

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS
INSTITUTO DO CÉREBRO DO RIO GRANDE DO SUL

RACHEL DIAS MOLINA

**COMPLICAÇÕES NEUROIMUNOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INFECÇÃO POR
ARBOVÍRUS (ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA)**

PORTO ALEGRE
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

RACHEL DIAS MOLINA

**COMPLICAÇÕES NEUROIMUNOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INFECÇÃO POR
ARBOVÍRUS (ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA)**

Tese defendida como requisito para obtenção
do grau de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Medicina e Ciências da Saúde
da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Douglas Kazutoshi Sato

Porto Alegre

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, que transforma os caminhos e guia a quem nele confia.

Ao Prof. Dr. Douglas Kazutoshi Sato, pela oportunidade a mim concedida, pela inspiração em trilhar o caminho da pesquisa, pelos ensinamentos e contribuição de experiência que me fizeram crescer nestes três anos de trabalho.

A Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado, pelos diversos ensinamentos durante os seis anos de pesquisa no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, apoio incansável, transmissão de conhecimentos, aos conselhos nos momentos de tristeza, a calma nos momentos de desespero/ansiedade, a preocupação quando algo não saia como o planejado e, principalmente, pela grande amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela possibilidade de integrar o grupo de alunos e aprender com seus professores.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro em forma de bolsa integral de estudos.

Aos responsáveis pelos centros colaboradores Profa. Dra. Maria Lúcia Brito Ferreira, Prof. Dr. Osvaldo José Moreira do Nascimento, Prof. Dra. Fernanda Martins Maia e Prof. Dr. Luis Edmundo Teixeira de Arruda Furtado que nos enviaram as amostras.

A toda equipe da EUROIMMUN, por terem me recebido no seu laboratório de pesquisa e por fornecerem os kits utilizados neste estudo.

A Dra. Fernanda Majolo, pelas contribuições e sugestões que ajudaram a melhorar esta tese.

Ao Dr. Lucas Piccoli Conzatti, pela contribuição na parte das análises dos resultados.

Aos colegas de laboratório Fernanda Majolo, Ana Paula Bornes da Silva, Gabriela Urbanski Ávila, Amanda Marchionatti, Laura Siqueira e Fernando Xavier, pelas contribuições em vários momentos destes seis anos no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pelo suporte psicológico quando nada fazia sentido, pelos momentos de aprendizagem, de confraternização, risadas, brincadeiras e, principalmente, por me mostrarem que um simples sorriso pode fazer toda a diferença em um dia ruim.

Aos meus pais, Homero e Simone, que me ensinaram conceitos fundamentais de força, trabalho, paciência e honestidade, e que sempre estiveram ao meu lado a despeito da distância, das saudades, dos momentos de tristeza e felicidade.

Ao meu irmão, Guilherme Dias Molina, amigo e companheiro nos momentos de alegria e adversidades.

A todos, o meu muito obrigada.

RESUMO

Os mosquitos do gênero *Aedes*, endêmico em todo o Brasil, são os transmissores dos vírus da Zika (ZIKV), Dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV). Esses vírus são os causadores de doenças infecciosas virais que podem apresentar diferentes quadros clínicos, e em alguns casos, geram consequências graves para a saúde, incluindo complicações neurológicas com grande risco de sequelas permanentes. Em uma parcela dos pacientes, acredita-se que o vírus pode desencadear reações imunes que resultariam em doenças inflamatórias agudas tanto do sistema nervoso central (SNC) quanto do sistema nervoso periférico (SNP). Dentre elas, encefalomielite disseminada aguda (ADEM), distúrbio do espectro da neuromielite óptica (NMOSD), neurites ópticas, mielites transversas, síndrome de Guillain-Barré (SGB) e a polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP). No entanto, a relação entre a infecção viral e o risco de desenvolvimento destas doenças é pouco compreendida. O presente estudo teve como objetivo investigar as complicações neuroimunológicas secundárias à infecção por arbovírus (Zika, Dengue e Chikungunya) no soro de pacientes infectados. Noventa e oito amostras de soro coletadas no Nordeste e Sudeste do Brasil foram analisadas através de técnicas imunoenzimáticas e de imunofluorescência indireta para verificar a positividade das arboviroses. Testes de detecção de autoanticorpos anti-gangliosídeos, anti-aquaporina-4 (anti-AQP4) e anti-glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos (anti-MOG) foram realizados por meio de *immunoblotting* e pelo ensaio baseado em células (CBA). Do total de amostras testadas, 77 foram positivas para detecção de DENV e ZIKV, e 52 foram positivas para detecção de CHIKV. Devido ao tempo decorrido entre o início dos sintomas clínicos até a realização da coleta, a maioria dos pacientes já estavam num período convalescente da infecção demonstrando um status sorológico IgM negativo. Os autoanticorpos anti-AQP4 foram negativos para todas as amostras, e somente duas foram positivas para autoanticorpos anti-MOG. Os autoanticorpos anti-gangliosídeos IgG foram negativos para todas as amostras, e os IgM tiveram uma reação fraca (*borderline*) para 8 amostras. O sintoma viral mais relatado foi febre (20,7%) e o sintoma neurológico, foi déficit motor (32,1%). A SGB e suas variantes foram as neuropatias mais encontradas nos pacientes poliflavivírus reativos. Já CIDP, polineuropatia aguda e mononeurite foram as outras neuropatias mais encontradas nos pacientes alphavírus reativos. Em conjunto, estes dados contribuem para que não somente a SGB seja associada às infecções por arbovírus, mas também outras doenças neurológicas. É de fundamental importância investigar a amplitude de outras síndromes, como mielopatia, CIDP, encefalite, ADEM, NMOSD e neurite óptica que podem estar associadas às infecções pelo ZIKV, DENV e CHIKV.

Palavras-chave: Vírus da Zika, Vírus da Chikungunya, Vírus da Dengue, autoanticorpos, doenças infecciosas, arboviroses, síndromes neurológicas.

ABSTRACT

Mosquitoes of the genus *Aedes*, endemic throughout Brazil, are the transmitters of the Zika (ZIKV), Dengue (DENV) and Chikungunya (CHIKV) viruses. These viruses are the cause of viral infectious diseases that can present different clinical conditions, and in some cases have serious health consequences, including neurological complications with a high risk of permanent sequelae. In a portion of patients, it is believed that the virus can trigger immune reactions that would result in acute inflammatory diseases of both the central nervous system (CNS) and the peripheral nervous system (PNS). Among them, acute disseminated encephalomyelitis (ADEM), spectrum disorder of optic neuromyelitis (NMOSD), optic neuritis, transverse myelitis, Guillain-Barré syndrome (GBS) and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). However, the relationship between viral infection and the risk of developing these diseases is poorly understood. The present study aimed to investigate the neuroimmunological complications secondary to arbovirus infection (Zika, Dengue and Chikungunya) in the serum of infected patients. Ninety eight serum samples collected in the Northeast and Southeast of Brazil were analyzed by immunoenzymatic and indirect immunofluorescence techniques to verify the positivity of arboviruses. Autoantibodies against gangliosides, aquaporin-4 (AQP4) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) were detected by *immunoblotting* and cell-based assay (CBA). Of the total samples tested, 77 were positive for DENV and ZIKV detection, and 52 were positive for CHIKV detection. Due to the time elapsed between the beginning of the clinical symptoms until the collection, the majority of the patients were already in a convalescent period of the infection demonstrating a negative IgM serological status. Anti-AQP4 autoantibodies were negative for all samples, and only two were positive for anti-MOG autoantibodies. IgG anti-ganglioside autoantibodies were negative for all samples, and IgM had a weak (borderline) reaction for 8 samples. The most reported viral symptom was fever (20.7%), and the neurological symptom was motor deficit (32.1%). GBS and its variants were the neuropathies most found in reactive polyflaviviruses. Already, CIDP, acute polyneuropathy and mononeuritis were the others neuropathies most found in reactive alphavirus patients. Together, these data contribute to clarify the fact that not only the GBS is associated with arbovirus infections, but also other neurological diseases. It is of fundamental importance to investigate the amplitude of other syndromes, such as myelopathy, CIDP, encephalitis, ADEM, NMOSD and optic neuritis, which may be associated with ZIKV, DENV and CHIKV infections.

