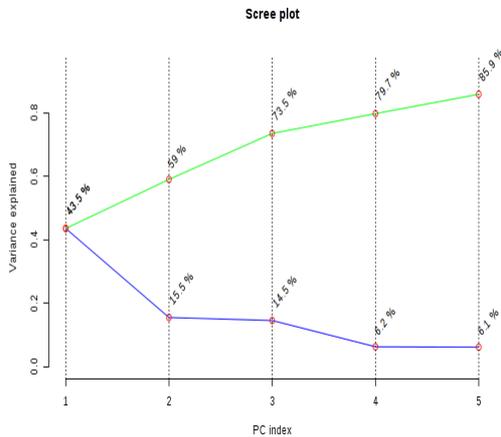
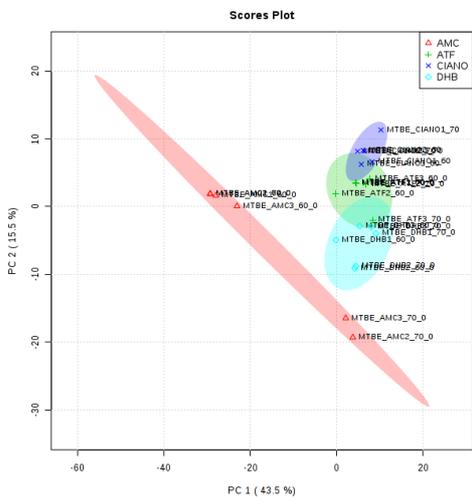


## MTBE – Matrizes:

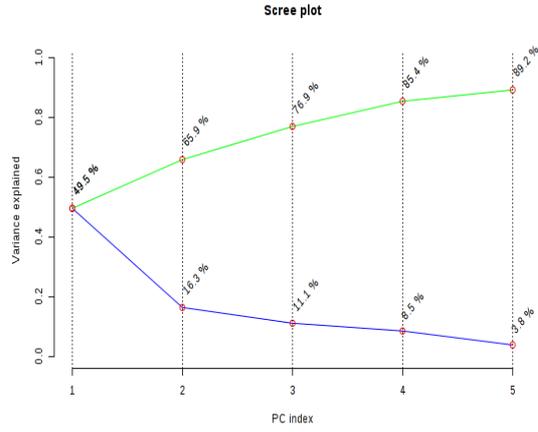
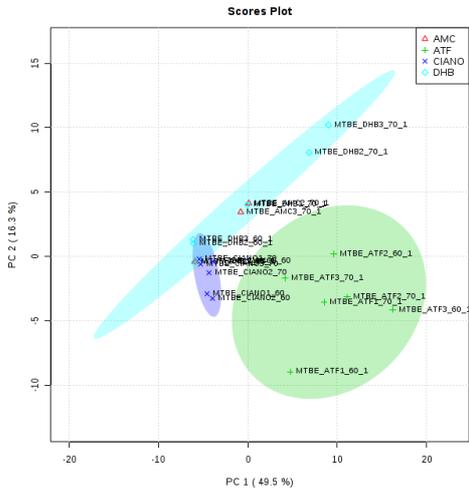


## MTBE – Concentrações:

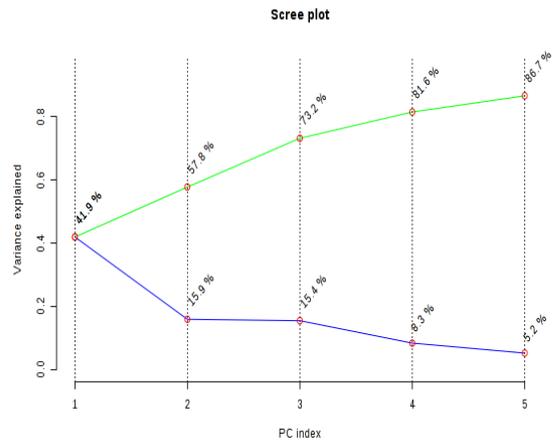
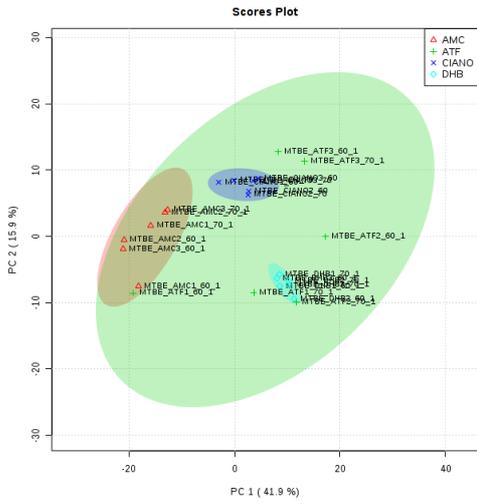
- 0.5 µL:



● 1  $\mu$ L:

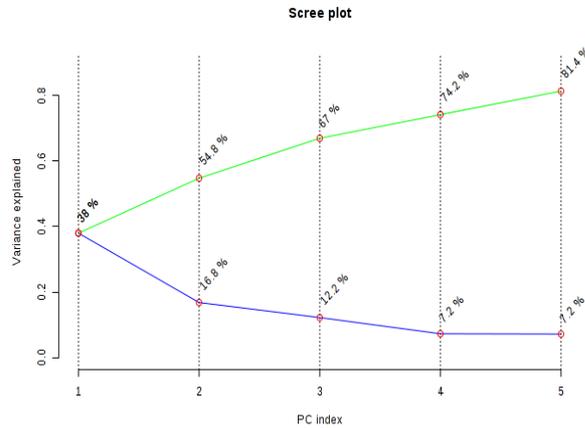
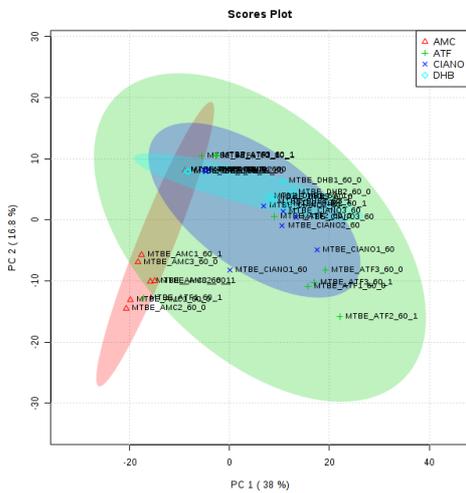


● 1.5  $\mu$ L:

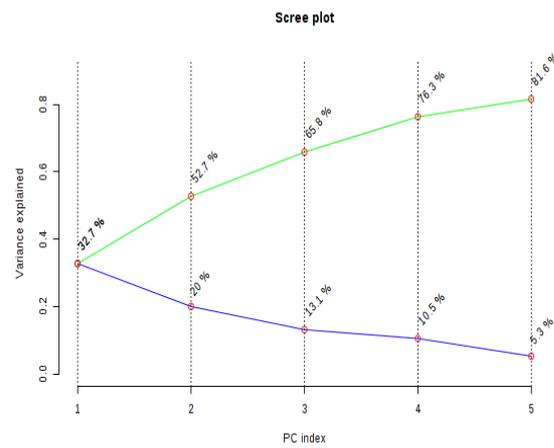
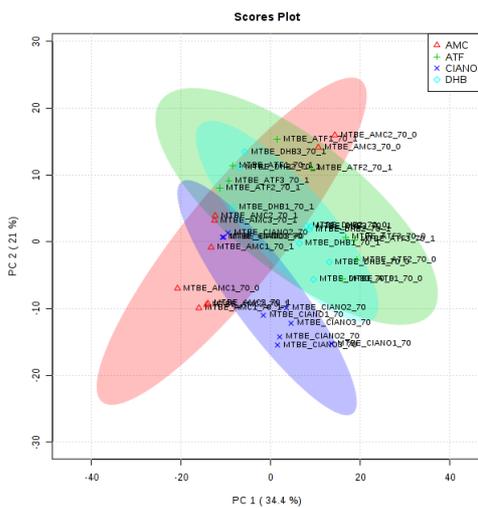


## MTBE – Percentual dos feixes de laser:

- Aplicação de 60%:



- Aplicação de 70%:



Após análise estatística cuidadosa, foi observado que as melhores condições para a execução dos experimentos tratam-se da utilização de métodos de extração Bligh-Dyer, utilizando-se a matriz DHB, a concentração da amostra de 1 $\mu$ L e aplicando-se o feixe de laser a 60% do potencial total.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. FASE LIPÍDICA

Inicialmente, é interessante destacar as semelhanças entre os componentes encontrados na leitura do MALDI/TOF MS, já que os objetos da observação se tratam de vírus com ciclos de vida e interações com o hospedeiro que compartilham muitas homologias metabólicas. As relações m/z na leitura do espectrômetro entre as faixas em

torno de 703 e 832 apresentam-se igualmente nas três espécies e com intensidade semelhante em ambas. Essa provavelmente trata-se da maior parte do envelope lipídico compartilhado por todas as espécies avaliadas. Também é observado que após a faixa de 832 não há mais expressão de moléculas na fase lipídica, tornando esse fato uma chave de investigação na comparação entre arboviroses.

Na apresentação do CHIKV (Figura 1), foi observado que o íon 633 apresenta-se com intensidade em torno de  $1.10^4$  e não aparece na leitura do ZIKV e do DENV II. Além disso, existe uma relação entre os íons de marcação 518 e 546 em que ambos sempre aparecem em uma proporção de 2:1, situação não observada nas outras respostas metabólicas virais pesquisadas. A literatura demonstra que esses marcadores moleculares, quando associados à resposta de um determinado espécime, podem ser utilizados para identificar suas respectivas estruturas orgânicas (KLITZKE, 2012). Dessa forma, as características próprias definidas neste trabalho à leitura do CHIKV na espectrometria de massas podem levar à rápida identificação do vírus.

A leitura do ZIKV (Figura 2) apresentou dois íons marcadores nas faixas em torno de 650 e 678 m/z com intensidade média de  $4.10^4$  e  $1.10^4$ , respectivamente. O referido achado não foi detectado na leitura do CHIKV e do DENV II e pode ser usado para identificação da infecção da Zika. Além do íon, foi observada também a relação entre os íons nas bandas 524 e 548 m/z na proporção média de 3:1 que se mantém nas leituras e também pode ser utilizada para identificação, pois não existe na leitura das outras arboviroses da pesquisa de forma a se observar nos gráficos do perfil lipídico comparativo (Figura 5).

Diferentemente da Zika e da Chikungunya, o dengue vírus do sorotipo II apresenta resultados mais específicos ao final do espectro. A leitura do DENV II (Figura 3) apresentou dois íons marcadores nas faixas em torno de 879 e 991 m/z com intensidade média de  $1.10^4$  e  $5.10^5$ , respectivamente. O referido achado não foi detectado na leitura do CHIKV e do ZIKV e pode ser usado para identificação da infecção da dengue causada pelo sorotipo II do vírus.

## PERFIL LIPÍDICO CHIKV

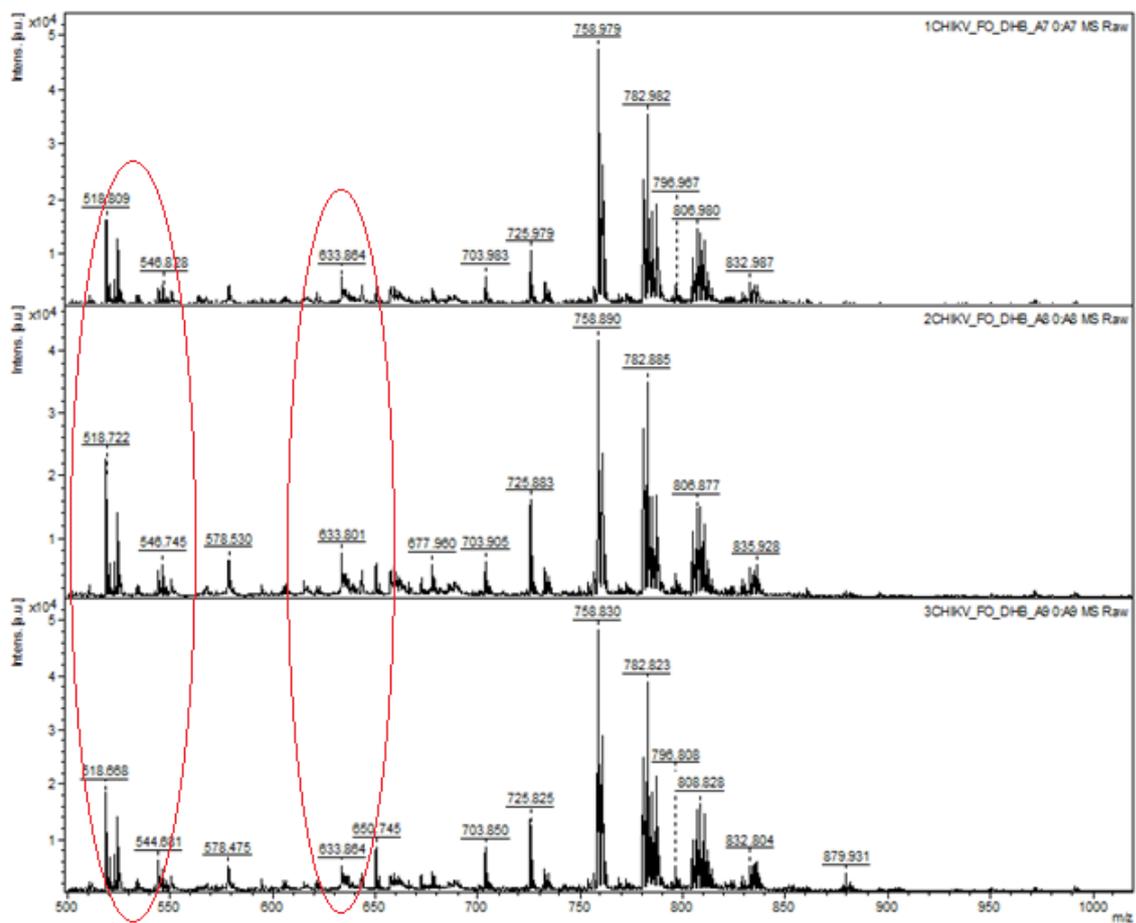


Figura 1 – TIC (*total ion current chromatogram*) do perfil lipídico do CHIKV. Do lado esquerdo, a proporção de 2:1 observada entre os íons 518 m/z e 546 m/z. Do lado direito, o íon 633 m/z.

## PERFIL LIPÍDICO ZIKV

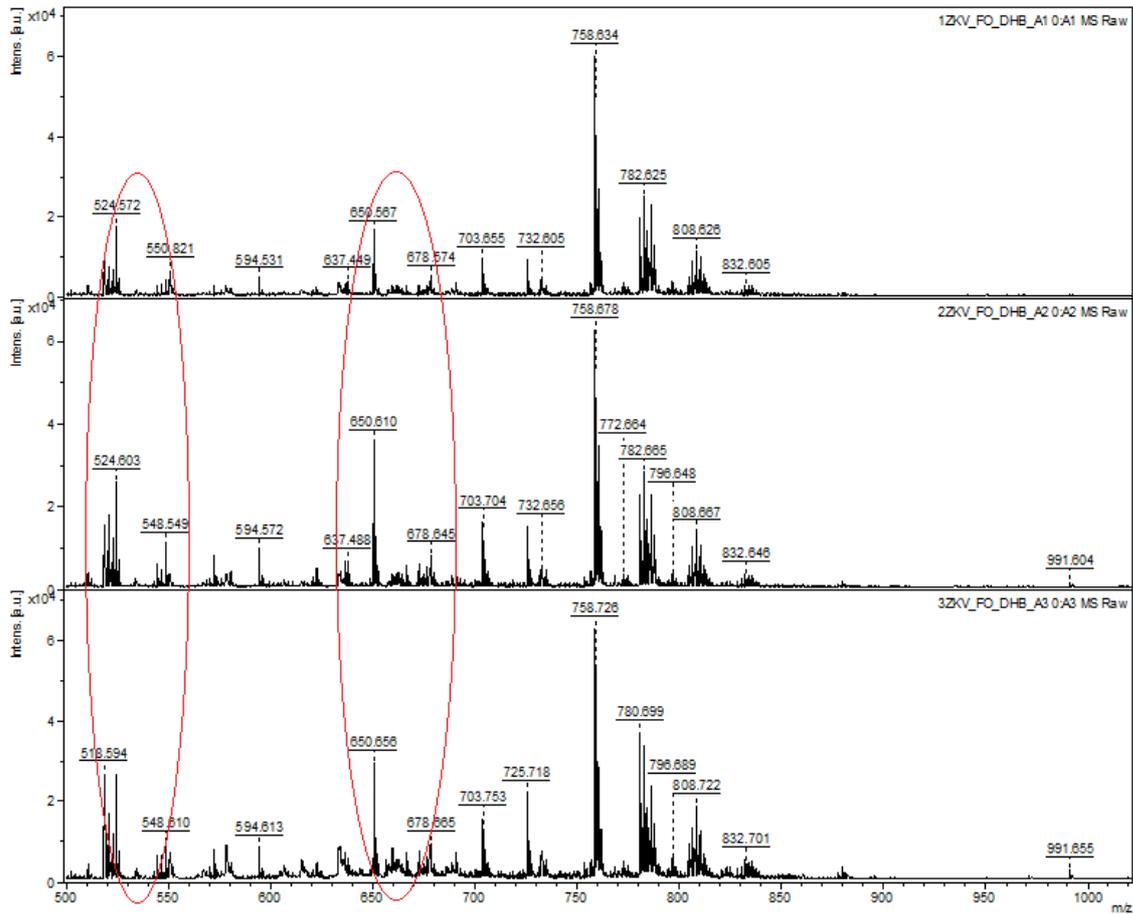


Figura 2 – TIC (*total ion current chromatogram*) do perfil lipídico do ZIKV. Do lado esquerdo, a proporção de 3:1 observada entre os íons 524 m/z e 548 m/z. Do lado direito, os íons 650 m/z e 678 m/z.

## PERFIL LIPÍDICO DENV II

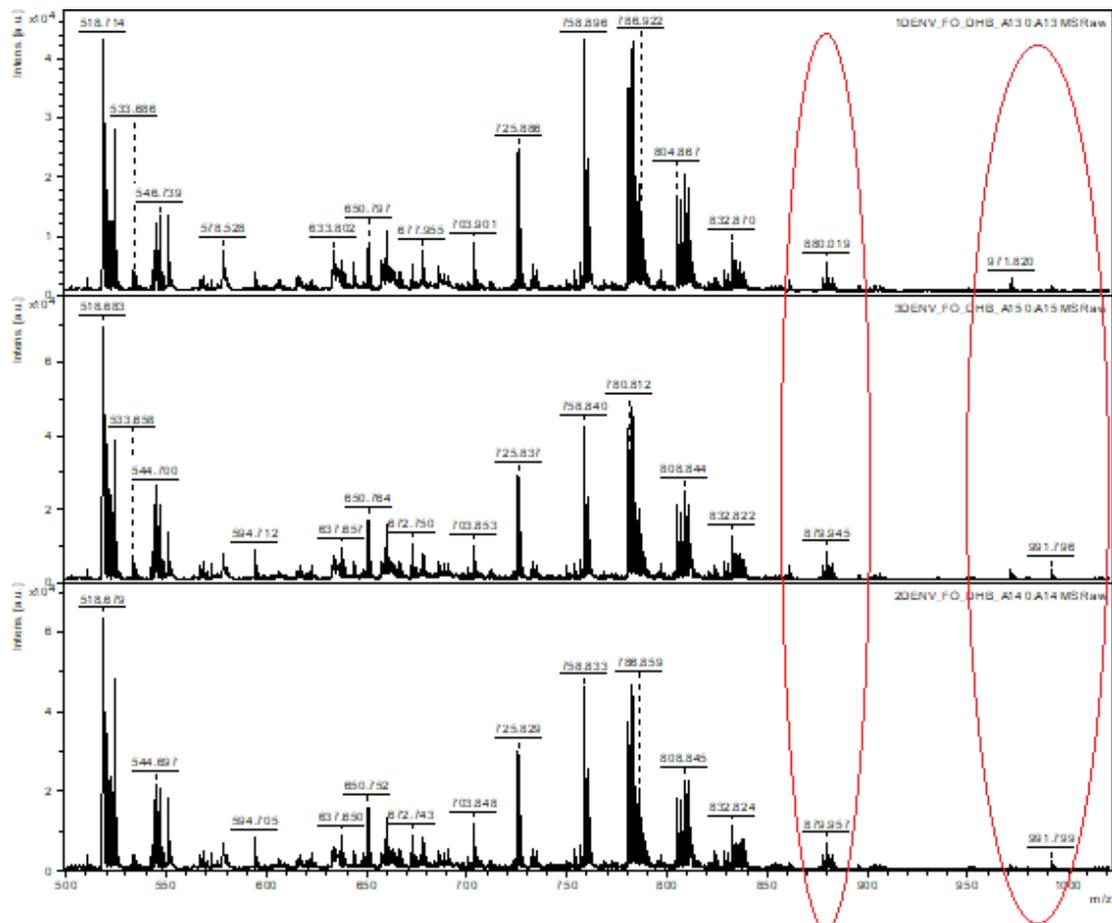


Figura 3 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil lipídico do DENV II. Do lado direito, são observados os íons 879 m/z e 991 m/z.

## PERFIL LIPÍDICO COINFECTADOS

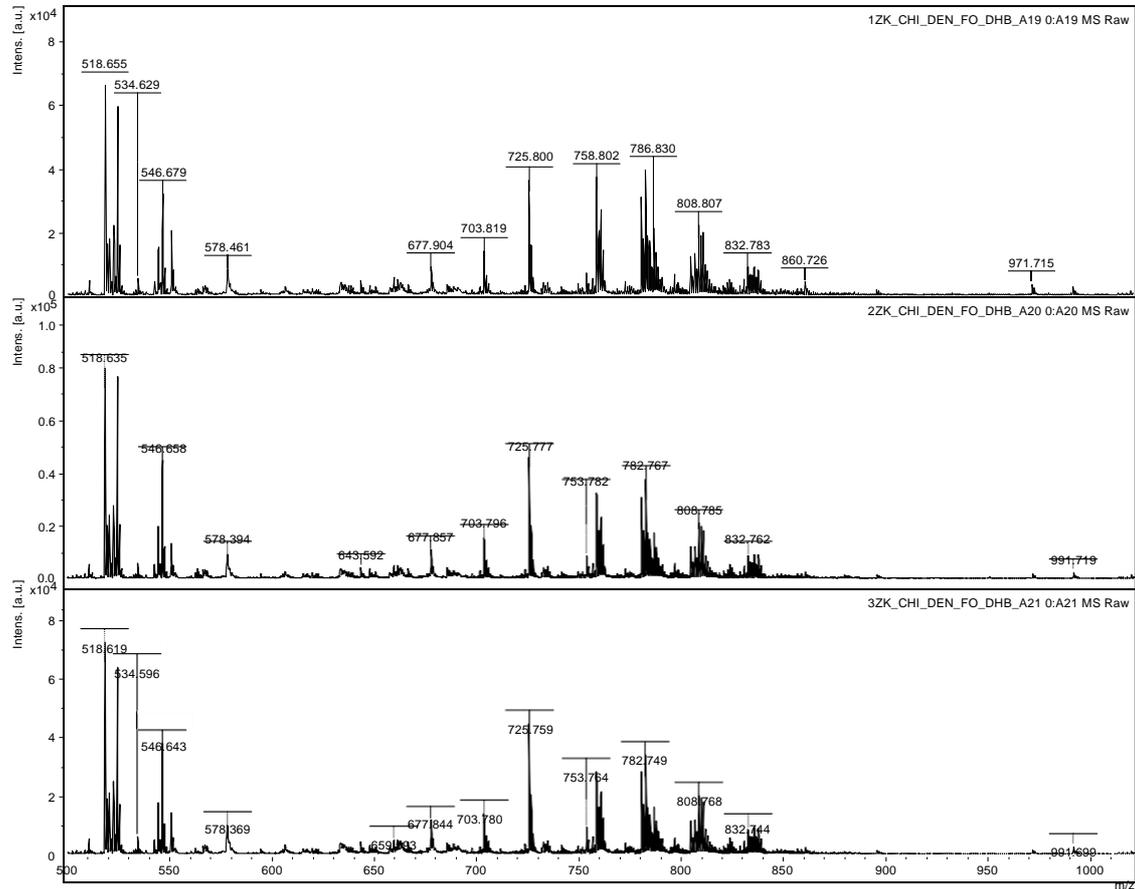


Figura 4 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil lipídico de 3 pacientes distintos, coinfetados pelos três vírus, concomitantemente: ZKV, CHIKV, DENV II.

## PERFIL LIPÍDICO COMPARATIVO

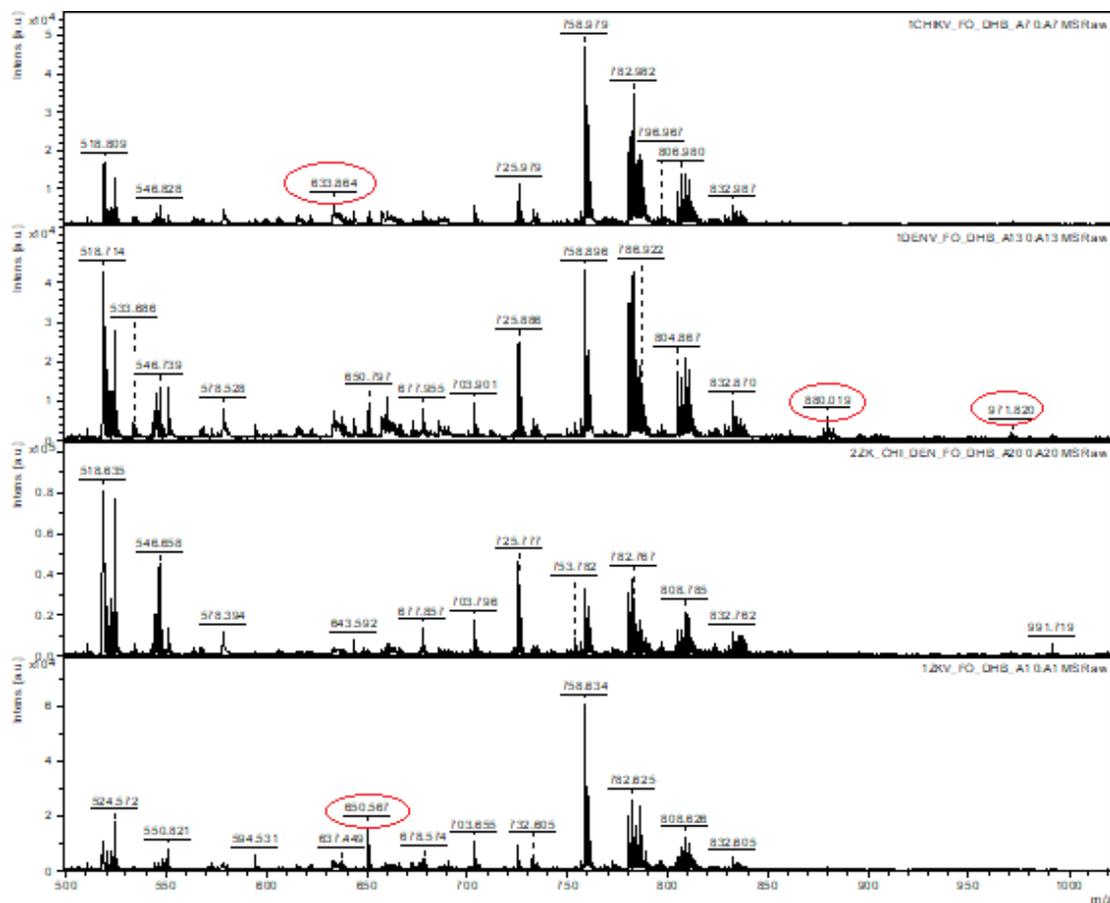


Figura 5 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil lipídico comparativo. Observa-se a identificação dos íons específicos 633 m/z para CHIKV, 880 m/z e 971 m/z para DENV II e 650 m/z para ZIKV.

## 4.2. FASE POLAR

A fase polar, predominantemente composta por metabólitos de menor tamanho, provenientes do metabolismo de cada doença específica, apresentou resultados muito característicos. Tanto o ZIKV, o CHIKV quanto o DENV II apresentam duas regiões com várias expressões iônicas comuns. Entre 518 m/z e 567 m/z com intensidade entre  $4 \cdot 10^4$  e  $1 \cdot 10^4$  e entre 672 m/z e 782 m/z com baixas intensidades, porém bastante prevalentes.

A fase polar das amostras do CHIKV (Figura 6) apresentou o íon 537 m/z com uma intensidade de  $3 \cdot 10^4$ . Apesar de ser o mesmo íon observado no ZIKV, a intensidade relativa com que se apresenta é duas vezes maior e pode tornar possível a utilização do íon para identificação. Outros íons se sobressaem com menor intensidade, porém com presença no intervalo no qual o ZIKV não apresenta íons. São eles os íons 638 m/z, 749 m/z e 860 m/z. O mais expressivo íon na fase polar para identificação do CHIKV é o 659 m/z que não é

observado nas outras infecções, possuindo intensidade relativa em torno de  $1,5 \cdot 10^4$ , bastante expressivo quando comparados com outros.

O ZIKV apresentou em sua fase polar (Figura 7) poucos picos que se apresentam de forma bastante regular. O íon 537 m/z se ioniza de forma constante, com uma intensidade em torno de  $1,5 \cdot 10^4$ . Foi observado ainda que os intervalos entre 567-672 m/z e 780-966 m/z apresentam-se completamente vazios nas diferentes amostras analisadas. Assim, pode-se utilizar como método de identificação a ausência de picos nesses intervalos no lugar de sua observância como critério de reconhecimento comparativo das fases polares (Figura 10).

O DENV II apresentou em sua fase polar (Figura 8) poucos picos regulares, mas a maioria está presente nas outras infecções. No entanto, o íon 725 m/z se apresenta de forma constante, com uma intensidade em torno de  $1,5 \cdot 10^4$ . Foi observado ainda que não há qualquer pico que se apresente no espectro do DENV II após o íon 832 m/z. A ausência de marcação também pode ser utilizada para rápida exclusão de diagnóstico da doença.

#### FASE POLAR CHIKV

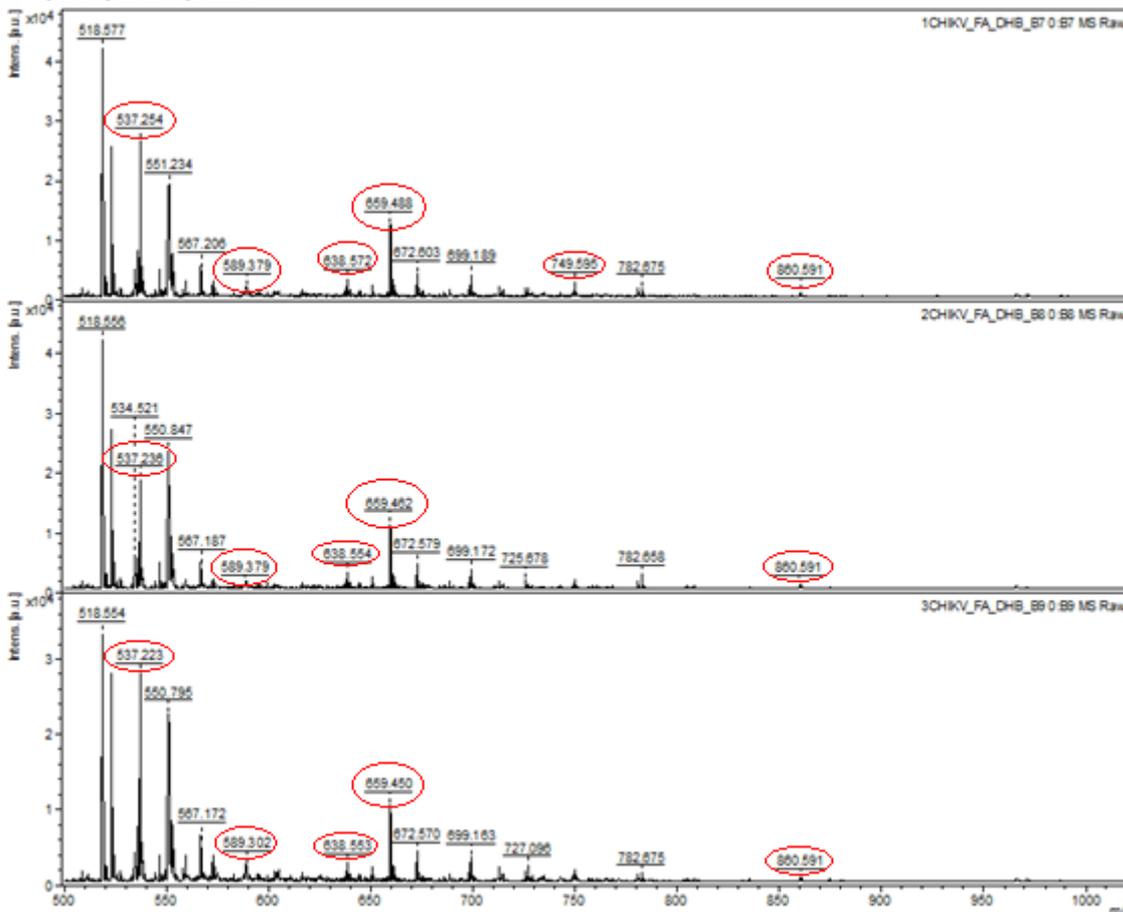


Figura 6 – TIC (*total ion current chromatogram*) do perfil da fase polar do CHIKV. Em evidência, os íons 537 m/z, 638 m/z, 659 m/z, 749 m/z e 860 m/z.