Keywords: Zika virus, Chikungunya virus, Dengue virus, autoantibodies, infectious diseases, arboviruses, neurological syndromes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição global dos casos de exposição ao vírus da Zika, Dengue e Chikungunya por países.....	17
Figura 2. Estrutura do vírus da Zika.....	19
Figura 3. Casos reportados de infecção pelo vírus da Zika no Brasil em 2014, 2015 e 2016.....	21
Figura 4. Estrutura do vírus da Chikungunya.....	24
Figura 5. Fotografia dos vetores transmissores dos vírus da Zika, Dengue e Chikungunya.....	26
Figura 6. Métodos laboratoriais diretos e indiretos para diagnóstico de infecções pelos vírus da Zika, Dengue e Chikungunya.....	27
Figura 7. Ilustração demonstrando o período que os anticorpos IgM e IgG são detectáveis.....	30
Figura 8. Diagrama esquemático dos gangliosídeos aderidos à superfície da membrana plasmática.....	37
Figura 9. Diagrama esquemático da localização da AQP4 nos prolongamentos astrocitários	41
Figura 10. Diagrama esquemático mostrando a localização de MOG no neurônio.....	42
Figura 11. Fluxograma dos experimentos do estudo.....	46
Figura 12. Fluxograma da coleta de sangue e envio das amostras de soro.....	48
Figura 13. Biochip parra identificação dos arbovírus revestidos com substratos do vírus da Zika, Dengue e Chikungunya.....	49
Figura 14. Diagrama esquemático das etapas do método ELISA indireto.....	51
Figura 15. Ilustração do perfil de gangliosídeos analisados neste estudo.....	52
Figura 16. Fotografia e ilustração da técnica baseada em células vivas transfectadas.....	53
Figura 17. Distribuição dos pacientes com complicações neurológicas pós-infecção viral por grupos de idade.....	54

Figura 18. Distribuição dos pacientes com complicações neurológicas pós-infecção viral por cidade onde estão localizados os centros de referência.....	55
Figura 19. Frequência do diagnóstico neurológico do Sistema Nervoso Periférico e Sistema Nervoso Central	56
Figura 20. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos e negativos para o grupo viral Poliflavivírus.....	57
Figura 21. Fotomicrografia da imunofluorescência indireta realizada em paciente CHIKV positivo.....	58
Figura 22. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos e negativos para o grupo viral Alphavírus.....	59
Figura 23. Fotomicrografia da imunofluorescência indireta realizada em paciente DENV positivo.....	60
Figura 24. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos e negativos para o grupo viral Contato com DENV e Sem Contato com ZIKV.....	60
Figura 25. Fotomicrografia da imunofluorescência indireta realizada em paciente ZIKV positivo.....	61
Figura 26. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos e negativos para o grupo viral Contato com ZIKV e Sem Contato com DENV.....	62
Figura 27. Porcentagem de pacientes infectados por arbovírus manifestando neuropatias no Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico	63
Figura 28. Frequência, em porcentagem, do período virológico em que os pacientes se encontravam para cada vírus	64
Figura 29. Distribuição da ordem cronológicas em que ocorreram as infecções por arbovírus.....	65
Figura 30. Fotomicrografia de células HEK-293T evidenciando a ligação dos anticorpos anti-MOG ao antígeno que são expressados na célula.....	66
Figura 31. Figura representativa da detecção de GM3 por <i>immunoblot</i> pelo <i>Software</i> EUROLinScan.....	67
Figura 32. Frequência de neuropatias do Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico em pacientes que tiveram contato com um, dois ou três arbovírus.....	73

Figura 33. Dias decorridos entre o início dos sintomas clínicos sugestivos de arboviroses e a coleta da amostra, início dos sintomas neurológicos e a coleta da amostra e entre o início dos sintomas clínicos sugestivos de arboviroses e início dos sintomas neurológicos.....	74
Figura 34. Distribuição das amostras conforme o título do anticorpo IgG tanto para DENV quanto para ZIKV.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais sintomas clínicos decorrentes das infecções causadas pelos vírus da Zika, Dengue e Chikungunya.....	25
Tabela 2. Principais diferenças entre a Miller-Fisher, AMAN, AMSAN e AIDP.....	34
Tabela 3. Critérios de diagnósticos de NMOSD estabelecidos pelo consenso internacional no ano de 2015.....	40
Tabela 4. Estratificação dos grupos virais.....	57
Tabela 5. Distribuição dos pacientes do grupo viral Poliflavivírus pelos anticorpos IgM e IgG.....	58
Tabela 6. Distribuição dos pacientes do grupo viral Alphavírus pelos anticorpos IgM e IgG.....	59
Tabela 7. Distribuição dos pacientes do grupo viral Contato exclusivo com DENV pelos anticorpos IgM e IgG.....	61
Tabela 8. Distribuição dos pacientes do grupo viral Contato exclusivo com ZIKV pelos anticorpos IgM e IgG.....	62
Tabela 9. Aspectos virais, neurológicos e diagnóstico das amostras positivas para autoanticorpos anti-MOG.....	66
Tabela 10. Valores fornecidos no kit de <i>immunoblot</i> da EUROIMMUN para interpretação dos resultados.....	67
Tabela 11. Sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes em associação à infecção viral.....	68
Tabela 12. Sintomas virais apresentados pelos pacientes infectados com arbovírus.....	69
Tabela 13. Neuropatias identificadas em pacientes atendidos nos quatro centros.....	69
Tabela 14. Sintomas neurológicos manifestados pelos pacientes distribuídos nos respectivos grupos virais.....	70
Tabela 15. Sintomas clínicos manifestados pelos pacientes subdivididos nos grupos virais.....	71

Tabela 16. Diagnóstico neurológico dos pacientes infectados por arbovírus distribuídos nos seus respectivos grupos virais.....	72
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADEM – Encefalomielite Disseminada Aguda (do inglês: *Acute Disseminated Encephalomyelitis*)

AIDP – Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Aguda (do inglês: *Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*)

AMAN – Neuropatia Motora Axonal Aguda (do inglês: *Acute Motor Axonal Neuropathy*)

AMSAN – Neuropatia Motora Axonal Aguda Sensorial (do inglês: *Acute Motor and Sensory Axonal Neuropathy*)

AQP – Aquaporina

AQP4 – Aquaporina-4

BHE – Barreira hematoencefálica

CBA – Ensaio baseado em células vivas transfectadas (do inglês: *Live Cell-Based Assay*)

CDC – Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA

cDNA – DNA complementar

CHIKV – Vírus da Chikungunya

CIDP – Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Crônica (do inglês: *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*)

DENV – Vírus da Dengue

DENV 1 – Vírus da Dengue Tipo 1

DENV 2 – Vírus da Dengue Tipo 2

DENV 3 – Vírus da Dengue Tipo 3

DENV 4 – Vírus da Dengue Tipo 4

DO – Densidade Óptica

EAE – Encefalomielite Experimental Autoimune (do inglês: *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (do inglês: *Ezyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EM – Esclerose Múltipla

HEK – Células Embrionárias de Rim Humano (do inglês: *Human Embryonic Kidney*)

IFI – Imunofluorescência Indireta

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

LCR – Líquido cérebro-raquidiano

LIRAA – Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti*

MOG – Glicoproteína da Mielina dos Oligodendrócitos (do inglês: *Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*)

NMOSD – Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica (do inglês: *Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

RT-PCR – Transcrição Reversa combinada à Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

RNA – Ácido Ribonucleico (do inglês: *Ribonucleic Acid*)

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

ZIKV – Vírus da Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1. VÍRUS DA ZIKA	19
2.1.1. Manifestações clínicas do vírus da Zika.....	20
2.2. VÍRUS DA DENGUE	21
2.2.1. Manifestações clínicas do vírus da Dengue	23
2.3. VÍRUS DA CHIKUNGUNYA.....	23
2.3.1. Manifestações clínicas do vírus da Chikungunya.....	24
2.4. TRANSMISSÃO DAS ARBOVIROSES ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA.....	25
2.5. TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE.....	26
2.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	26
2.7. COMPLICAÇÕES NEUROIMUNOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS	30
2.7.1. Sistema Nervoso Periférico.....	30
2.7.2. Sistema Nervoso Central	37
3. JUSTIFICATIVA.....	44
4. OBJETIVOS.....	45
4.1. OBJETIVO GERAL	45
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
5. METODOLOGIA	46
5.1. ASPECTOS ÉTICOS	46
5.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	46
5.3. AMOSTRAS DE SORO.....	47

5.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	47
5.5. TESTES DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG CONTRA ARBOVÍRUS	49
5.6. TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG CONTRA ARBOVÍRUS	50
5.7. TESTE PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GANGLIOSÍDEOS....	51
5.8. TESTE PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AQP4 E ANTI-MOG..	52
5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
6. RESULTADOS.....	54
6.1. PARTICIPANTES DO ESTUDO	54
6.2. PERFIL IMUNOLÓGICO, VIROLÓGICO E AUTOANTICORPOS DAS AMOSTRAS DO ESTUDO	56
6.2.1. Perfil imunológico dos participantes do estudo	56
6.2.2. Perfil virológico dos participantes do estudo	63
6.2.3. Infecção mais recente	64
6.2.4. Perfil de autoanticorpos dos participantes do estudo	65
6.3. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS APRESENTADOS PELOS PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	68
6.4. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS VIRAIS APRESENTADOS PELOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	68
6.5. DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS NEUROLÓGICOS APRESENTADOS PELOS PARTICIPANTES DO ESTUDO.....	69
6.6. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS ESTRATIFICADOS POR GRUPOS VIRAIS.....	70
6.7. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS CLÍNICOS ESTRATIFICADOS POR GRUPOS VIRAIS.....	70

6.8. DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS NEUROLÓGICOS ESTRATIFICADOS POR GRUPOS VIRAIS	71
6.9. DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS NEUROLÓGICOS DE PACIENTES QUE ENTRARAM EM CONTATO COM UM A TRÊS ARBOVÍRUS.....	72
6.10. DESCRIÇÃO DO PERÍODO ENTRE SINTOMAS VIRAIS, NEUROLÓGICOS E COLETA DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO	73
6.11. CORRELAÇÃO ENTRE OS TÍTULOS DE DENV E ZIKV.....	74
7. DISCUSSÃO	76
8. CONCLUSÕES	94
9. PERSPECTIVAS.....	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS	112
ANEXO 1 - ACEITE DA COMISSÃO CIENTÍFICA DA PUCRS	112
ANEXO 2 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO COLABORADOR DE SOBRAL/CE.....	113
ANEXO 3 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO COLABORADOR DO RIO DE JANEIRO/RJ.....	114
ANEXO 4 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO COLABORADOR DE RECIFE/PE	115
ANEXO 5 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO COLABORADOR DE FORTALEZA/CE	116
ANEXO 6 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO NA REVISTA MULTIPLE SCLEROSIS AND RELATED DISORDERS.....	117
ANEXO 7 – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO NA REVISTA MULTIPLE SCLEROSIS AND RELATED DISORDERS	118