## FASE POLAR ZIKV

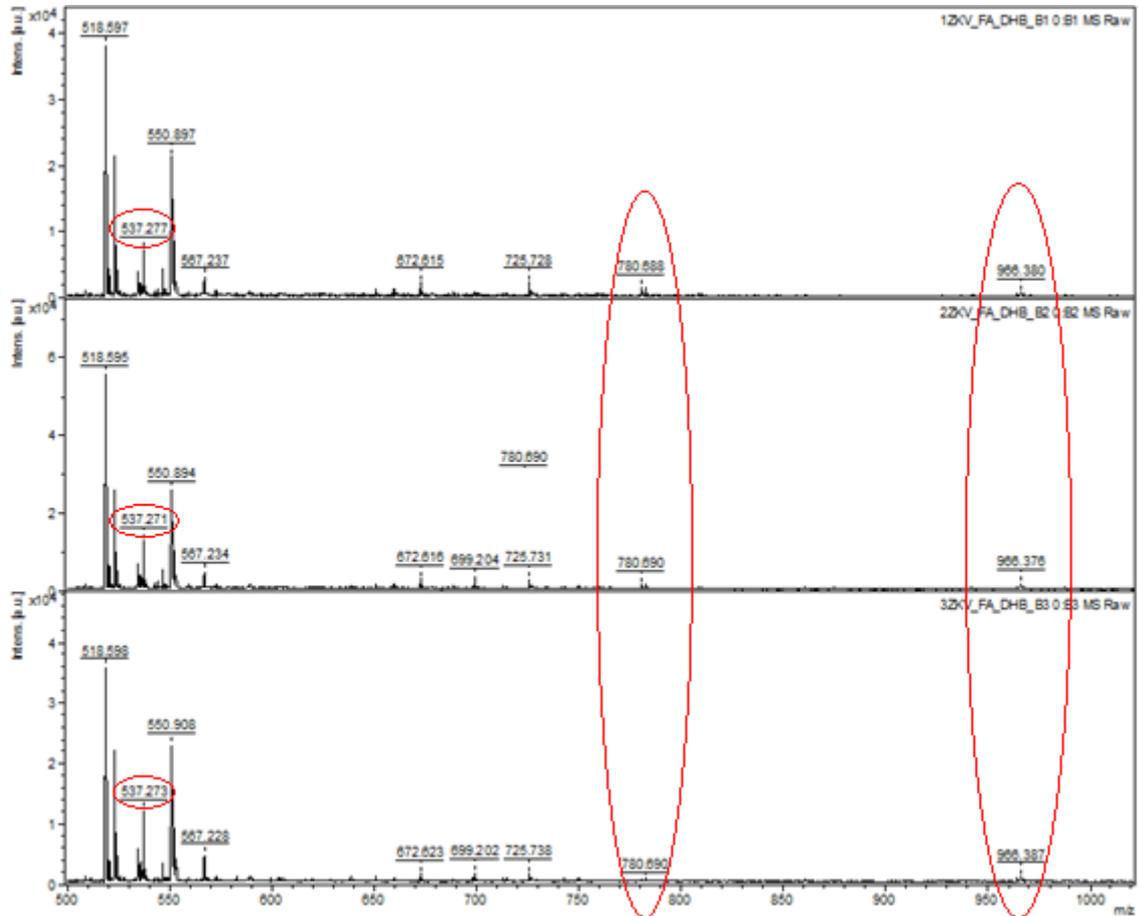


Figura 7 – TIC (total ion current chromatogram) do perfil da fase polar do ZIKV. Em evidência, os íons 537  $m/z$  e os intervalos 567-672  $m/z$  e 780-966  $m/z$ . 638  $m/z$ , 659  $m/z$ , 749  $m/z$  e 860  $m/z$ .

## FASE POLAR DENV II

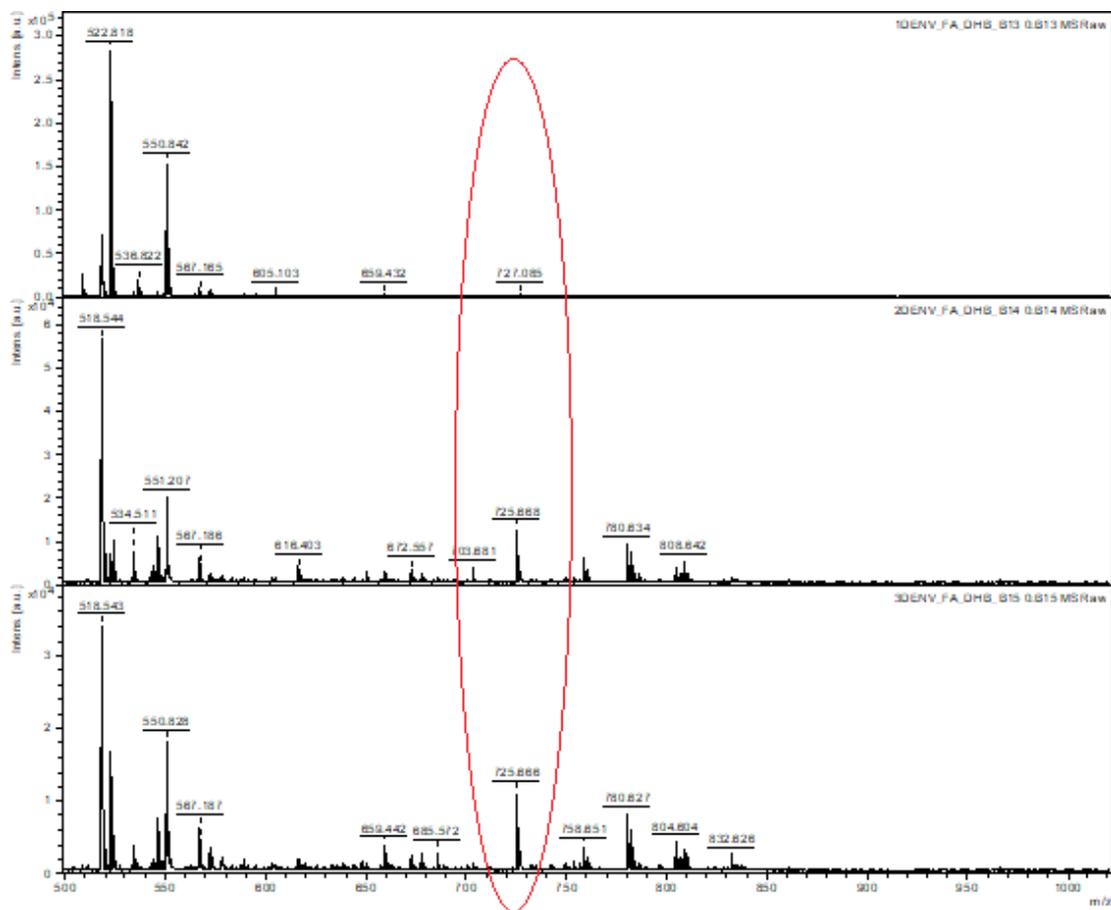


Figura 8 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil da fase polar do DENV II. Observa-se a presença do íon 725 m/z em maior intensidade.

## FASE POLAR COINFECTADOS

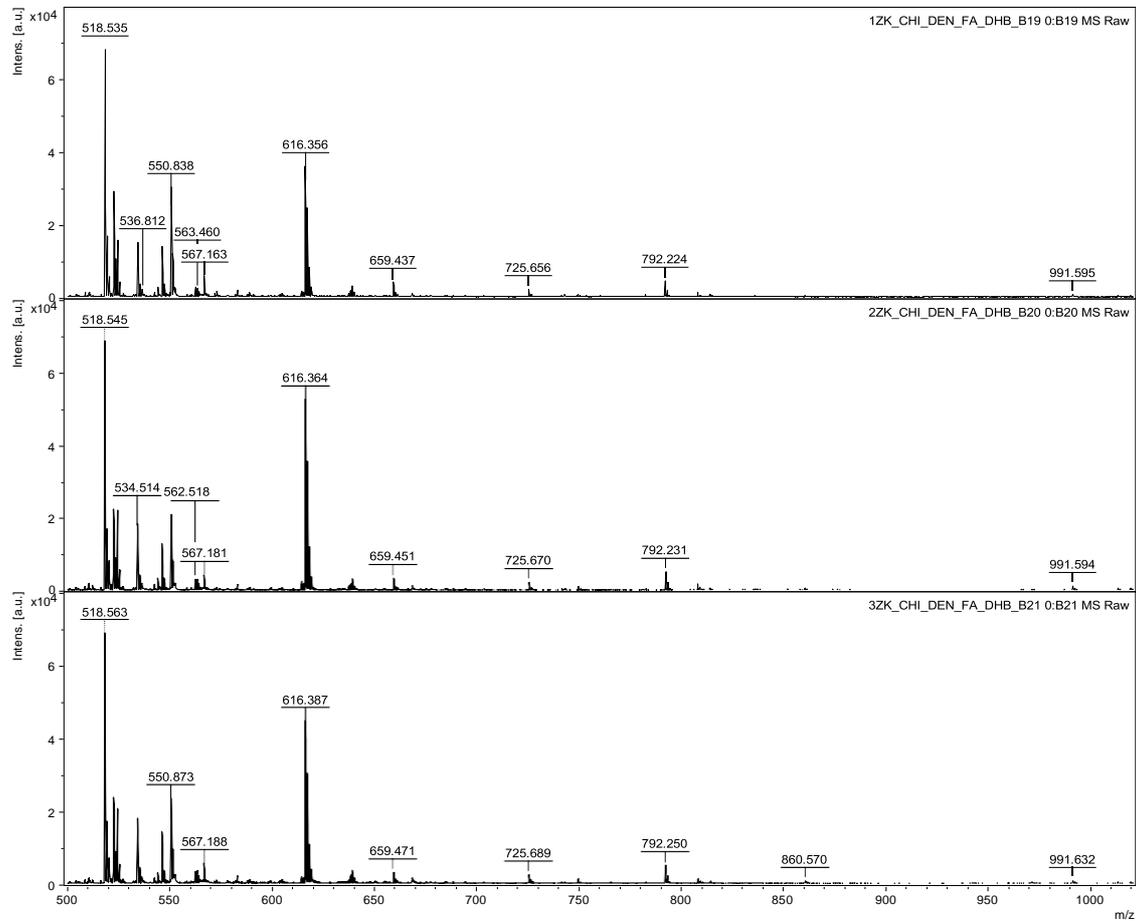


Figura 9 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil tríplice da fase polar de 3 pacientes distintos, coinfetados pelos três vírus, concomitantemente: ZKV, CHIKV, DENV II.

## FASE POLAR COMPARATIVO

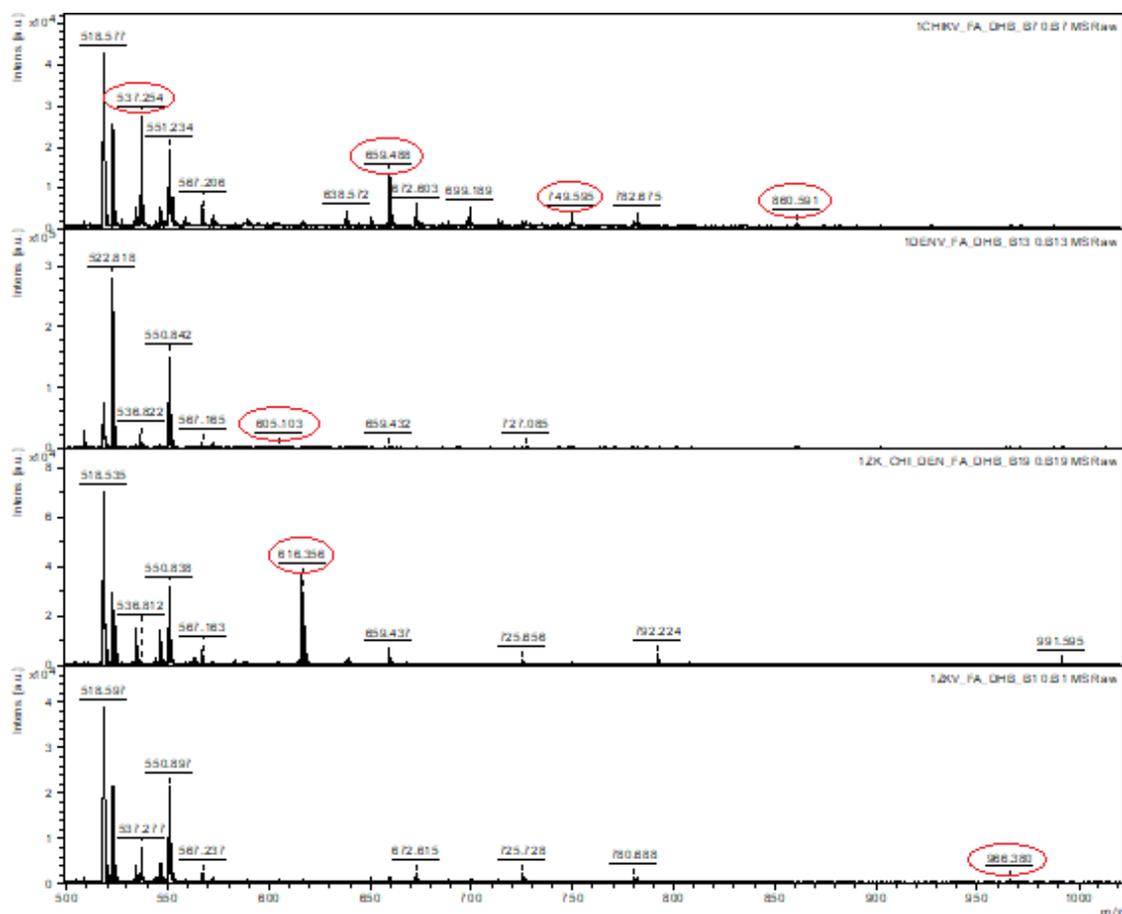


Figura 10 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil comparativo da fase polar.

### 4.3. PERFIL PEPTÍDICO

O perfil peptídico também foi analisado e as leituras dos CHIKV e do DENV II (Figuras 11 e 13, respectivamente) não apresentaram íons significativos. Não obstante a este resultado, o perfil do ZIKV (Figura 12) apresentou o íon 5020 m/z com intensidade em torno de  $2 \cdot 10^4$  que o torna bastante específico como é demonstrado no quadro comparativo dos perfis peptídicos (Figura 15).

## PERFIL PEPTÍDICO CHIKV

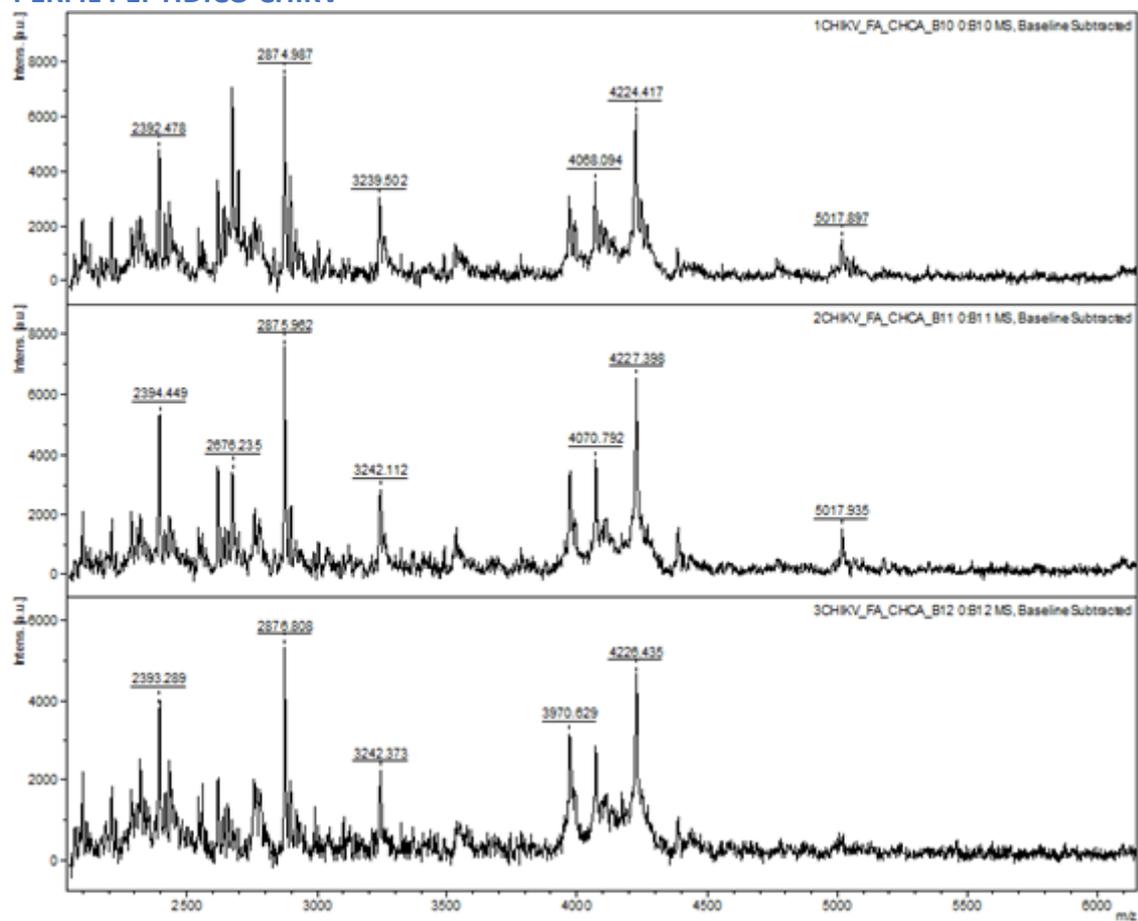


Figura 11 – TIC (*total ion current chromatogram*) peptídico do CHIKV.

## PERFIL PEPTÍDICO DO ZIKV

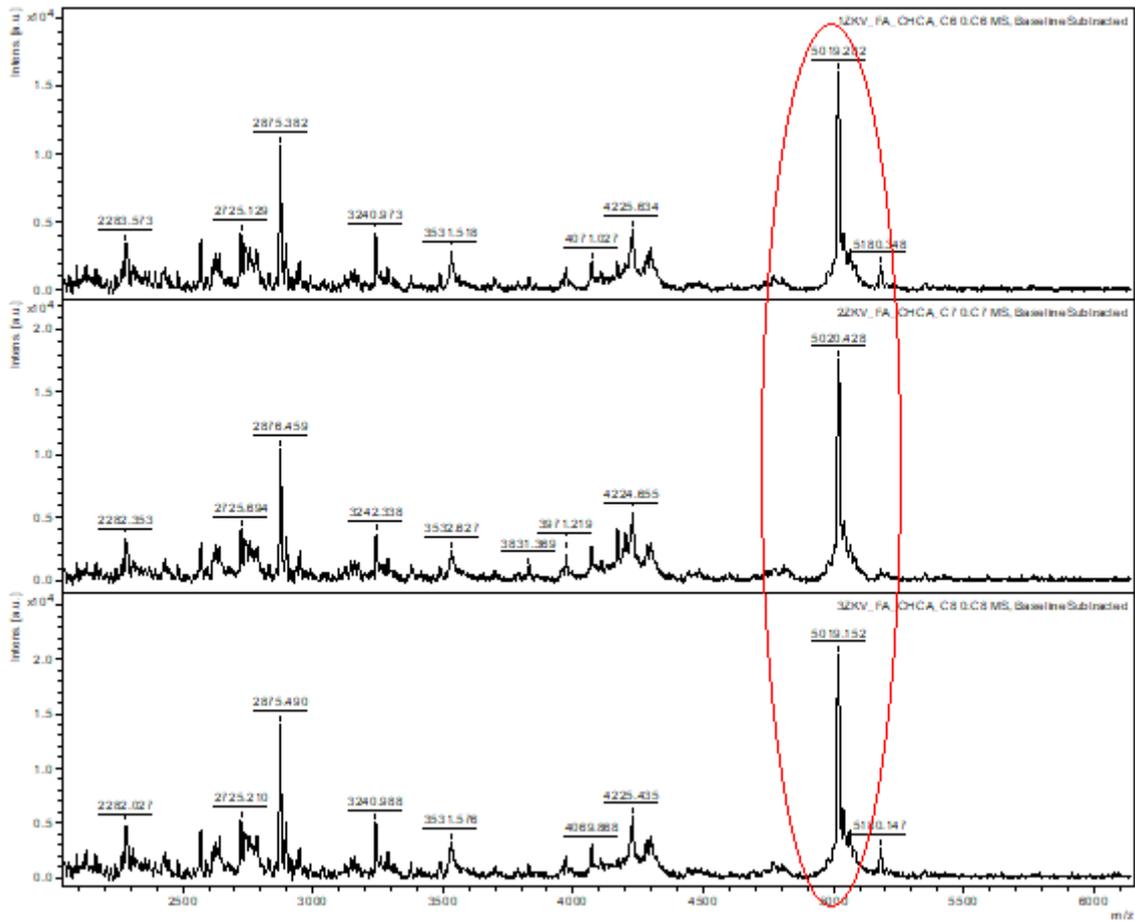


Figura 12 – TIC (*total ion current chromatogram*) peptídico do ZIKV.

## PERFIL PEPTÍDICO DENV II

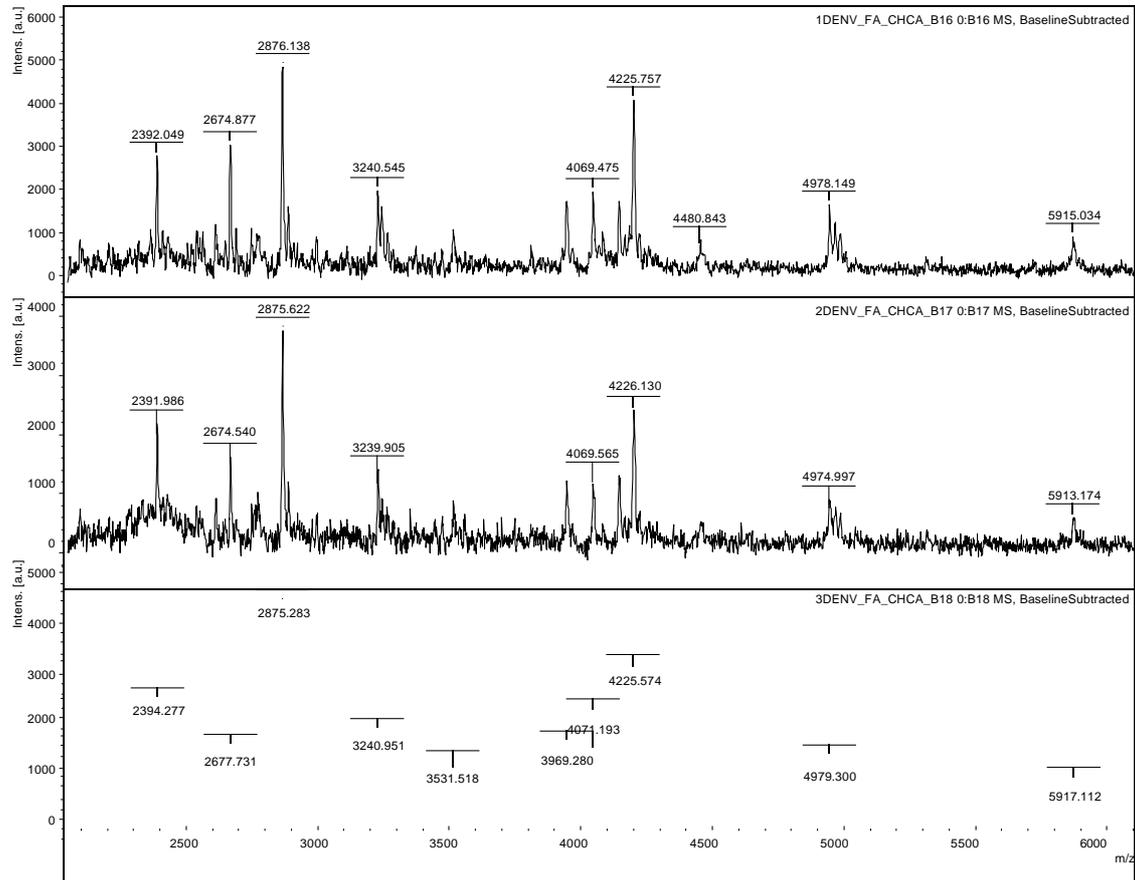


Figura 13 – TIC (total ion chromatogram) do perfil peptídico do DENV II.

## PERFIL PEPTÍDICO COINFECTADOS

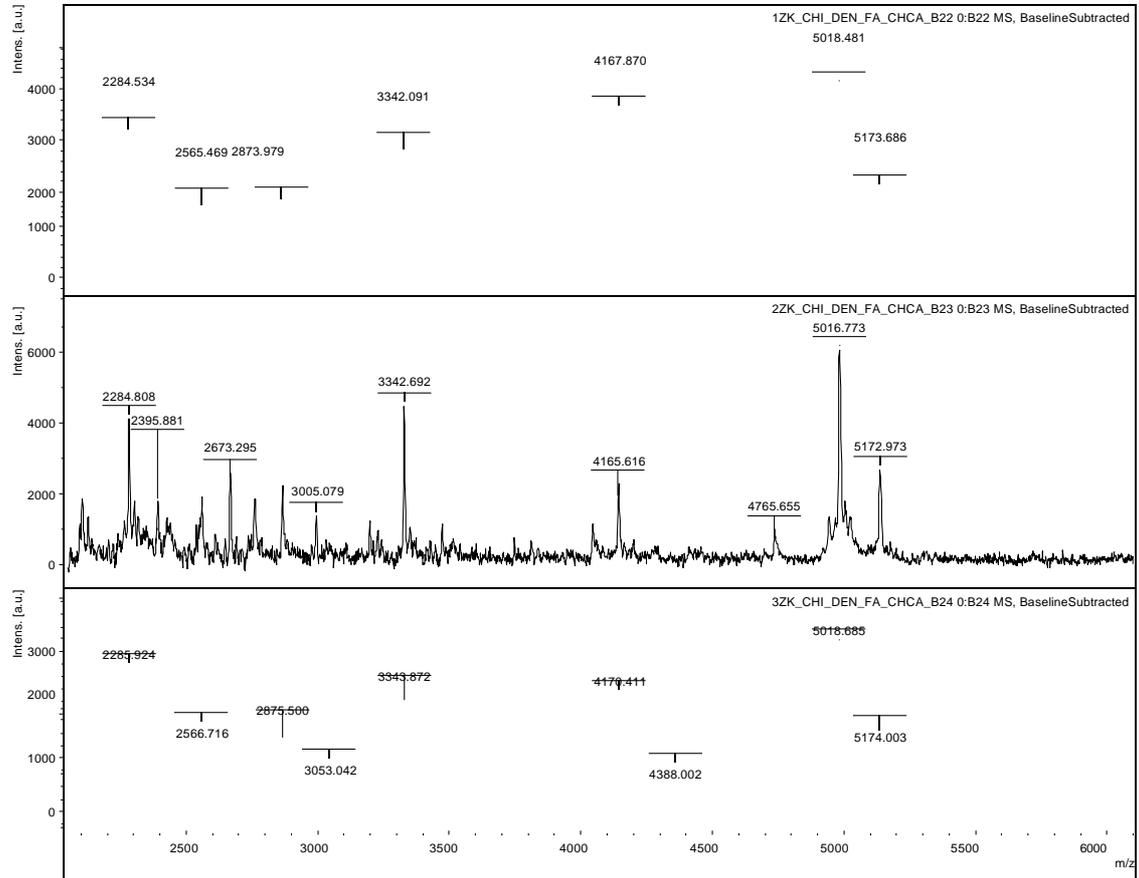


Figura 14 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil peptídico coinfetados.

## PERFIL PEPTÍDICO COMPARATIVO

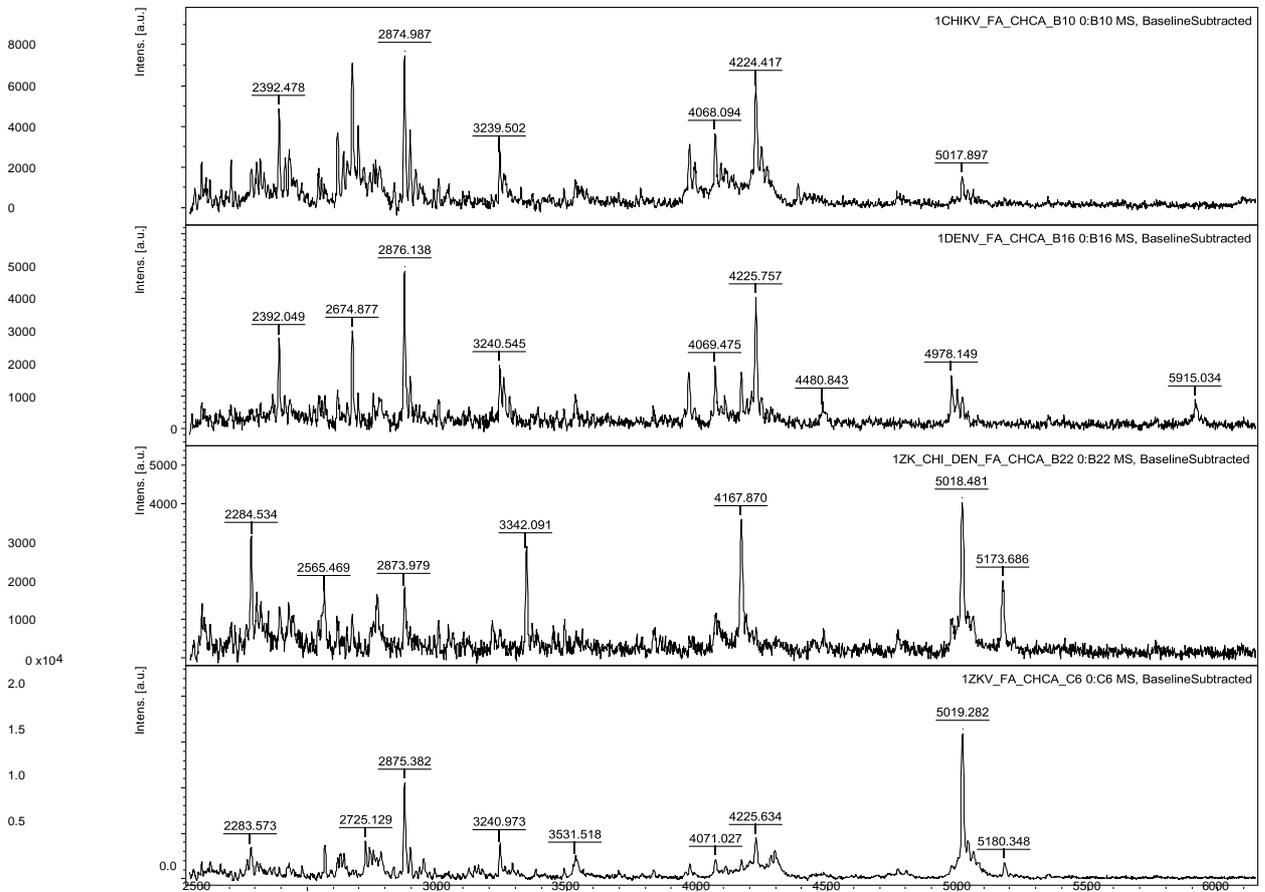


Figura 15 – TIC (*total ion chromatogram*) do perfil peptídico comparativo.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados das análises das amostras apontam-se promissores quanto à existência de íons marcadores para identificar as arboviroses Dengue, Chikungunya e Zika, demonstrando avanço frente ao diagnóstico dessas duas doenças com diferenciação clínica difícil.

O método utilizado é possível de ser reproduzido fora do laboratório, basta que a instituição, hospitalar, clínica ou acadêmica, possua a instrumentação para análise. Há, inclusive, laboratórios especializados em diagnóstico que já utilizam a tecnologia para outras finalidades, deixando claro que os resultados se mostram factíveis frente à aplicação prática de sua utilização nos sistemas de saúde.