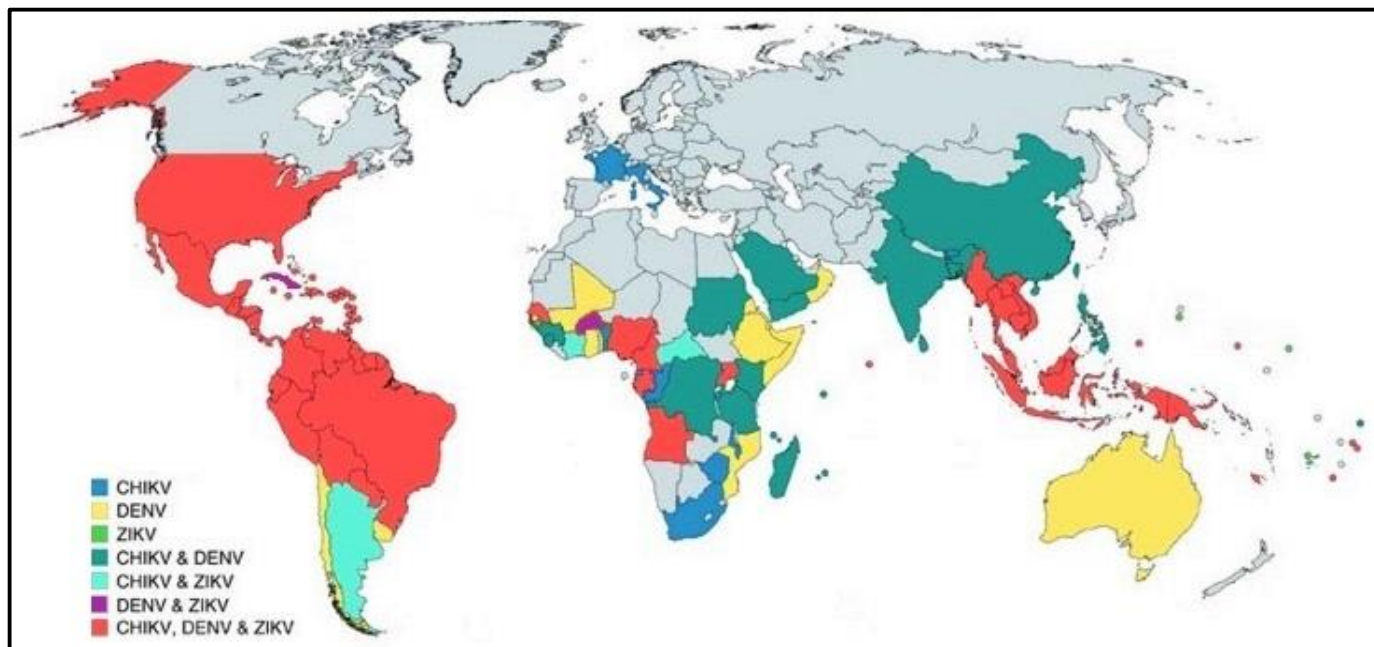
1. INTRODUÇÃO

Entre os anos de 2015 a 2017, o Brasil enfrentou uma epidemia de infecções causadas pelos vírus da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e principalmente Zika (ZIKV). As três doenças têm como principal vetor o mosquito *Aedes aegypti*, espécie endêmica em todo o Brasil (FIGUEIREDO, 2015; LIANG; GAO; GOULD, 2015; MOTA et al., 2016). Essas doenças, geralmente, se manifestam por um quadro exantemático, com artralgia e febre, mas, não infrequentemente, os pacientes podem ser oligossintomáticos (MOTA et al., 2016). No entanto, as reações imunológicas secundárias às infecções virais, especialmente pelo ZIKV, podem causar complicações neurológicas diretas ou indiretas com alto risco de sequelas permanentes (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017). A sequela neurológica mais grave da infecção pelo ZIKV é, certamente, a microcefalia, quando a infecção ocorre no período pré-natal. Contudo, alguns pacientes com suspeita de infecções por arbovírus podem apresentar quadros desmielinizantes do sistema nervoso central (SNC) ou do sistema nervoso periférico (SNP), como a encefalomielite disseminada aguda (ADEM - *Acute Disseminated Encephalomyelitis*), distúrbio do espectro da neuromielite óptica (NMOSD - *Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder*), neurites ópticas, mielites transversas, síndrome de Guillain-Barré (SGB) e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica (CIDP - *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*) (Acosta-Ampudia et al., 2018; Leonhard et al., 2018; Mehta et al., 2018a). Todavia, não está clara a relação entre a infecção viral e o risco de desenvolvimento destas doenças, como também a positividade para autoanticorpos contra antígenos do sistema nervoso que podem estar presentes em algumas destas patologias.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

O *Aedes aegypti*, originário do Egito, chegou ao Brasil no período colonial, por meio de navios que traficavam escravos. Em 1762, o vetor foi descrito cientificamente pela primeira vez com o nome de *Culex aegypti*. Somente em 1818, foi estabelecido o nome definitivo de *Aedes aegypti*. Este mosquito é o vetor de transmissão dos vírus da Dengue, Chikungunya e Zika (Bogoch et al., 2016; Rückert et al., 2017). Por terem o mesmo vetor, a distribuição geográfica das infecções por esses arbovírus se sobrepõem amplamente (Figura 1).

Figura 1. Distribuição global dos casos de exposição ao vírus da Zika, Dengue e Chikungunya por países.



Fonte: Rückert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna S M, Young M C, et al. Impact of simultaneous exposure to arboviroses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. Nature Communications. 8, 15412 (2017).

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) aponta que a primeira epidemia pelo DENV no continente americano ocorreu no início do século XIX, no Peru, com surtos no Caribe, Estados Unidos, Colômbia e Venezuela. No Brasil, os primeiros relatos datam do final do século XIX, em Curitiba (PR), e do início do século XX, em Niterói (RJ). No entanto, somente no período de 1981-1982, em Boa

Vista (RR), aconteceu a primeira ocorrência da Dengue causada pelos vírus tipo 1 e 4. Logo em seguida, surgiu a epidemia no Rio de Janeiro, se disseminando em todo território nacional até os dias atuais (Fiocruz, 2019). O Levantamento Rápido de Índices de Infestação pelo *Aedes aegypti* (LIRAA) identificou que, de janeiro a dezembro de 2017, foram notificados 252 mil casos prováveis de infecção pelo DENV em todo país. Os números representam uma redução de 83% em relação ao mesmo período de 2016, quando foram notificados 1,5 milhões de casos (Ministério da Saúde, 2017). Entre os anos de 2017 e 2018, ocorreu um pequeno aumento de 5,3% nos casos prováveis de infecções pelo DENV (252 mil para 265 mil) (Ministério da Saúde, 2019). Estima-se que ocorram mais de 500 mil hospitalizações e 25 mil mortes devido à infecção pelo DENV (Muller; Depelsenaire; Young, 2017).

Após a epidemia de DENV, outro arbovírus foi identificado. O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 em macacos rhesus (Mavigner et al., 2018) e em 1952 nos humanos (Kam et al., 2017). A sua capacidade de infiltrar-se no cérebro, bem como de induzir alterações patológicas, foram relatadas desde o final da década de 1950 (Mavigner et al., 2018), no entanto, casos de infecção humana eram raras até 2007 (Blumberg; Fishman, 2017). Surtos recentes que resultaram em defeitos congênitos fizeram com que a infecção pelo ZIKV fosse considerada uma emergência global de saúde (França et al., 2016; Lessler et al., 2016). No ano de 2017, foram notificados 17 mil casos prováveis de infecções pelo ZIKV no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, o que representa uma redução de 92,1% em relação a 2016, quando houve 215,3 mil registros (Ministério da Saúde, 2017). Já entre os anos de 2017 e 2018 a queda foi menor, cerca de 50% (17.452 para 8.680) (Ministério da Saúde, 2019).

Antecedendo ao surto de infecção pelo ZIKV, houve o surgimento de infecções pelo CHIKV onde, no ano de 2014, no Brasil, foram identificados 37 casos em indivíduos originários, principalmente, do Haiti e da República Dominicana. Ainda em 2014, foram confirmados dois casos autóctones no município de Oiapoque (AP). Logo depois, ocorreu a epidemia nas cidades do Nordeste, alastrando-se para todo o Brasil. No ano de 2017, o país registrou 185,7 mil casos prováveis de infecções pelo CHIKV, representando uma taxa de incidência de 90,1

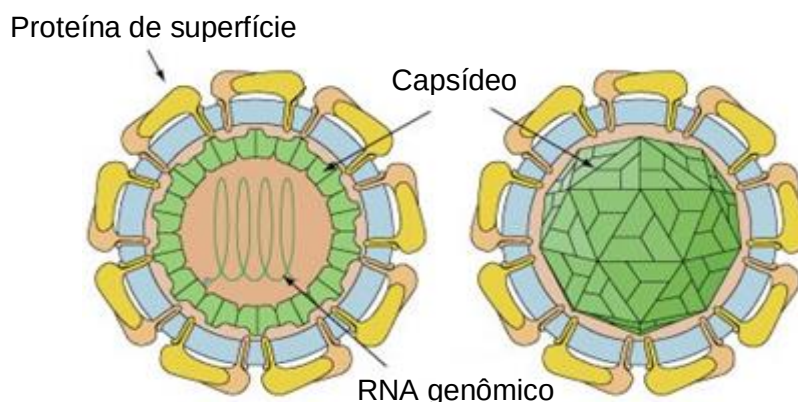
casos para cada 100 mil habitantes. A redução foi de 31% em relação ao ano de 2016, quando foram registrados 271,8 mil casos (Ministério da Saúde, 2017). Entre os anos de 2017 e 2018 a diminuição foi de 52%, sendo notificados 87,6 mil casos (Ministério da Saúde, 2019).