Conclui-se, portanto, que há uma especificidade apresentada por esses íons referentes a diferentes moléculas que possibilitam identificar de maneira rápida o *fingerprint* destas doenças, tornando muitos desses íons marcadores de diagnóstico e discriminantes metabólicos. Essa utilização de discriminantes para rápido diagnóstico molecular de arboviroses representa uma das melhores alternativas para o futuro de seus diagnósticos.

## REFERÊNCIAS

FAUCI, A.S.; MORENS, D.M. **The perpetual challenge of infectious diseases.** N Engl J Med. 366 (2012) 454-461.

VIEIRA, MACS. et al. **Potential role of dengue virus, chikungunya virus and Zika virus in neurological diseases.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 113(11): e170538, 2018.

ARAÚJO et. al. **Aumento da carga de dengue no Brasil e unidades federadas, 2000 e 2015: análise do Global Burden of Disease Study 2015.** Rev Bras Epidemiol, 20(Supl 1): 205-216, 2017.

VASCONCELOS, VV; PINHO, CMD. **Multivariate geovisualization of dengue, zika and chikungunya cases in Brazil: a didactic experience.** Hygeia, 13(25): 91-106, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018.** Volume 50, Nº 4, Jan 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes(dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA).** Volume 50, Nº 13, Abr 2019.

OLIVEIRA, RMAB; ARAÚJO, FMC; CAVALCANTI, LPG. **Aspectos entomológicos e epidemiológicos das epidemias de dengue em Fortaleza, Ceará, 2001-2012.** Epidemiol. Serv. Saúde, 27(1), 2018.

OLIVEIRA, CS; VASCONCELOS, PFC. **Microcephaly and Zika virus.** J Pediatr, 92(2): 103-105, 2016.

KUCHARZ, E.J.; CEBULA-BYRSKA, I. **Chikungunya fever.** Eur J Intern Med. 23 (2012) 325-329.

BORTEL, W et al. **Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe.** Eurosurveillance, 19(13): [on line], 2014.

VEGA-RÚA A. et. al. **High level of vector competence of Aedes aegypti and Aedes albopictus from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus.** J Virol., 88(11): 6294-306, 2014.

VALLE, D; PIMENTA, DN; AGUIAR, R. **Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões.** Epidemiol. Serv. Saúde, 25: 419-422, 2016.

COLÓN-GONZÁLEZ, FJ et al. **After the epidemic: Zika virus projections for Latin America and the Caribbean.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 10: 1-19, 2017.

EASTWOOD, G et al. **Enzootic Circulation of Chikungunya Virus in East Africa: Serological Evidence in Non-human Kenyan Primates.** Am. J. Trop. Med. Hyg., 97(5): 1399-1404, 2017.

TAMBO, E et al. **Ethical, legal and societal considerations on Zika virus epidemics complications in scaling-up prevention and control strategies.** Ethics, and Humanities in Medicine, 12(3): 1-8, 2017.

GÖERTZ, GP et al. **Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of Aedes aegypti.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 10: 1-22, 2017.

MURRAY, KO et al. **Prolonged detection of Zika virus in vaginal secretions and whole blood.** Emerging Infectious Diseases, 23(1): 99-101, 2017.

BHATT, S et al. **The global distribution and burden of dengue.** Nature, 469: 504-507, 2013.

CORREIA, T. C. et al. **Prevalência de dengue clássica e dengue hemorrágica no Brasil, entre 2011 e 2015.** REAS/EJCH, Vol. Sup. 22, 2019. e753, DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e753.2019>

BRADY, O. **Disease risk: mapping the emerging burden of dengue.** Epidemiology and global health, 2019 (eLife 2019;8:e47458 doi: 10.7554/eLife.47458).

GODAERT, L et al. **Screening for Chikungunya virus infection in aged people: Development and internal validation of a new score.** PLOS ONE, 10.1371: 1-9, 2017.

SILVA, MR et al. **Suppression of chikungunya virus replication and differential innate responses of human peripheral blood mononuclear cells during coinfection with dengue virus.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 10: 1-15, 2017.

MOORE, CA et al. **Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians.** JAMA Pediatrics, 171(3): 288-295, 2017.

MALTA, JMAS et al. **Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015.** Epidemiol Serv Saúde, 26(1): 9-18, 2017.

GIRY, C et al. **Simultaneous detection of chikungunya virus, dengue virus and human pathogenic Leptospira genomes using a multiplex TaqMan® assay.** BMC Microbiology, 17(105): 1019-1030, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Dengue : diagnóstico e manejo clínico : adulto e criança [recurso eletrônico]** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 5. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/14/dengue-manejo-adulto-crianca-5d.pdf>. Acessado no dia 17/08/2019.

VITA, W. P. et al. **Dengue: alertas clínicos e laboratoriais da evolução grave da doença.** Rev Bras Clin Med, 2009;7:11-14

WOROBAY, M. Molecular mapping of Zika spread. Nature, 546: 355-356, 2017.

SĄCZYŃSKA, V et al. **Production of highly and broad-range specific monoclonal antibodies against hemagglutinin of H5-subtype avian influenza viruses and their differentiation by mass spectrometry.** Virology Journal, 15(13): 1-13, 2018.

GAO, D; CAZARES, LH; FISH, EN. **CCL5-CCR5 interactions modulate metabolic events during tumor onset to promote tumorigenesis.** BMC Cancer, 17(834): 1-13, 2017.

KAN, F et al. **Proteomic and transcriptomic studies of HBV-associated liver fibrosis of an AAVHBV- infected mouse model.** BMC Genomics, 18(641): 1-16, 2017.

CLAUS, C; LIEBERT, UG. **A renewed focus on the interplay between viruses and mitochondrial metabolism.** Arch Virol, 159: 1267–1277, 2014.

PASSOS-CASTILHO, AM et al. **Plasma Lipidomic Fingerprinting to Distinguish among Hepatitis C-related Hepatocellular Carcinoma, Liver Cirrhosis, and Chronic Hepatitis C**

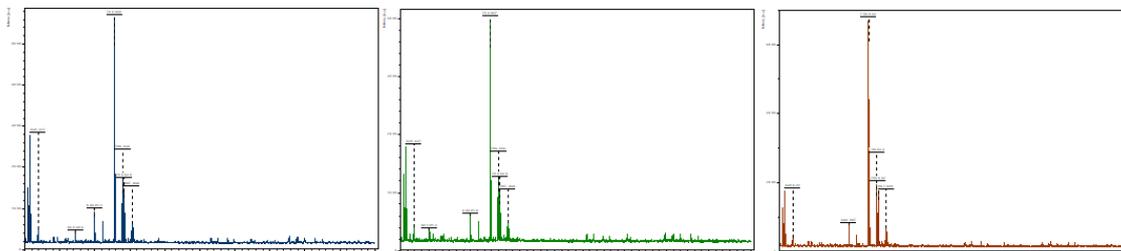
**using MALDI-TOF Mass Spectrometry: a Pilot Stud.** J Gastrointestin Liver Dis, 24(1): 43-49, 2015.

KLITZKE, CF. **Aplicações da espectrometria de massas de altíssima resolução e da mobilidade iônica acoplada à espectrometria de massas em estudos de geoquímica orgânica.** Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade de Campinas, 2012.

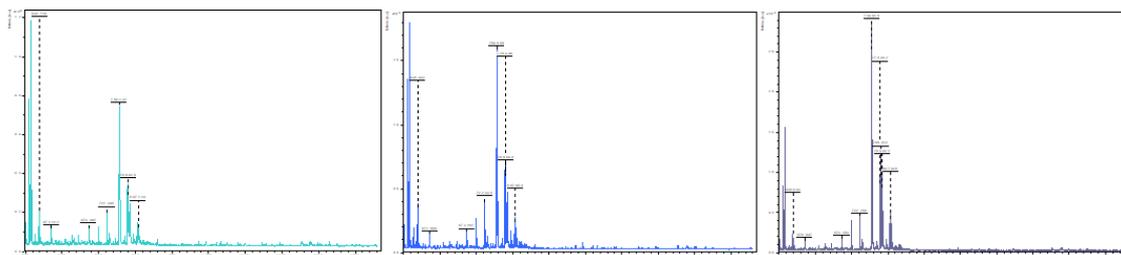
## APÊNDICE

### 1. GRÁFICOS DOS RESULTADOS DA ANÁLISE DO MÉTODO

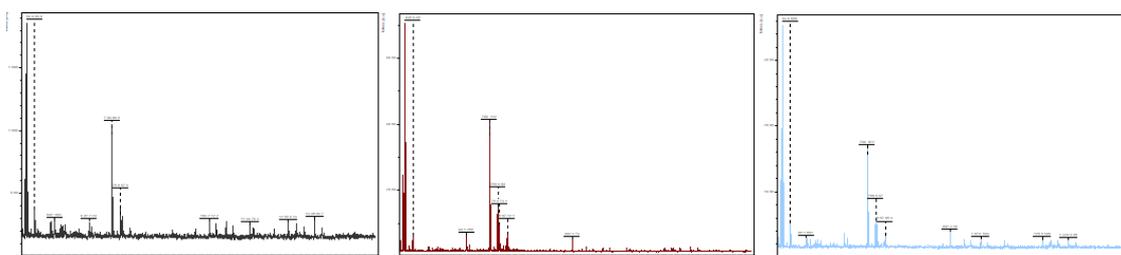
#### BD DHB 60% 1MI



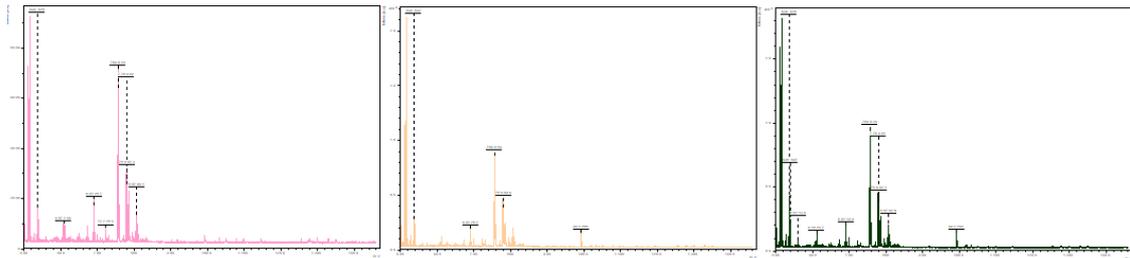
#### BD DHB 70% 1MI



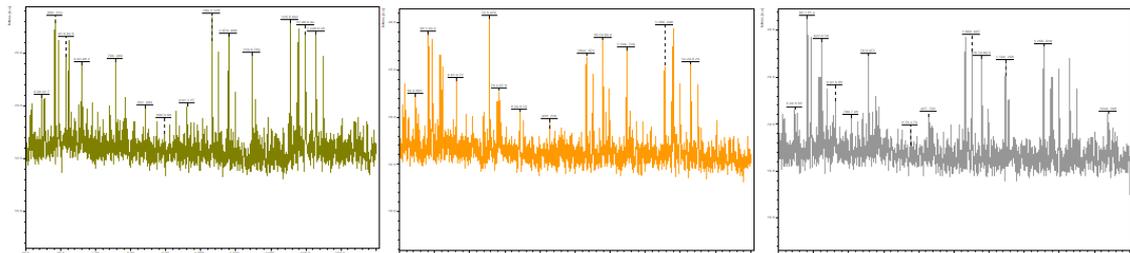
#### BD CIANO 60% 1MI



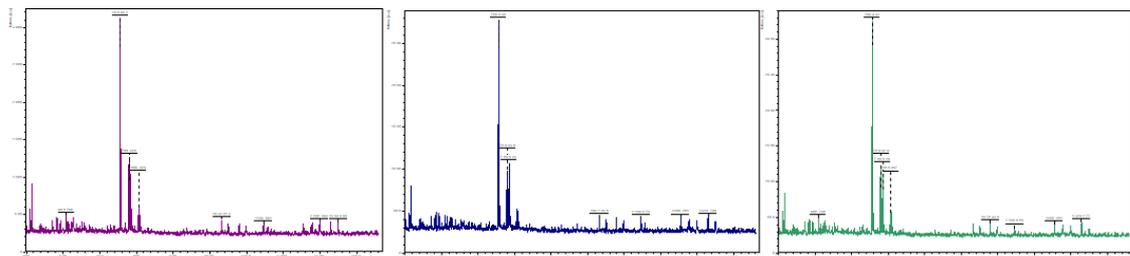
**BD CIANO 70% 1MI**



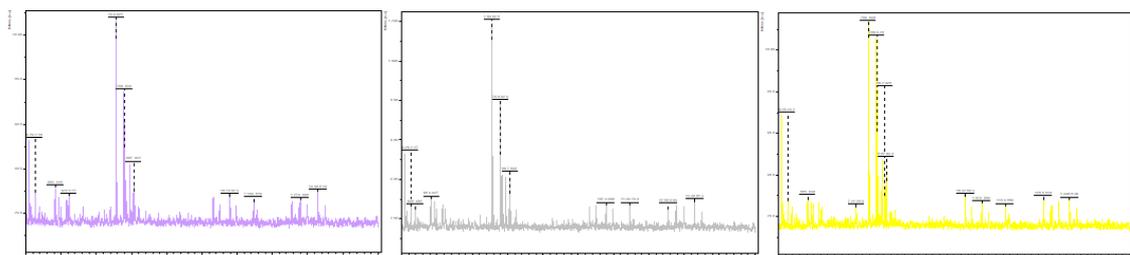
**BD AMC 60% 1MI**



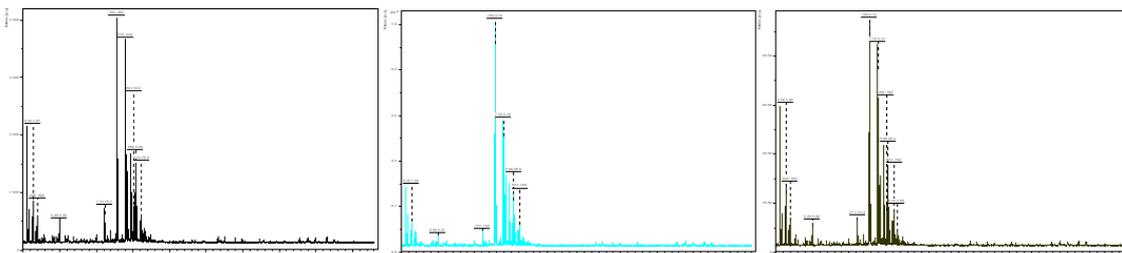
**BD AMC 70% 1MI**



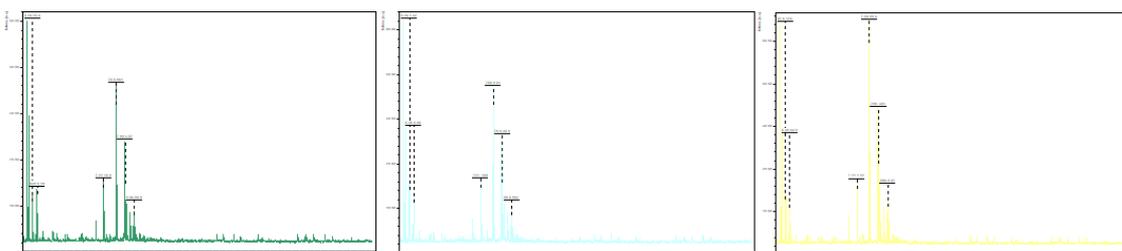
**BD ATF 60% 1MI**



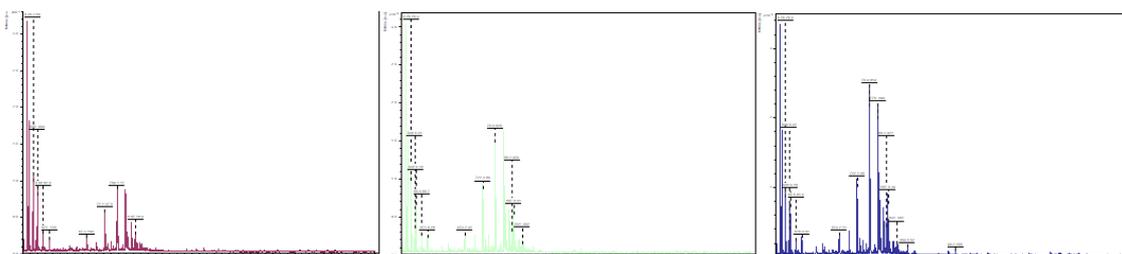
**BD ATF 70% 1MI**



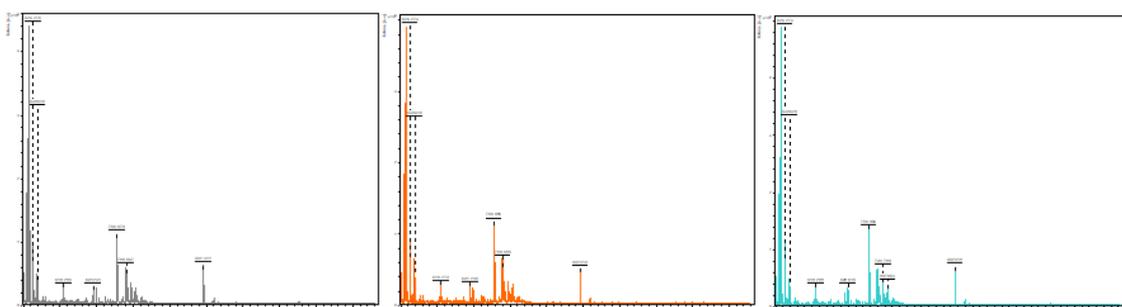
**MTBE DHB 60% 1MI**



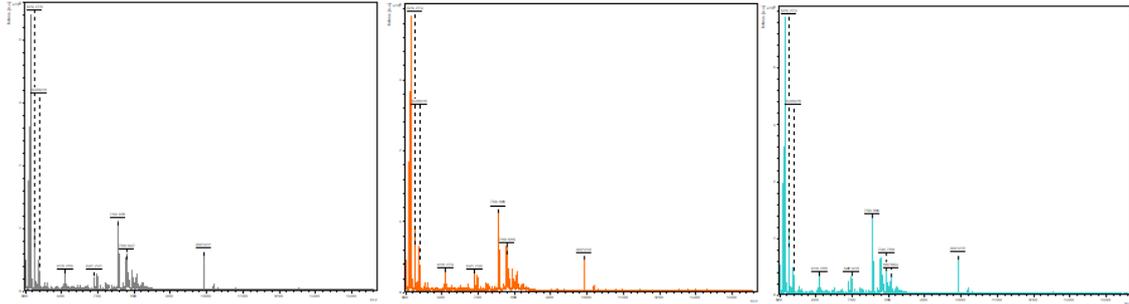
**MTBE DHB 70% 1MI**



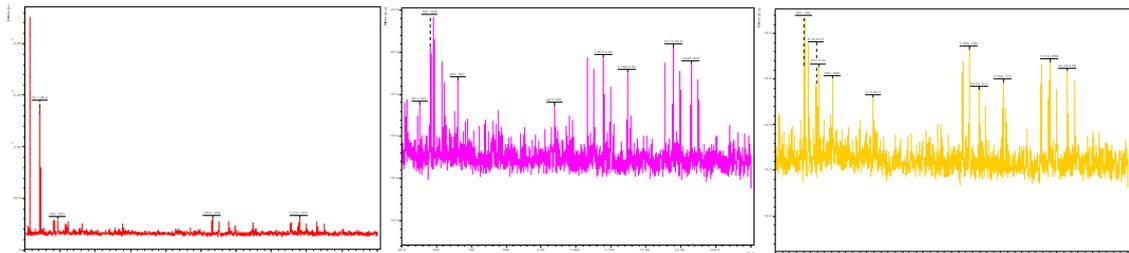
**MTBE CIANO 60% 1MI**



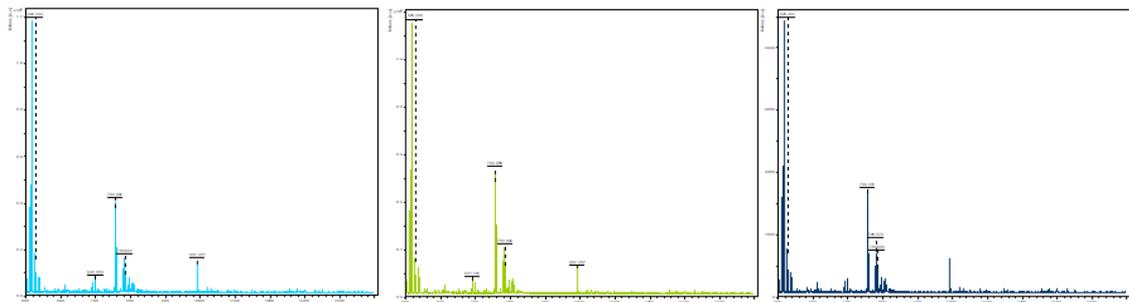
**MTBE CIANO 70% 1MI**



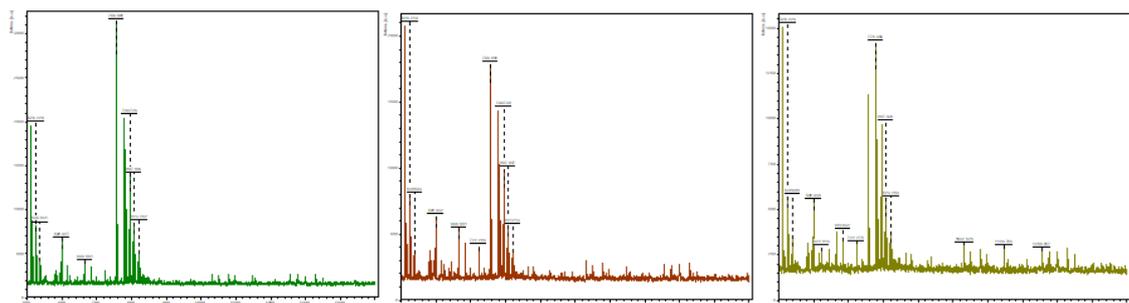
**MTBE AMC 60% 1MI**



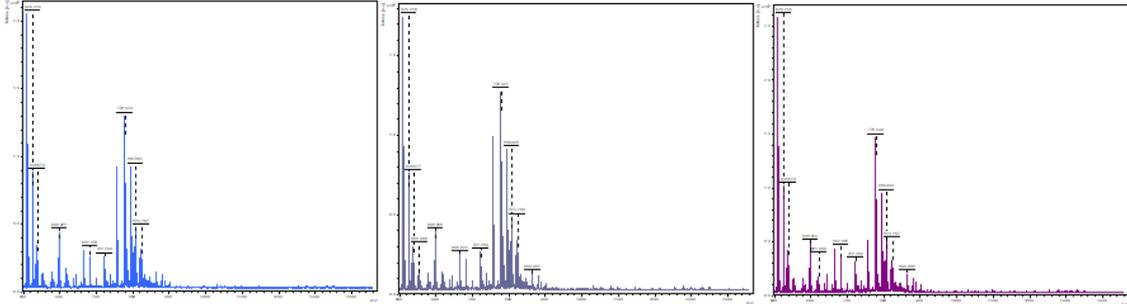
**MTBE AMC 70% 1MI**



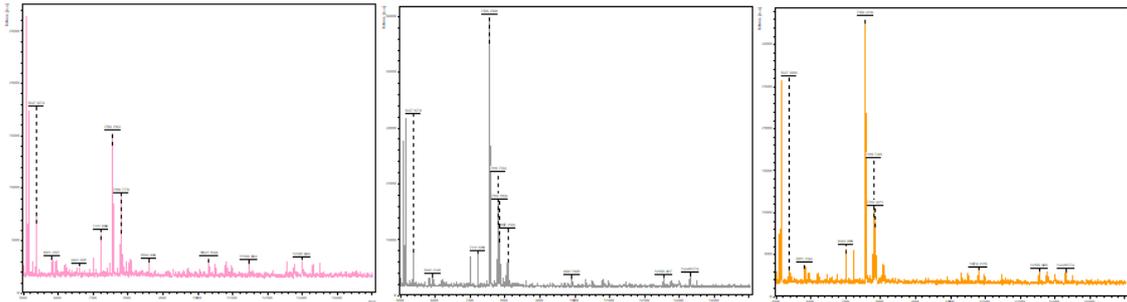
**MTBE ATF 60% 1MI**



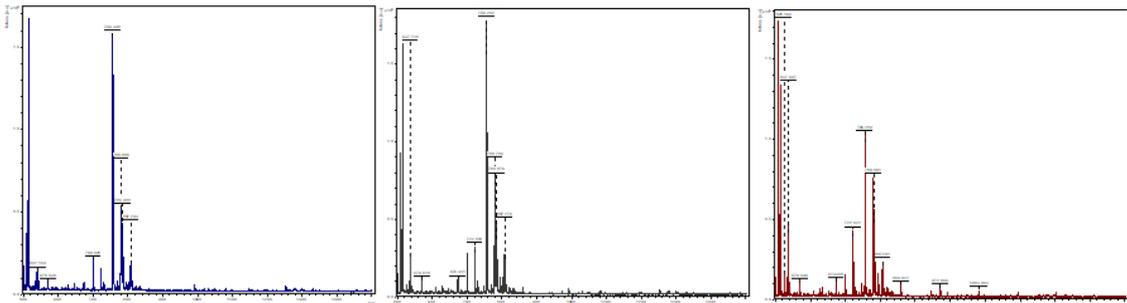
**MTBE ATF 70% 1MI**



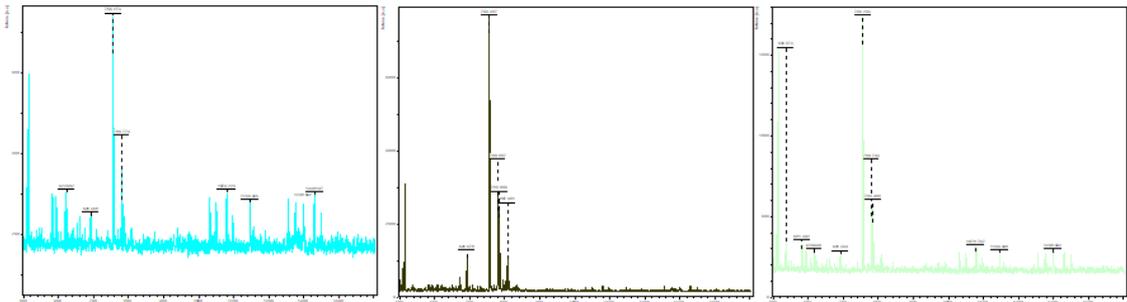
**DB DHB 60% 0.5MI**



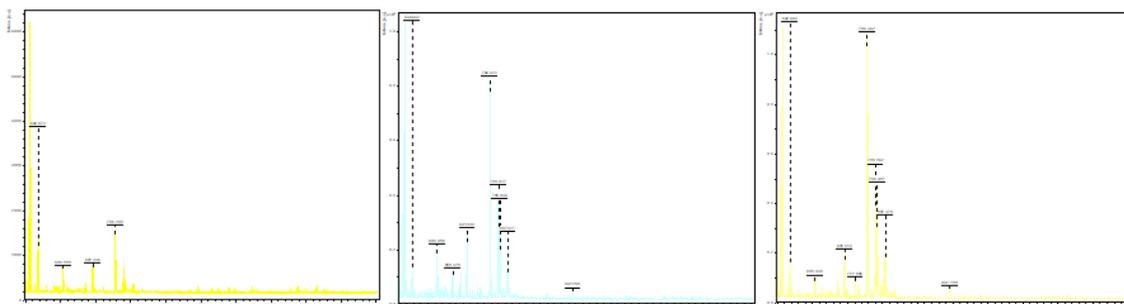
**BD DHB 70% 0.5MI**



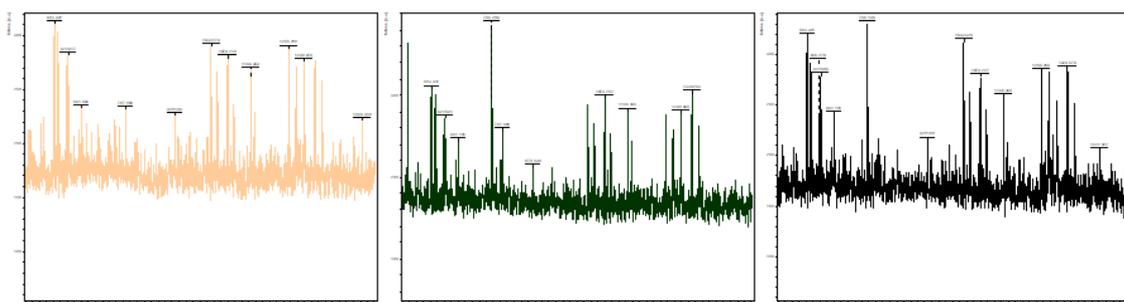
**BD CIANO 60% 0.5MI**



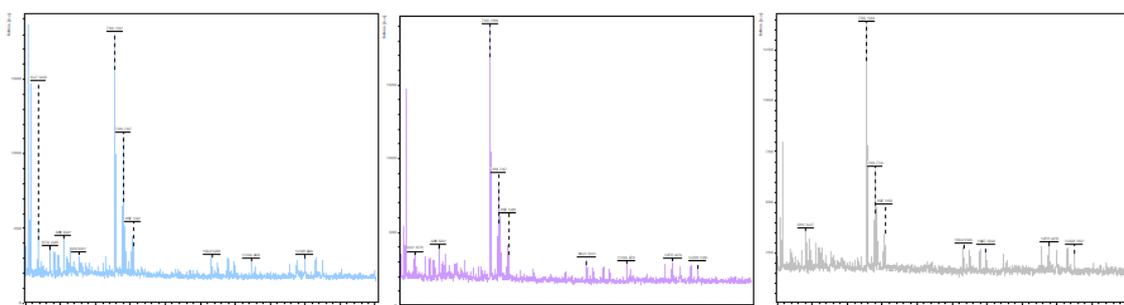
**BD CIANO 70% 0.5MI**



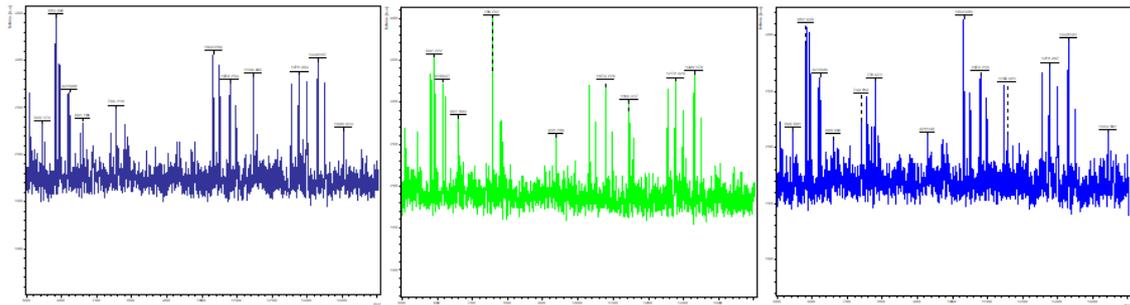
**BD AMC 60% 0.5MI**



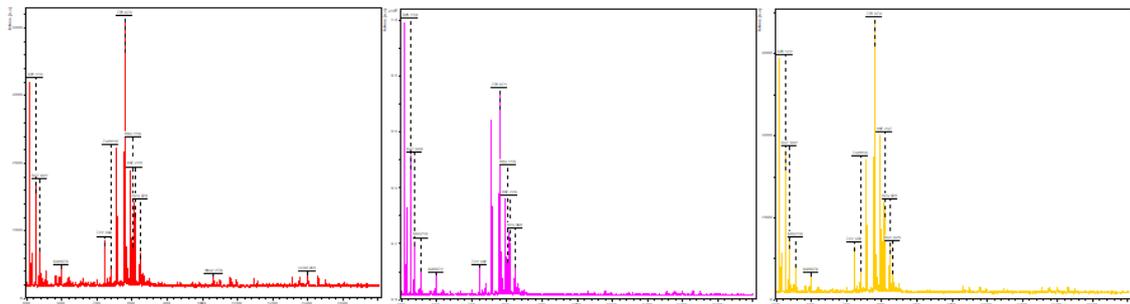
**BD AMC 70% 0.5MI**



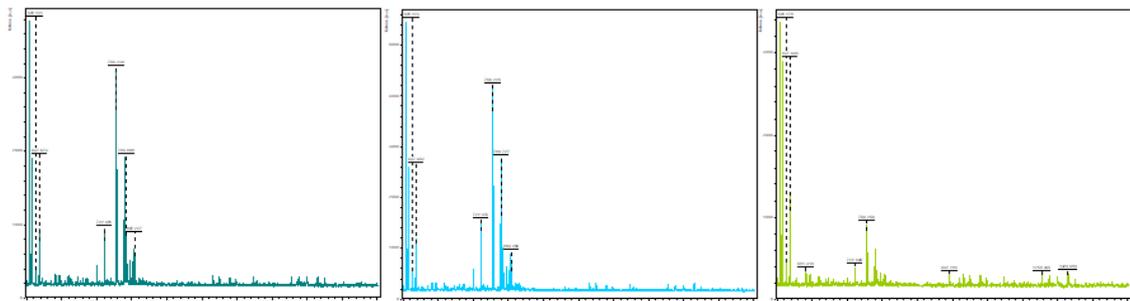
**BD ATF 60% 0.5MI**



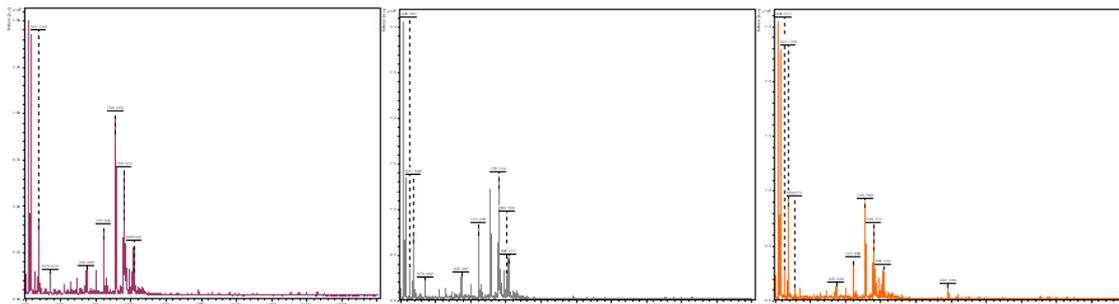
**BD ATF 70% 0.5MI**



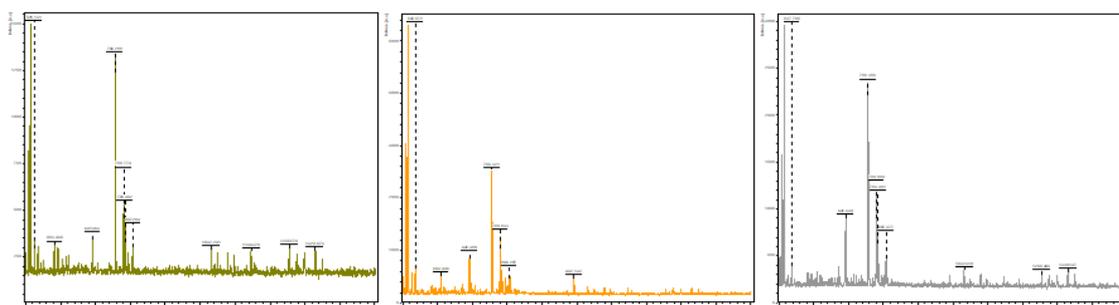
**MTBE DHB 60% 0.5MI**



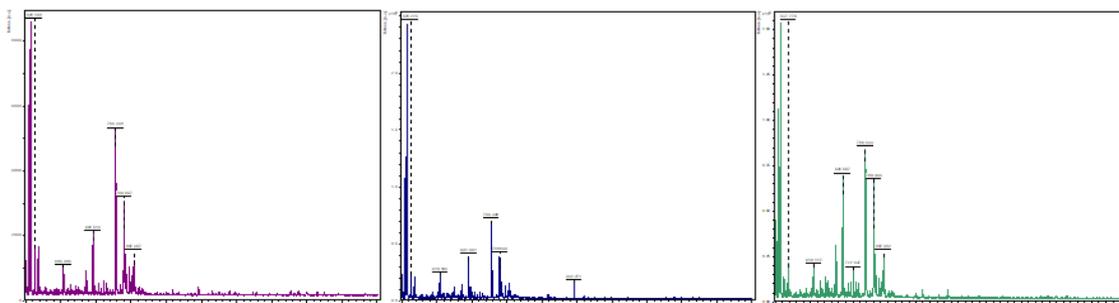
**MTBE DHB 70% 0.5MI**



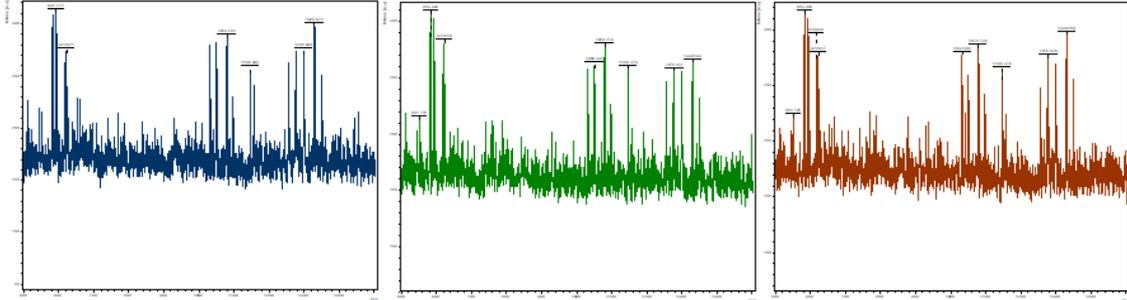
**MTBE CIANO 60% 0.5MI**



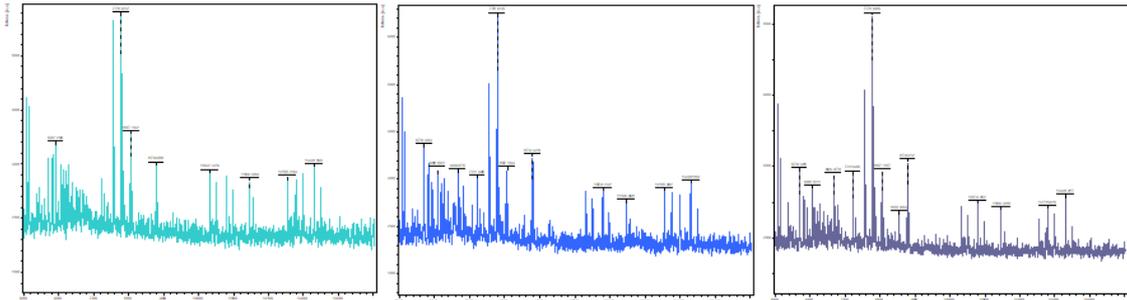
**MTBE CIANO 70% 0.5MI**



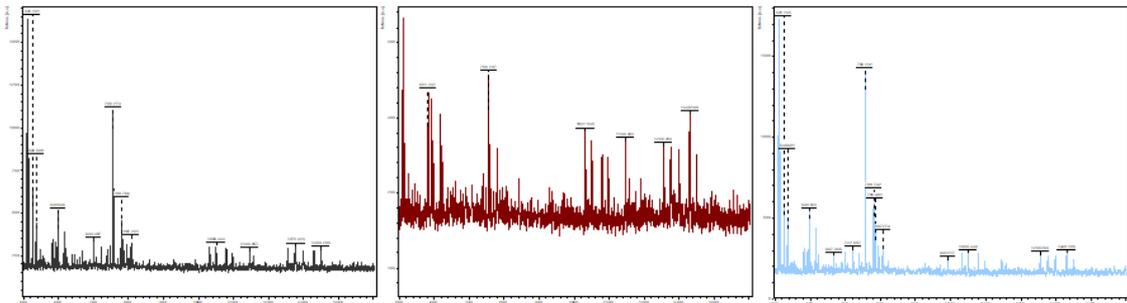
**MTBE AMC 60% 0.5MI**



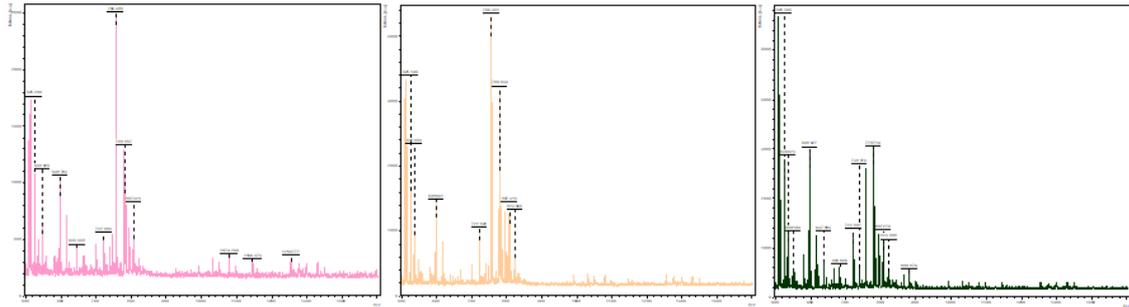
**MTBE AMC 70% 0.5MI**



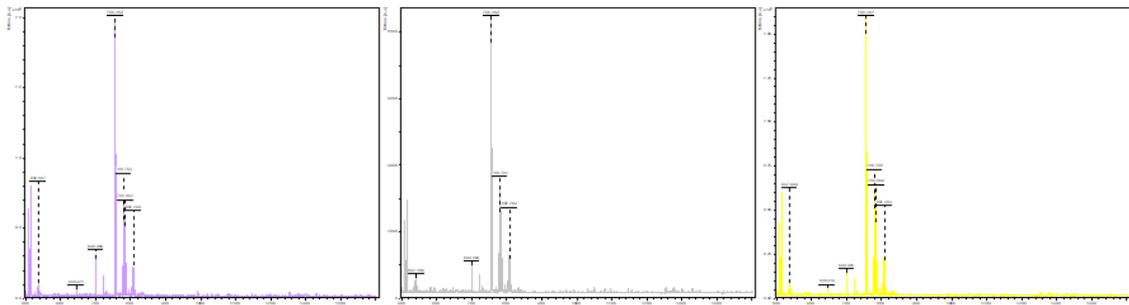
**MTBE ATF 60% 0.5MI**



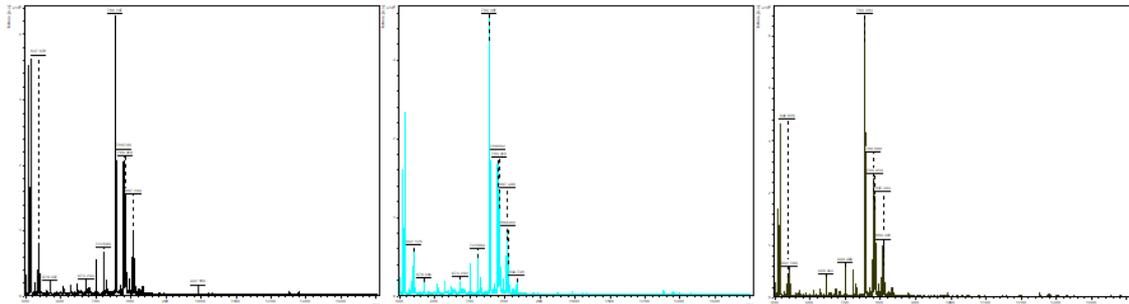
**MTBE ATF 70% 0.5MI**



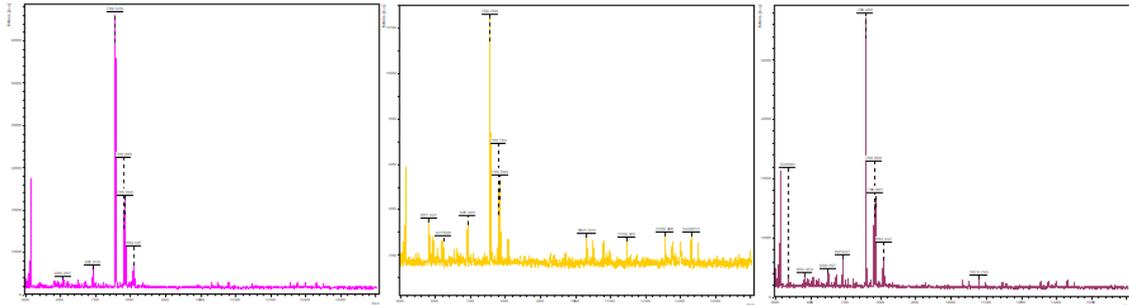
**DB DHB 60% 1.5MI**



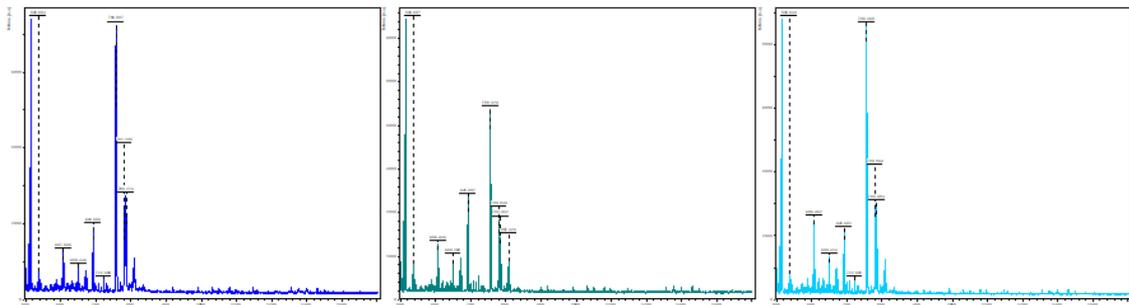
**DB DHB 70% 1.5MI**



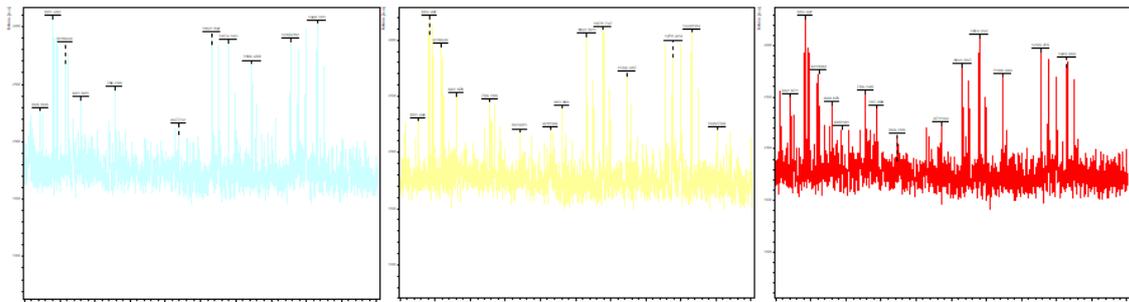
**DB CIANO 60% 1.5MI**



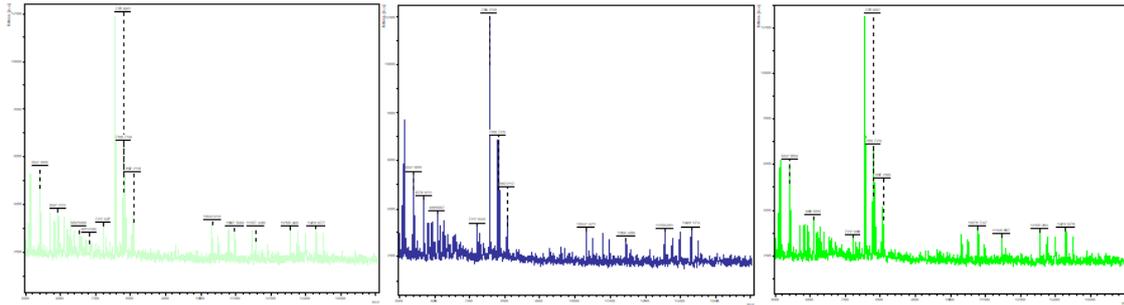
**DB CIANO 70% 1,5MI**



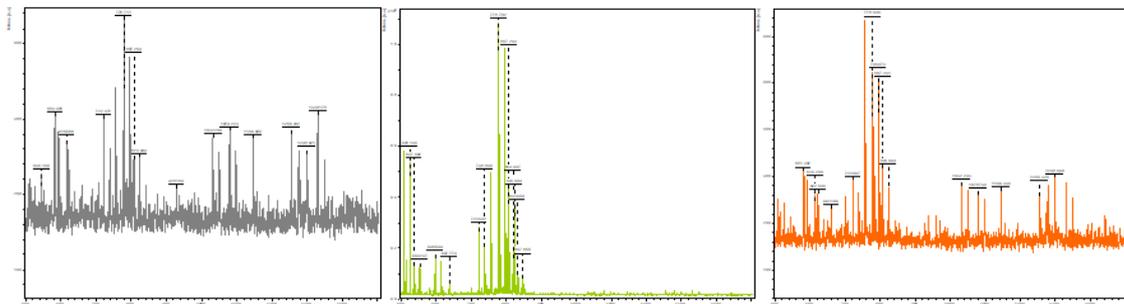
**DB AMC 60% 1.5MI**



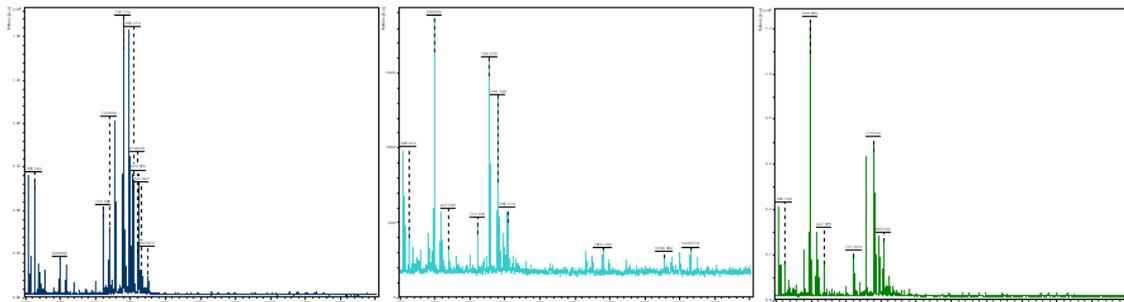
**DB AMC 70% 1.5MI**



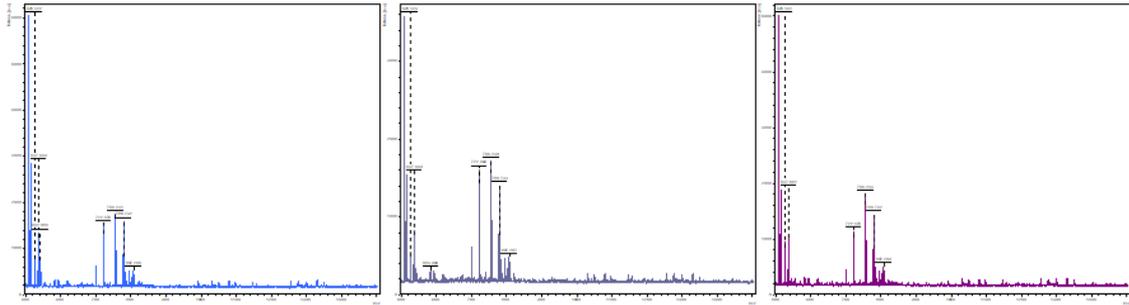
**DB ATF 60% 1.5MI**



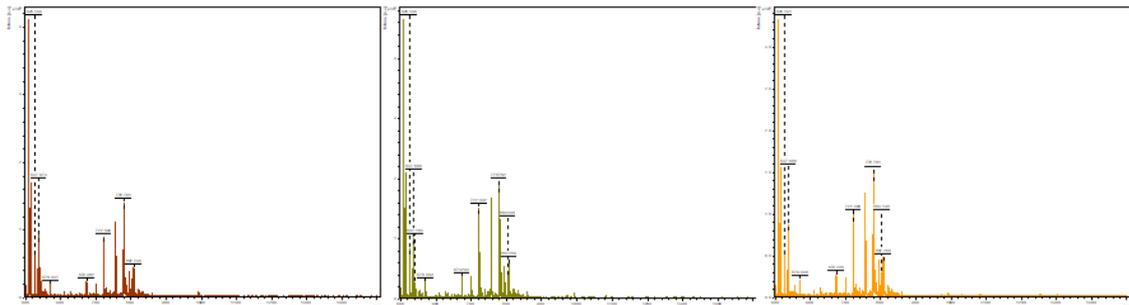
**DB ATF 70% 1.5MI**



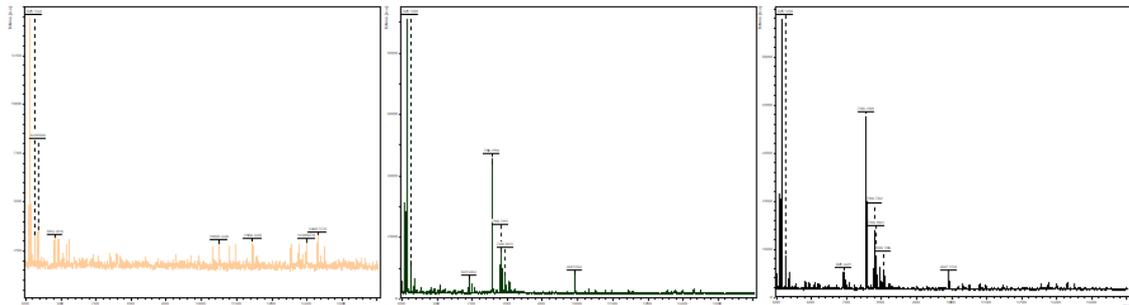
**MTBE DHB 60% 1.5MI**



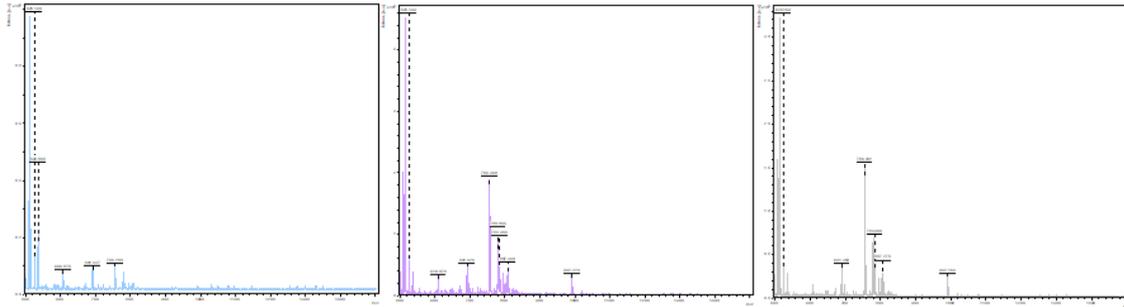
**MTBE DHB 70% 1.5MI**



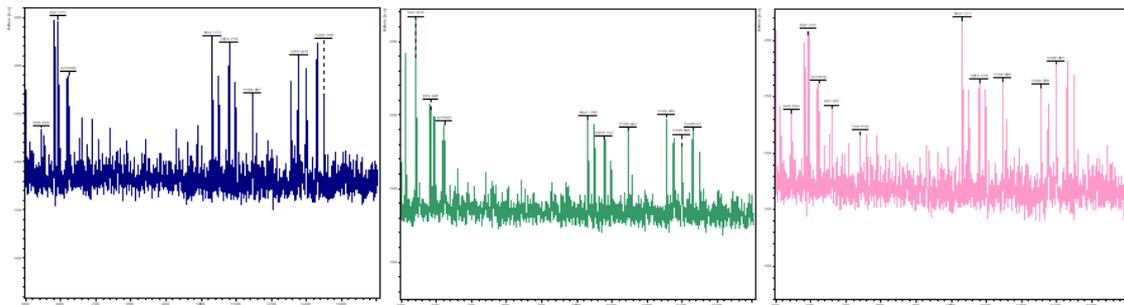
**MTBE CIANO 60% 1.5MI**



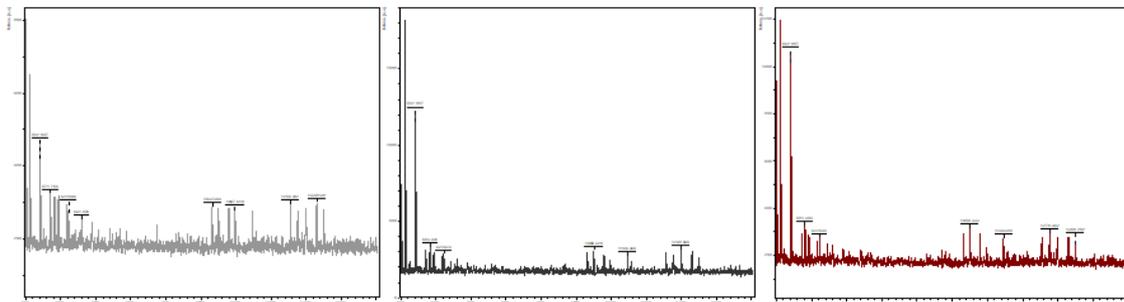