Como as infecções por arbovírus continuam a emergir em novas regiões, a probabilidade de co-infecção por múltiplos vírus pode estar aumentando. É importante ressaltar que a frequência de co-infecção na natureza e suas implicações clínicas e epidemiológicas são pouco compreendidas. No entanto, recentemente co-infecções têm sido relatadas durante vários surtos de CHIKV/DENV, bem como durante o surto do ZIKV nas Américas (Rückert et al., 2017).

2.1. VÍRUS DA ZIKA

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae* e possui em torno de 40-50 nanômetros de tamanho. O vírus tem formato esférico e é envolto por lipídios. O seu genoma é um RNA de fita única, de sentido positivo não segmentado. O RNA contém aproximadamente 11.000 quilobases que codificam 3.419 aminoácidos. As duas proteínas de superfície estão dispostas em uma simetria semelhante à icosaédrica (Figura 2) (Paixão; Teixeira; Rodrigues, 2018; Slon Campos; Mongkolsapaya; Screaton, 2018).

Figura 2. Estrutura do vírus da Zika.



Fonte: Lin H H, Yip B S, Huang L M, Wu S C. Zika vírus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnology Advances*. 36, 47-53 (2018).

Infecções pelo ZIKV têm sido reportadas em humanos desde 1952, na África e na Ásia. Fora dos continentes africano e asiático, as infecções por este vírus foram relatadas pela primeira vez na ilha de Yap na Micronésia em 2007 (Lessler et al., 2016; Vasconcelos, 2015). Desde a sua descoberta até 2007, os casos confirmados de infecção por ZIKV eram raros (Rasmussen et al., 2016). Em 2013, o ZIKV causou uma epidemia nas ilhas do Pacífico. Nesse cenário, ocorreu um aumento no número de casos de SGB associadas ao ZIKV, sendo possível detectar a presença do vírus no líquido cérebro-raquidiano (LCR) dos pacientes infectados (Lessler et al., 2016). Estes foram os primeiros casos reconhecidos de sequelas neurológicas associadas à infecção pelo ZIKV. Além de ter associação com a SGB, possui relação com diversas complicações neurológicas em adultos, como a mielite transversa, meningoencefalite e manifestações oftalmológicas (Nascimento et al., 2017).

A partir de 2015, o ZIKV espalhou-se rapidamente pela América do Sul e Central (Faria et al., 2016). No Brasil, foi constatada a relação da microcefalia com a infecção pelo ZIKV, após o vírus ser detectado nas amostras de líquido amniótico de duas mulheres grávidas (Martines et al., 2016; Melo et al., 2017). A associação causal foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro para o Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC, Atlanta), em abril de 2016 (Caires-Júnior et al., 2018; França et al., 2016).

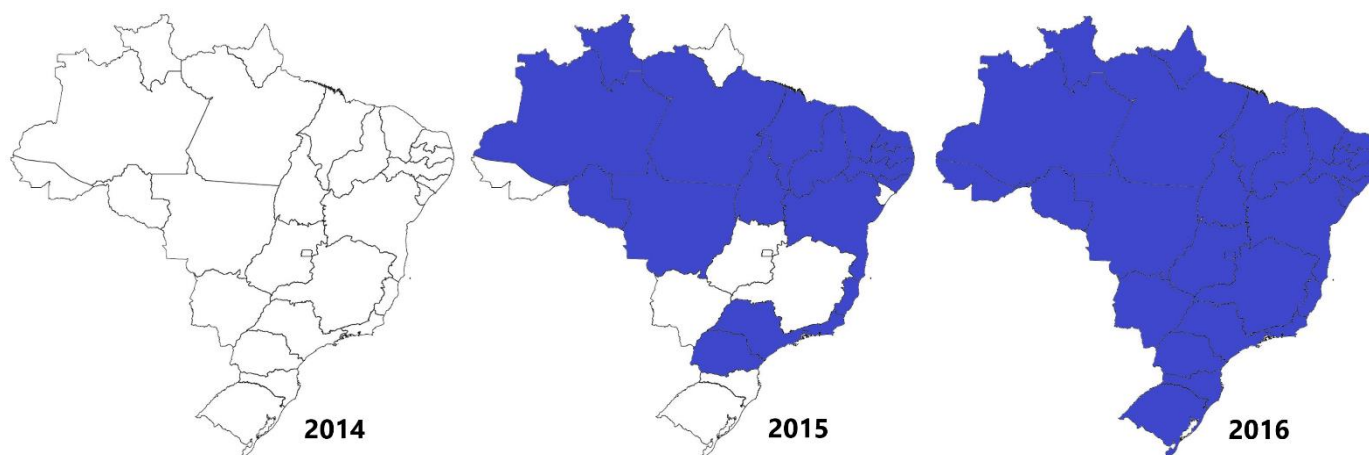
A ocorrência de microcefalia causada pela infecção por esse vírus foi rapidamente confirmada em outras regiões do Brasil, confirmando sua rápida disseminação. No Rio Grande do Sul (RS), infecções autóctones ocorreram somente em 2016 com um total de 44 casos (Gregianini et al., 2017) (Figura 3).

2.1.1. Manifestações clínicas do vírus da Zika

Na maioria dos casos de infecção pelo ZIKV, as manifestações clínicas começam a surgir entre 3 a 12 dias após a transmissão do vírus pelo mosquito (Calvet; Santos; Sequeira, 2016). Entretanto, os sintomas clínicos ocorrem em apenas 20% das pessoas infectadas (Hajra; Bandyopadhyay; Hajra, 2016). Entre os sintomas clínicos mais comuns estão: febre baixa, conjuntivite (não purulenta),

dor muscular e nas articulações, dor nas costas, mal-estar e dor de cabeça com duração de 2 a 7 dias (Hajra; Bandyopadhyay; Hajra, 2016). No entanto, a manifestação clínica mais evidente nos casos de infecção pelo ZIKV é o exantema e eritema (Hajra; Bandyopadhyay; Hajra, 2016). Os sintomas são semelhantes aos de outras arboviroses, como a Dengue e a Chikungunya, e a diferença entre elas está na intensidade e na distribuição em regiões específicas do corpo. A maioria dos pacientes não necessita de internação, e o risco de mortalidade secundária à infecção por ZIKV é relativamente baixo (Hajra; Bandyopadhyay; Hajra, 2016). Apesar disso, a estreita relação do vírus com o aumento da incidência de doenças neurológicas, tais como a SGB e as malformações congênitas, acarretou na declaração de estado de emergência internacional pela OMS em fevereiro de 2016 (Gulland, 2016; Nunes; Pimenta, 2016).

Figura 3. Casos reportados de infecção pelo vírus da Zika no Brasil em 2014, 2015 e 2016.



Fonte: O autor a partir de dados do Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/07/2015-svs-be-pncd-se48.pdf>. Acessado em 19 de março de 2019.

2.2. VÍRUS DA DENGUE

Semelhante ao ZIKV, o DENV pertence ao gênero *Flavivirus* da família *Flaviridae* e, portanto, também é um vírus de fita única de RNA. Este RNA é de

sentido positivo, não segmentado e de aproximadamente 11.000 quilobases (Mukhopadhyay; Kuhn; Rossmann, 2005).

O DENV, nos últimos anos, foi uma das maiores preocupações, tanto para o Ministério da Saúde quanto para a população, em relação às doenças infecciosas no Brasil (Hasan et al., 2016). Além disso, foi a doença viral mais alarmante transmitida por mosquitos em todo o mundo (Muller; Depelsenaire; Young, 2017). Nos últimos 30 anos, houve uma enorme expansão na transmissão do DENV, tornando-o endêmico em mais de 100 países (Yacoub; Mongkolsapaya; Sreaton, 2016).

O DENV possui 4 sorotipos conhecidos denominados DENV 1, DENV 2, DENV 3, DENV 4. Não foi relatada a existência de imunidade cruzada entre eles, logo, a infecção por um dos sorotipos só confere imunidade humoral por longos períodos ou permanente para aquele sorotipo. Porém, existe a possibilidade de imunidade cruzada transitória, de curta duração, entre os diferentes sorotipos (Chen; Wilson, 2010; De Alwis et al., 2014). Após uma infecção primária, o paciente está imunologicamente protegido da doença causada por esse sorotipo específico do vírus (Muller; Depelsenaire; Young, 2017).

O DENV tem como vetores os mosquitos do gênero *Aedes*, ou seja, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O *Aedes albopictus* é o vetor de manutenção do DENV no continente Asiático e não está associado com a transmissão do DENV nas Américas. Já o *Aedes aegypti* é o mais importante vetor na transmissão do DENV, como também de outras doenças de notificação compulsória nas Américas (Ferreira-de-Lima; Lima-Camara, 2018; Medeiros et al., 2018).