**MTBE CIANO 70% 1.5MI**



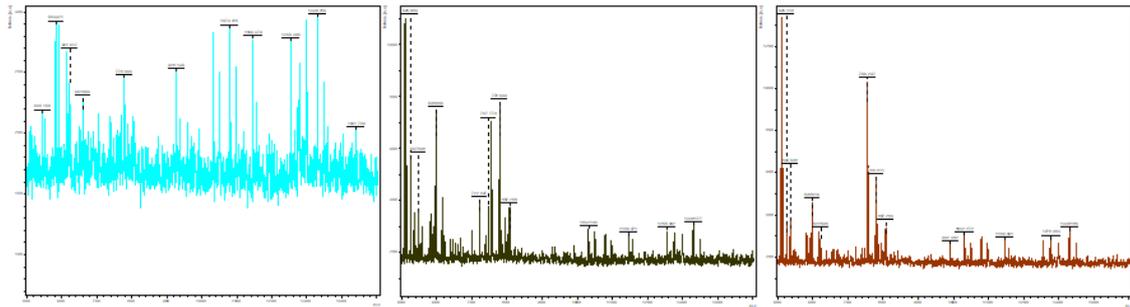
**MTBE AMC 60% 1.5MI**



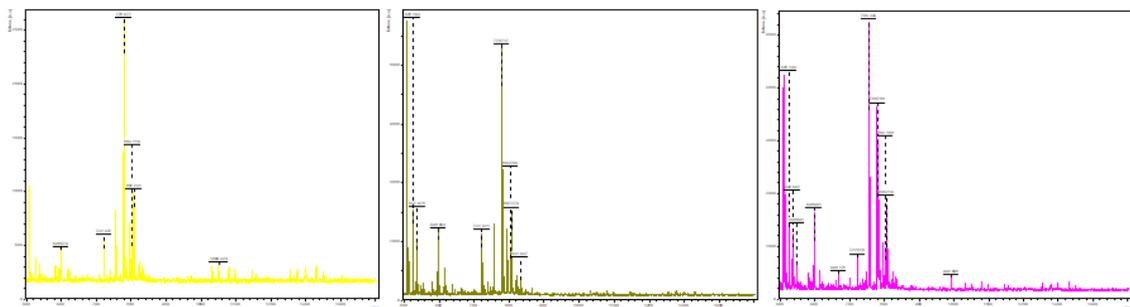
**MTBE AMC 70% 1.5MI**



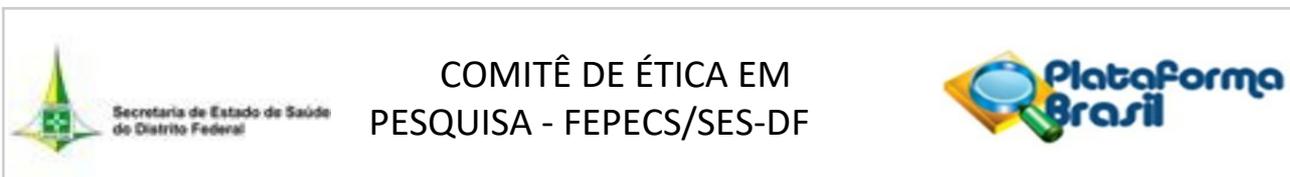
**MTBE ATF 60% 1.5MI**



**MTBE ATF 70% 1.5MI**



## 2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA:



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise dos fatores desencadeantes da Síndrome de Guillain-Barré em pacientes atendidos em um hospital terciário do Distrito Federal

**Pesquisador:** CARLOS BERNARDO TAUIL

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 36249214.0.0000.5553

**Instituição Proponente:** DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE SAUDE

**Patrocinador Principal:** Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 820.084

**Data da Relatoria:** 06/10/2014

#### Apresentação do Projeto:

A síndrome de Guillain-Barré (SGB) consiste em polirradiculoneurite aguda caracterizada por paresia progressiva simétrica, bilateral e ascendente, acompanhada de hiporreflexia ou arreflexia, além de alterações sensitivas leves ou ausentes, que perdura quatro semanas<sup>1</sup>. É a maior causa de paralisia flácida generalizada no mundo, com incidência média anual de 1-4 por cem mil habitantes, em idade média de 20- 40 anos<sup>2</sup>, sendo que a

relação entre os gêneros demonstra presença da SGB em três homens para cada duas mulheres<sup>1</sup>. Em solo brasileiro, a incidência anual estimada é de 0,6 casos por cem mil habitantes<sup>3</sup> e a mortalidade da SGB varia entre 4,9% e 7,4%, de acordo com a apresentação inicial da doença<sup>4</sup>. A síndrome é frequentemente associada a infecções precedentes, principalmente por *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*,

cytomegalovírus e vírus Epstein-Barr. Além disso, são reportadas após vacinas para tétano, hepatite e influenza<sup>1</sup>. Há associação ainda com a idade e região, tal como a recente descoberta no Brasil da relação entre a infecção pelo vírus da Dengue e a SGB<sup>4</sup>. A sazonalidade é relevante no estudo epidemiológico da SGB, constatando-se maior incidência no inverno (40,6%) e outono (20,8%), o que se correlaciona com uma maior taxa de infecções de vias aéreas superiores, sendo esta o principal fator antecedente da síndrome (37,7%)<sup>5</sup>. O pródromo relaciona-se a sintomas gerais e inespecíficos como febre, tosse, dor de garganta, sintomas gastrintestinais<sup>1</sup>. Estudos sobre a evolução e prognóstico da doença

mostram que após um ano do aparecimento dos primeiros sintomas 81% dos pacientes recuperam-se completamente ou com mínimos déficits neurológicos<sup>5</sup>. No Brasil, apesar de poucas pesquisas sobre o tema, um estudo mostrou que a média de tempo em que os pacientes permanecem hospitalizados é de 31,04 dias, enquanto que a média temporal para recuperação da função motora e deambulação é de 73,14 dias<sup>4</sup>. As principais sequelas observadas são déficits motores, podendo surgir demais alterações