Os municípios brasileiros vêm sofrendo com sucessivas epidemias de DENV, devido ao caráter endêmico da doença e do clima favorável para a reprodução de seus vetores no país (Viana; Ignotti, 2013). A infecção ressurgue em ciclos sazonais, sendo necessário que se compreenda sua dinâmica em cada localidade, a fim de implementar ações que intervenham no ciclo e provoquem a redução da cadeia de transmissão, bem como a melhora no tratamento da doença, na tentativa de diminuir a ocorrência de mortes (Polwiang, 2015).

O Ministério da Saúde alerta que a manutenção da saúde do povo brasileiro enfrenta novos desafios impostos pela circulação do *Aedes aegypti*. Os sintomas semelhantes entre os arbovírus torna o assunto de grande importância para a prevenção, controle e erradicação dessas doenças (Brasil et al., 2016a).

2.2.1. Manifestações clínicas do vírus da Dengue

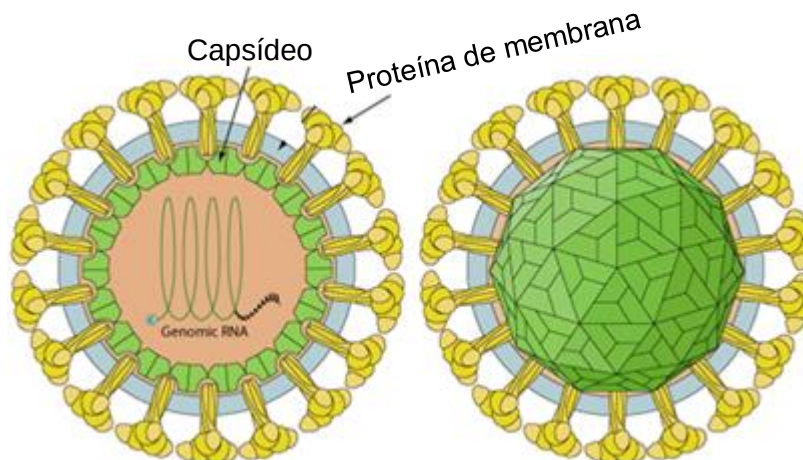
A Dengue é definida como uma doença febril de estado clínico agudo, que pode ser de curso benigno ou grave, podendo evoluir para o óbito. A doença causada pelo DENV pode apresentar um amplo espectro clínico, ou seja, alguns indivíduos conseguem se recuperar e tratar a doença que, aparentemente, manifesta-se de forma leve. Já outros indivíduos são acometidos pelas formas mais graves, podendo chegar ao óbito (Salles et al., 2018).

Fatores relacionados tanto ao vírus, quanto ao hospedeiro, determinam a gravidade. As principais formas clínicas da Dengue são a Dengue clássica, a Dengue com complicações e a febre hemorrágica da Dengue, podendo evoluir para a forma mais grave associada com hipotensão grave (choque devido ao aumento de permeabilidade vascular). Outros sintomas que podem surgir são dor abdominal intensa e contínua, vômitos persistentes, hipotensão postural, hipotensão arterial, hemorragias, diminuição da diurese, diminuição repentina da temperatura corpórea ou hipotermia (Hasan et al., 2016).

2.3. VÍRUS DA CHIKUNGUNYA

O CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* (Donalisio; Freitas; Zuben, 2017) e possui aproximadamente 70 nanômetros de tamanho. O vírus é esférico, envelopado e seu genoma é uma cadeia única de RNA de polaridade positiva. O tamanho do genoma varia de 9.700 a 11.800 quilobases. As proteínas de membrana contêm em média 80 pontas, cada ponta com trímeros de proteínas (Figura 4) (Mendes; Kuhn, 2018).

Figura 4. Estrutura do vírus da Chikungunya.



Fonte: Adaptado de Viral Zone (Instituto Suíço de Bioinformática). Disponível em: https://viralzone.expasy.org/3?outline=all_by_species. Acessado em 5 de abril de 2019.

O CHIKV foi primitivamente encontrado na África, no sul e sudeste da Ásia e em ilhas do Oceano Índico, regiões tropicais e subtropicais. O CHIKV foi isolado pela primeira vez após uma epidemia em 1952-1953 na atual Tanzânia – África. Em 1954, sua presença foi confirmada na Ásia, em um surto nas Filipinas e, posteriormente, em outros países, como Tailândia e Índia (Weaver; Lecuit, 2015).

A disseminação ocorreu principalmente em áreas urbanas e periurbanas no continente de origem e aumentou a possibilidade de epidemias em regiões tropicais. Diferente do DENV e do ZIKV, o CHIKV também se distribuiu nas regiões subtropicais e até mesmo em regiões temperadas, como o território Europeu. No ano de 2014, foi detectada a transmissão autóctone do vírus no Amapá, disseminando-o para todos os estados do Brasil (Donalisio; Freitas; Zuben, 2017).

2.3.1. Manifestações clínicas do vírus da Chikungunya

O vírus provoca uma doença febril de início agudo associado com artralgia grave, astenia intensa, mialgia, cefaleia e erupção cutânea. Os sinais e os sintomas são clinicamente parecidos com aqueles causados pelo DENV, no entanto a principal manifestação clínica que os diferencia são dores intensas nas articulações. Após a fase inicial, a doença pode evoluir em duas etapas subsequentes: fase subaguda e crônica. Na maioria dos casos, os pacientes se recuperam, mas

esporadicamente, o envolvimento articular pode persistir causando incapacidade e afetando a qualidade de vida. Por vezes, durante o curso da infecção, complicações neurológicas graves, bem como hepáticas, podem ocorrer. A viremia pode persistir por até dez dias após o surgimento das manifestações clínicas (Lo Presti et al., 2016). A tabela 1 resume os principais sintomas clínicos apresentados por indivíduos acometidos pelos ZIKV, DENV e CHIKV.

Tabela 1. Principais sintomas clínicos decorrentes das infecções causadas pelos vírus da Zika, Dengue e Chikungunya.

Sintomas	Zika	Dengue	Chikungunya
Febre	Pode estar presente (baixa)	Presente (alta)	Presente (alta)
Artralgia	Pode estar presente (leve)	Pode estar presente (moderada)	Presente (intensa)
Exantema	Presente a partir do 1º dia	Pode estar presente a partir do 4º dia	Pode estar presente entre 2º e 5º dia
Prurido	Leve a intensa	Leve	Leve
Edema articular	Frequente: leve	Raro	Frequente: moderada a intensa
Dor	Média	Leve	Intensa
Náusea/Vômito	Pode estar presente	Presente	Pode estar presente

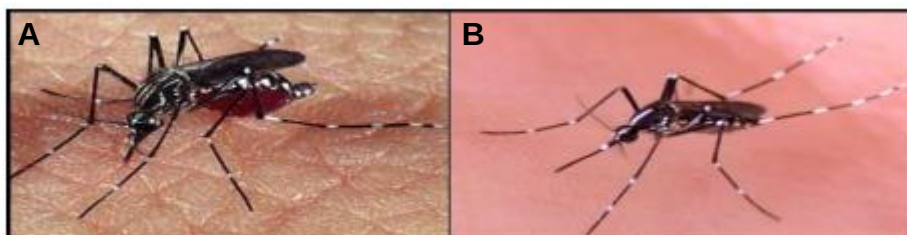
Fonte: Adaptado de Hajra et al., 2016; Hasan et al., 2016; Lo Presti et al., 2016.

2.4. TRANSMISSÃO DAS ARBOVIROSES ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA

O DENV e o ZIKV são transmitidos pelas fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* no ciclo ser humano - *Aedes aegypti* - ser humano, que pica apenas durante o dia. O CHIKV é transmitido pela picada de fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Figura 5). Fatores ambientais favoráveis para esses vetores podem desencadear o rápido surgimento das infecções. As mudanças climáticas e a boa adaptação do mosquito ao meio ambiente das cidades podem facilitar a sua

propagação e, conseqüentemente, a propagação do vírus (Hajra; Bandyopadhyay; Hajra, 2016; Hasan et al., 2016).

Figura 5. Fotografia dos vetores transmissores dos vírus da Zika, Dengue e Chikungunya. **A.** *Aedes aegypti*. **B.** *Aedes albopictus*.



Fonte: Center for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/transmission/index.html>. Acessado em 15 de março de 2019.

Casos de transmissão vertical podem ocorrer, quase que exclusivamente, durante o período intraparto em gestantes virêmicas e, muitas vezes, provoca infecção neonatal grave (Brasil, 2017). Diferentemente das manifestações clínicas observadas nas crianças e nos adultos, a infecção pelos CHIKV, DENV ou ZIKV nos recém-nascidos parece ser bastante específica e representa um grupo de alto risco de manifestações atípicas e/ou graves (Charlier et al., 2017).

2.5. TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

O tratamento para as infecções pelos ZIKV, DENV e CHIKV é basicamente sintomático, com analgésicos, ingestão de líquidos e repouso (Lo Presti et al., 2016). Devido a isto, o papel da prevenção das doenças e controle do vetor é de extrema importância para evitar a disseminação das infecções. As medidas devem ser focadas principalmente na prevenção da picada do vetor, além da eliminação de criadouros do mosquito por meio da aplicação de inseticidas (Halstead, 2015; Petersen et al., 2016).

2.6. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

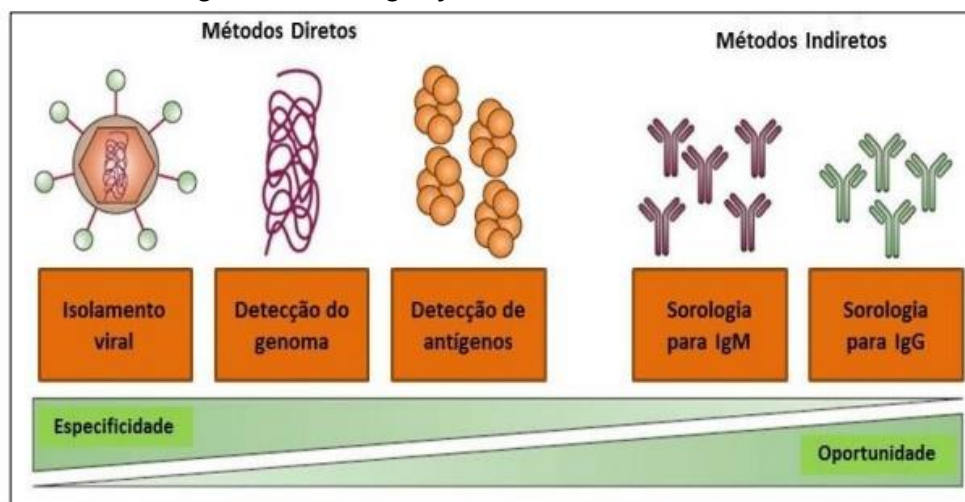
O diagnóstico definitivo para as infecções pelos ZIKV, DENV e CHIKV somente é possível com a associação entre os sintomas clínicos e dados laboratoriais, uma vez que os sintomas clínicos são semelhantes ao de outras

infecções por arbovírus em áreas endêmicas. Atualmente, as técnicas mais comuns utilizadas são: os testes sorológicos (método indireto) e os testes moleculares (método direto). Dependendo da fase da doença, é necessária uma combinação de métodos (Figura 6) (Yacoub; Mongkolsapaya; Screatton, 2016).

As técnicas moleculares, cujo objetivo é a detecção da presença do vírus por meio da amplificação do material genético (RNA), são capazes de identificar o vírus na fase aguda da doença. Entre os métodos mais utilizados está a Transcrição Reversa combinada à Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) e a PCR em tempo real (qRT-PCR).

Song e colaboradores (2018) identificaram um painel de biomarcadores para detecção altamente específica que permite discriminar a infecção por ZIKV da infecção por DENV com grande precisão. Os autores empregaram a proteína do capsídeo do ZIKV Africano (MR766) e outras cinco proteínas (NS1, NS2A, NS3, NS4B e NS5) com 90% de especificidade e sensibilidade. A proteína NS1 do DENV, por exemplo, é produzida durante o metabolismo do vírus e, portanto, reflete a atividade viral. A NS5 que é mais conhecida para ZIKV, representa regiões não estruturais 5 do vírus (Song et al., 2018).

Figura 6. Métodos laboratoriais diretos e indiretos para diagnóstico de infecções pelos vírus da Zika, Dengue e Chikungunya.



Nota: Oportunidade refere-se ao fato de que o teste de anticorpos é, geralmente, a opção de diagnóstico mais prática disponível.

Fonte: Adaptado de Peeling RW, Artsob H, Pelegriño JL, Buchy P, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nature Rev Microbiol.* 8(12 Suppl):S30-8 (2010).

Pabbaraju e colaboradores (2016) identificaram regiões do genoma específicas para cada vírus. Para o CHIKV, a região NSP4 que codifica a RNA polimerase foi descrita. E para o DENV tipo 1 a 4, a região 3'UTR tendo muitos nucleotídeos altamente conservados, essenciais para a replicação viral (Pabbaraju et al., 2016).

Entre os testes indiretos, a detecção de anticorpos pode ser feita por meio de diferentes metodologias, tais como o teste imunoenzimático e/ou a imunofluorescência indireta. A diferença entre os dois testes é que o de imunofluorescência indireta contém o substrato de células infectadas que expressam todos os epítomos dos vírus, aumentando as chances de cruzamento por proteínas comuns aos flavivírus (ZIKV e DENV), além de ter como função determinar previamente se o paciente está infectado por alguma arbovirose através do alto nível de sensibilidade. Já o teste imunoenzimático utiliza proteínas purificadas, por isso possui uma maior especificidade, além de determinar qual arbovirose infectou o paciente (De Ory et al., 2018).

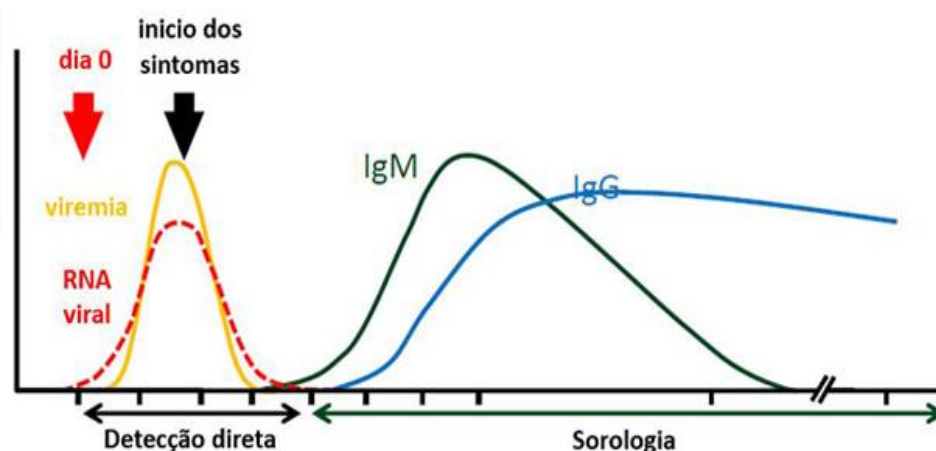
O teste de ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) se baseia nas reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. O teste de imunofluorescência indireta (IFI) visa reconhecer anticorpos contra agentes infecciosos presentes em amostras de soro de pacientes infectados por algum arbovírus. Este é considerado o melhor teste para uma triagem inicial das amostras em relação às infecções devido a sua alta sensibilidade, além de permitir a detecção simultânea de anticorpos para DENV, CHIKV e ZIKV por meio de células infectadas com os agentes (Donalisio; Freitas, 2015).

Nestes testes, os anticorpos contra o vírus podem ser detectados a partir do 4º dia para anticorpos da classe IgM e a partir do 12º dia para anticorpos da classe IgG. As infecções agudas são geralmente caracterizadas pela ocorrência de anticorpos IgM, com IgG aparecendo ao mesmo tempo ou pouco tempo depois. IgM permanece detectável durante várias semanas, enquanto que IgG persiste durante toda a vida (Pustiglione, 2016) (Figura 7). No entanto, a sorologia para ZIKV em populações com circulação simultânea ou prévia de outros flavivírus, como DENV, são passíveis de imprecisão devido ao risco de reação cruzada com epítomos

comuns, levando a resultados falsos positivos (Muller; Depelsenaire; Young, 2017). Por esse motivo, resultados positivos devem ser analisados com cautela, podendo representar exposição prévia a outros flavivírus ou vacinação no passado (Petersen et al., 2016).

Os métodos de diagnóstico permitem a utilização de diversos tipos de amostras biológicas. Geralmente, o RNA viral é o primeiro a ser detectado e pode ser avaliado em amostras de sangue, urina, saliva, LCR ou sêmen. Enquanto a resposta imune se desenvolve, concentrações de IgM aumentam no sangue periférico, e o nível de RNA viral geralmente decai. Semanas após o vírus desaparecer da corrente sanguínea, ele ainda permanece nos gânglios linfáticos e no SNC. Essas informações foram verificadas em macacos rhesus e descritas no estudo de Aid e colaboradores (2017) (Aid et al., 2017). Os vírus desaparecem do sangue após 10 dias, mas se mantêm por até 42 dias no LCR, circulando por todo o cérebro e, até 72 dias nos gânglios linfáticos. Mesmo que os anticorpos que reconheçam e desativem o ZIKV possam aparecer dentro de alguns dias na corrente sanguínea, não são detectados no LCR. Habitualmente, quando comparados os níveis séricos de proteínas no soro e no LCR de pacientes clinicamente normais, observa-se que o nível proteico relativo do soro costuma ser maior. Isto é creditado à presença da barreira hematoencefálica (BHE) e da baixa presença de células da imunidade adaptativa no SNC (Kilpatrick; Ransohoff; Wesselingh, 2010). Porém, uma vez que se estabelece um processo imune no sistema nervoso, ocorre um aumento da produção de anticorpos *in situ* e, conseqüentemente, haverá aumento de proteínas detectadas na amostra líquórica. Sendo assim, a análise do LCR torna-se uma ferramenta importante para o diagnóstico diferencial da síndrome e para a exclusão de outros fatores (Van Den Berg et al., 2014)

Figura 7. Ilustração demonstrando o período que os anticorpos IgM e IgG são detectáveis.



Fonte: Adaptado de Diagnostics - Zika, Dengue & Chikungunya Viruses. Disponível em: https://www.euroimmun.com/fileadmin/euroimmun/pdf/news/article/HI_2668_L_UK_A.pdf. Acessado em 12 de setembro de 2019.