neurológicas, como disfunções sensoriais e autonômicas<sup>4</sup>. Tais sequelas se relacionam a condições como o estado do paciente no momento da admissão, a idade, a necessidade de ventilação mecânica e lesão axonal do sistema nervoso central<sup>5</sup>. Tendo em vista a relevância do tema, com sua crescente incidência em adultos jovens e escassos estudos quantitativos realizados no Brasil e, principalmente, no Distrito Federal, justifica-se o presente estudo.

### Objetivo da Pesquisa:

#### Objetivo Primário:

Analisar os fatores desencadeantes da Síndrome de Guillain-Barré (SGB) nos pacientes atendidos no HBDF entre 2010 e 2014.

#### Objetivo Secundário:

Descrever o perfil prodromático dos pacientes atendidos no Hospital de Base do Distrito Federal com base na sazonalidade; Correlacionar os fatores desencadeantes com os dados epidemiológicos dos pacientes com síndrome de Guillain-Barré (SGB); Identificar os agentes etiológicos mais comuns que desencadearam a SGB; Relacionar os agentes etiológicos desencadeadores com o prognóstico dos pacientes com SGB;

Analisar o intervalo de tempo entre a infecção prévia e o início do quadro sintomático de SGB.

### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

#### Riscos:

Não há riscos aparentes para a realização do trabalho. Benefícios:

Esse estudo visa contribuir para melhora do conhecimento dos fatores desencadeantes e aspectos epidemiológicos acerca da síndrome de Guillain-Barré, uma que há escassa literatura sobre o assunto. O pesquisador apresenta um Termo de Consentimento de Uso Banco de Dados que minimiza a afirmação do Risco, recomendando a leitura da Resolução CNS/MS 466/2012 (que substituiu a Resolução CNS/MS 196/96).

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo transversal retrospectivo e quantitativo com pacientes diagnosticados com SGB atendidos na unidade de neurologia do HBDF, localizado em Brasília-DF, Brasil, no período de 2010 a 2014, com amostra estimada de 50 pacientes. O estudo prevê aprovação do comitê de ética e pesquisa da FEPECS da SES-DF e dispensa de assinatura do termo de consentimento informado pelo paciente pela natureza não interventiva. Serão coletados e analisados os dados relativos aos eventos e sintomas que precederam a SGB a partir dos prontuários físicos e eletrônicos, além de possíveis chamadas telefônicas, para posterior correlação com sazonalidade,

identificação dos possíveis agentes etiológicos com base na epidemiologia e análise dos prognósticos relacionados a cada evento prodrômico. A análise estatística será realizada através do software Statistical Package for Social Science 20.0 (SPSS 20.0).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os Termos de Apresentação Obrigatória foram analisados e considerados adequados

Recomendações:

Apresentar Relatório de acordo com o desenvolvimento da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 06 de Outubro  
de 2014

---

Assinado por:

**LUIZ FERNANDO GALVÃO SALINA**