2.7. COMPLICAÇÕES NEUROIMUNOLÓGICAS SECUNDÁRIAS À INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS

2.7.1. Sistema Nervoso Periférico

O SNP é composto por todos os nervos que estão fora do SNC, ou seja, cérebro e medula espinhal. Fazem parte do SNP os nervos cranianos e os nervos que saem da medula espinhal. Entre as doenças causadas pelos arbovírus e que afetam o SNP, a SGB é a mais conhecida, mas há também a CIDP, entre outras (Brizzi; Lyons, 2014).

2.7.1.1. Síndrome de Guillain-Barré e suas variantes

A SGB é uma polineuropatia desmielinizante aguda, mediada por uma resposta imunológica. É considerada a neuropatia parálitica aguda mais comum e

mais grave. Cerca de 100.000 pessoas desenvolvem a doença a cada ano em todo o mundo (Willison; Jacobs; Van Doorn, 2016).

A SGB é caracterizada por fraqueza bilateral e simétrica dos membros, com reflexos diminuídos ou ausentes, que progride ao longo de um período de 12 horas a 28 dias. Os sintomas atingem o pico em quatro semanas, seguidos de um período de recuperação que pode durar meses ou anos, à medida que a resposta imune decai e o nervo periférico passa por um processo de reparo endógeno (Styczynski et al., 2017). Embora os resultados clínicos sejam geralmente favoráveis, aproximadamente 20% a 30% das pessoas desenvolvem insuficiência respiratória neuromuscular, que é a causa mais comum de morte na SGB. As taxas de mortalidade relatadas variam de 3% a 7% na América do Norte e Europa e 13% em partes da Ásia (Styczynski et al., 2017).

O estudo eletrofisiológico através da eletroneuromiografia é de extrema importância na avaliação prognóstica e na classificação do subtipo eletrográfico de cada paciente. O envolvimento encontrado pode ser do tipo desmielinizante ou axonal, sendo este último puramente motor ou sensitivo-motor. Esta classificação é obtida através da análise de parâmetros como velocidade de condução, latência distal, amplitude e latência de onda-F (Rajabally et al., 2017). Nos casos da Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Aguda (AIDP) são encontrados achados compatíveis com desmielinização, incluindo: prolongamento dos potenciais de ação musculares compostos, prolongamento das latências motoras distais, redução da velocidade de condução nervosa, prolongamento das latências das ondas-F, dispersão temporal e bloqueio da condução. Na Neuropatia Motora Axonal Aguda (AMAN) e na Neuropatia Sensitivo Motora Axonal Aguda (AMSAN) são encontradas características típicas de degeneração axonal, tais como: a ausência ou redução dos potenciais de ação musculares compostos, sem evidências de desmielinização. Para diferenciar a AMAN da AMSAN, são essenciais os estudos sensitivos com achados de ausência ou redução das amplitudes dos potenciais sensitivos na AMSAN, mas não na AMAN. Nesta variante axonal motora pura, os achados podem ser complexos, visto que alguns pacientes podem apresentar um fenômeno conhecido como bloqueio reversível da condução, isto é,

uma falha transitória da condução que rapidamente volta ao normal dentro de 2 a 5 semanas. Relativamente à síndrome de Miller Fisher, a única alteração presente em 75% dos pacientes é a ausência dos reflexos-H (Melo et al., 2017).

Até o momento, não se sabe se as manifestações clínicas da SGB surgem pelo dano direto aos gangliosídeos ou se são estes apenas marcadores isolados. Cerca de 50% dos pacientes que são avaliados para anti-gangliosídeos apresentam tais anticorpos. Sendo comumente encontrados nas formas axonais de SGB (anti-GM1, anti-GM1b, anti-GD1a) e na variante Miller Fisher (anti-GQ1b) (Yuki, 2012). A pesquisa de tais anticorpos ainda não tem papel bem estabelecido quanto ao valor prognóstico ou direcionamento terapêutico.

- **Síndrome de Miller Fisher**

A síndrome de Miller Fisher foi identificada pela primeira vez por James Collier, em 1932, como uma tríade clínica separada de oftalmoplegia, ataxia e arreflexia. Mais tarde, a síndrome recebeu o nome de Charles Miller Fisher, que a relatou, em 1956, como uma variante limitada da SGB (Bukhari; Taboada, 2017).

A síndrome de Miller Fisher geralmente começa a manifestar os sintomas ao longo de dias com o rápido desenvolvimento de três sinais que constituem a tríade clínica: oftalmoplegia (fraqueza dos músculos dentro ou ao redor do olho), ataxia (presença de movimentos anormais e descoordenados) e arreflexia (perda dos reflexos no exame físico) sem qualquer fraqueza (Dimachkie; Barohn, 2013). O pico da doença ocorre em média em uma semana, e a melhora começa, geralmente, em duas semanas. A recuperação da ataxia e da oftalmoplegia ocorre, em média, entre um e três meses após o início do tratamento, respectivamente (Yuki; Hartung, 2012). Embora a síndrome de Miller Fisher represente 5 a 10% dos casos de SGB nos países ocidentais, é mais comum na Ásia Oriental, representando até 25% dos casos (Dimachkie; Barohn, 2013). Alguns casos de síndrome de Miller Fisher podem progredir para a SGB clássica. A síndrome de Miller Fisher está fortemente associada à presença de anticorpos anti-gangliosídeos (anti-GQ1b). Este marcador sorológico está presente em mais de 90% dos pacientes afetados pela síndrome (Yepishin et al., 2016).

- **Neuropatia Motora Axonal Aguda**

A Neuropatia Motora Axonal Aguda (AMAN – *Acute Motor Axonal Neuropathy*) foi relatada em 1993, no norte da China. Desde então, essa variante também foi descrita em outros países. Atualmente, a AMAN é menos comum nos Estados Unidos e mais frequente na China, no Japão e também no México. Ela afeta principalmente crianças e adultos jovens e corresponde a uma forma motora pura, sem envolvimento sensitivo (Dimachkie; Barohn, 2013).

Os pacientes com AMAN têm uma progressão mais rápida da fraqueza muscular do que as outras variantes, resultando em paralisia prolongada e insuficiência respiratória ao longo de alguns dias (Ito et al., 2011). Nesta variante, os pacientes apresentam fraqueza proximal e distal simétrica sem anormalidades sensitivas. O curso clínico tende a ser menos grave do que nas outras formas (Ito et al., 2011).

Embora o mecanismo patológico exato não seja totalmente compreendido, a AMAN está associada à presença de anticorpos anti-gangliosídeos (principalmente anti-GM1/GD1a/GM1b). O diagnóstico da AMAN baseia-se na diminuição dos potenciais de ação muscular e na ausência de achados desmielinizantes com potenciais sensitivos normais (Yildirim et al., 2016).

- **Neuropatia Sensitivo Motora Axonal Aguda**

A Neuropatia Sensitivo Motora Axonal Aguda (AMSAN – *Acute Motor and Sensory Axonal Neuropathy*) é uma variante axonal da SGB. Os pacientes apresentam fraqueza muscular e déficits sensitivos. Geralmente, é uma forma grave e a recuperação, na maioria das vezes, é incompleta. Afeta, preferencialmente, adultos e é pouco comum. Embora o mecanismo patológico exato seja pouco compreendido, tanto a AMAN como a AMSAN estão associadas à presença de anticorpos anti-gangliosídeos (anti-GM1/GD1a/GM1b) (Ito et al., 2011).

- **Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Aguda**

A Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Aguda (AIDP – *Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*) é desmielinizante, sendo a forma

clínica da SGB. A AIDP afeta mais adultos do que crianças e há uma incidência maior em homens (Dimachkie; Barohn, 2013).

O curso clínico da AIDP é dividido em três fases. A primeira fase, que dura algumas semanas, é caracterizada por fraqueza muscular rapidamente progressiva. É simétrica e pode causar paralisia neuromuscular aguda. Também podem ocorrer perturbações sensitivas (formigamento e dormência). Outros locais envolvidos incluem os músculos respiratórios, que leva a insuficiência respiratória aguda, com 20-30% dos doentes necessitando de ventilação mecânica, os músculos da deglutição e os músculos dos olhos que causa oftalmoplegia. Durante a segunda fase, os sintomas tornam-se estáveis, mas podem ocorrer outras manifestações como arritmias cardíacas, hiper/hipotensão e alterações da motilidade gástrica. Durante a terceira fase, de recuperação, com duração de alguns meses ou mais, os sintomas regridem lentamente. Muitos doentes apresentam alterações residuais que podem ser fraqueza, distúrbios sensitivos, cansaço ou dor, por muitos meses ou mesmo anos.

Tabela 2. Principais diferenças entre a Miller-Fisher, AMAN, AMSAN e AIDP.

	Miller-Fisher	AMAN	AMSAN	AIDP
Lesão nervosa desencadeante	Axonal/Desmielinizante	Axonal	Axonal	Desmielinizante
Apresentação clínica	Tríade: oftalmoplegia, ataxia sensorial e arreflexia	Fraqueza motora ascendente sem perda sensitiva	Fraqueza motora ascendente com perda sensitiva	Fraqueza motora ascendente com perda sensitiva
Epidemiologia	Adultos	Crianças e adultos jovens	Adultos	Adultos
Prognóstico	Recuperação entre 1 e 3 meses	Recuperação rápida	Recuperação incompleta	Recuperação rápida
Anticorpos	Frequentemente positivo para anti-GQ1b	Frequentemente positivo para anti-GM1, anti-GD1a e anti-GM1b	Frequentemente positivo para anti-GM1, anti-GD1a e anti-GM1b	Nenhum anticorpo ainda claramente identificado, mas eventualmente anti-GM1

Fonte: Adaptado de Van Doorm et al., 2008; Ito, 2011; Yuki, 2012; Dimachkie & Barohn, 2013; Yildirim et al., 2016; Melo et al., 2017; Bukhari et al., 2017.

2.7.1.2. Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Crônica

A Polineuropatia Desmielinizante Inflamatória Crônica (CIDP – *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy*) é um distúrbio neurológico imunomediado, causado por um processo inflamatório ou edema dos nervos, que leva a destruição da mielina, gerando dano axonal. É a neuropatia crônica mais comum em todo o mundo, com prevalência variando de 1 a 9 casos por 100.000 habitantes (Mathey et al., 2015).

A causa da CIDP é desconhecida, embora tenham sido demonstradas anormalidades na imunidade celular e humoral. Até recentemente, nenhuma forma de CIDP foi associada a um antígeno/anticorpo específico e não existe um biomarcador para auxiliar no diagnóstico, ou para classificar os pacientes em subgrupos (Rajabally et al., 2017).

Clinicamente, a CIDP foi classificada em casos típicos e atípicos. Em sua forma típica, a CIDP produz fraqueza muscular proximal e distal simétrica em todos os quatro membros, perda sensitiva de fibras grandes e reflexos reduzidos ou ausentes. A CIDP é geralmente progressiva por pelo menos 8 semanas, embora possa ocorrer um padrão recidivante-remitente com longos períodos de remissão. A CIDP atípica pode ser tão comum quanto as formas típicas, incluindo formas sensitivas puras motoras e puramente assimétricas focais e multifocais assimétricas e distais (Lewis, 2017).

O curso progressivo da CIDP a distingue da SGB, pois os sintomas da SGB aparecem rapidamente (máximo em 4 semanas) e logo atingem o status de emergência. Os efeitos duradouros do dano podem levar meses ou anos para se ajustar, mas os sintomas não pioram. Pessoas com CIDP frequentemente desenvolvem sintomas que evoluem lentamente levando cerca de 8 semanas. Portanto, o que distingue as duas neuropatologias é o tempo de progressão da piora clínica (Dyck; Tracy, 2018).

2.7.1.3. Presença de anticorpos IgM e IgG anti-gangliosídeos

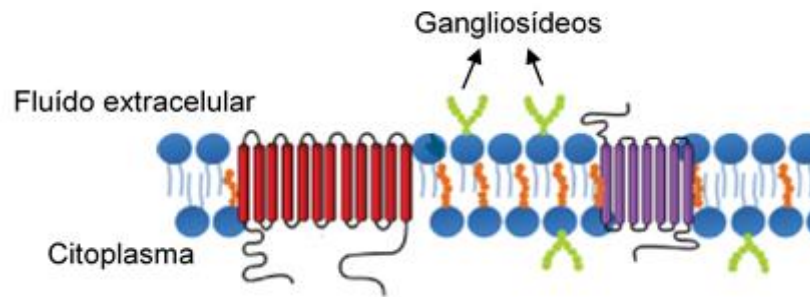
Os gangliosídeos são glicolipídeos amplamente distribuídos pelos tecidos do corpo, encontrados, principalmente, aderidos à superfície externa da membrana

plasmática de células do sistema nervoso (Figura 8). Eles são particularmente abundantes no cérebro, onde constituem 10% a 12% do total da massa lipídica da membrana neuronal (Palmano et al., 2015; Yuki, 2012). Atuam, portanto, como receptores para a sinalização entre células e o meio extracelular, além de mediar funções como reconhecimento de célula-célula (Groux-Degroote; Guérardel; Delannoy, 2017).

No cérebro há mais de 12 tipos diferentes de gangliosídeos, embora os monossialogangliosídeos (GM1), dissialogangliosídeos (GD1a, GD1b) e os trissialogangliosídeos (GT1b) correspondam a mais de 90% do total. Eles estão predominantemente localizados nos compartimentos neuronais/axonais (Allende; Proia, 2002; Massaad et al., 2015).

Os anticorpos anti-gangliosídeos são autoanticorpos que reagem à gangliosídeos e que são encontrados em algumas neuropatias autoimunes, particularmente em AMAN, AMSAN e Miller Fisher. Não se sabe ao certo como o ataque aos gangliosídeos atua no dano à mielina e eventualmente ao axônio do SNP (Gong et al., 2002). A especificidade dos anticorpos anti-gangliosídeos está associada com os subtipos dentro do espectro da síndrome. Os anticorpos para os gangliosídeos GM1/GD1a/GM1b estão associados às variantes axonais motoras da síndrome, enquanto que anticorpos para os gangliosídeos GQ1b estão fortemente associados com a síndrome de Miller Fisher. A explicação para esta associação é que a composição gangliosídica varia entre os nervos periféricos, e os anticorpos ligam-se apenas ao subgrupo de nervos com os gangliosídeos alvo (Delmont; Willison, 2015; Dimachkie; Barohn, 2013).

Figura 8. Diagrama esquemático dos gangliosídeos aderidos à superfície da membrana plasmática.



Fonte: Adaptado de Luessen D J, Chen R. Psychostimulants, Brain Membrane Lipids and Dopamine Transmission. J Biomol Res Ther. 5(2):2 (2016).

2.7.2. Sistema Nervoso Central

Doenças inflamatórias do SNC são caracterizadas por ativação do sistema imune, provocando lesões no cérebro e na medula espinhal. A desmielinização ocorre com a presença de inflamação que pode ser secundária a outra causa, uma vacina ou uma infecção, ou primariamente autoimune. As lesões podem dificultar a condução de sinais nervosos, causando prejuízos na sensação, movimento, cognição e outras funções dependendo do local envolvido. Estas doenças são também conhecidas como doenças desmielinizantes do SNC. A doença mais comum deste grupo é a esclerose múltipla (EM), mas também o NMOSD e a ADEM são doenças que têm recebido grande atenção por sua gravidade (Sato et al., 2014).

2.7.2.1. Encefalomielite Disseminada Aguda

A ADEM é uma doença inflamatória desmielinizante que acomete principalmente crianças e, menos frequentemente, adultos jovens. Na maioria dos casos, infecções virais, bacterianas ou imunizações antecedem o início dos sintomas. O mecanismo patofisiológico permanece desconhecido, sendo um possível fator a resposta autoimune à mielina, desencadeada por infecção ou imunização (Guimarães; Garrett, 2016).

A ADEM possui um curso clínico de início agudo com confusão, cefaleia, febre e alteração do nível de consciência, muitas vezes associado a crises

convulsivas e sinais neurológicos focais (ataxia, paraplegia, anormalidade dos nervos cranianos). Em alguns pacientes, as manifestações mentais se apresentam como alterações de comportamento, não havendo relação entre o quadro mental e as lesões observadas na substância branca. Sintomas neurológicos multifocais, tais como neurite óptica, defeitos do campo visual, déficit motor e sensitivo, ataxia, movimentos anormais, sinais de meningoencefalite aguda com hemi, para, ou tetraparesia e paralisia de nervos craniais podem dominar o quadro (Matas et al., 2013).

O critério diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas, no entanto, devido a semelhança das manifestações com a EM, nem sempre é possível diferenciá-las num primeiro momento. O prognóstico associado à ADEM é determinado pela presença de sequelas após a fase aguda, sendo a cognitiva, a mais comum. Assim, um tratamento precoce da doença pode reduzir as chances de invalidez permanente. Não há tratamento padronizado para ADEM e, por ter uma tendência a ser uma doença monofásica, o tratamento se concentra na fase aguda. A maioria dos pacientes são submetidos à pulsoterapia e/ou plasmaférese (Pohl et al., 2016).

2.7.2.2. Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica

O NMOSD é uma doença inflamatória, autoimune e desmielinizante grave do SNC caracterizada por ataques de neurite óptica (nervos ópticos) e mielite transversa (medula espinhal) (Abboud et al., 2016). A doença pode seguir dois cursos: monofásico e de surto e remissão. A maioria dos casos (70%) segue o curso de surto e remissão com forte predominância do sexo feminino e a idade de início da doença gira em torno da terceira e quarta década de vida. No curso monofásico, o paciente apresenta somente um surto e entra em recuperação, o que na maioria dos casos é parcial (Zamvil; Slavin, 2015).

As manifestações clínicas no NMOSD são episódios de neurite óptica unilaterais ou bilaterais. Os ataques de mielites, muitas vezes, causam alterações sensitivas, motoras e esfinterianas graves por afetarem grande área transversal da medula espinhal. Além disso, pacientes com NMOSD possuem frequentemente

lesões no tronco encefálico que se caracteriza por náusea, vômitos e soluços que permanecem por mais de 48 horas (Zalewski et al., 2017).

Um grande avanço para o diagnóstico do NMOSD foi a descoberta, em 2004, de autoanticorpos reativos a um canal de água altamente expresso nos astrócitos, denominado aquaporina-4 (AQP4) (Braz; Guimarães, 2016; Wang et al., 2017). Desde a identificação dos anticorpos anti-AQP4 e sua forte associação com o NMOSD, o interesse cresceu visando o desenvolvimento de novos biomarcadores laboratoriais que poderiam ser usados no diagnóstico diferencial das diversas condições desmielinizantes do SNC. O diagnóstico diferencial consiste em separar os pacientes com NMOSD daqueles com EM, uma vez que o tratamento para EM parece não controlar o NMOSD, e alguns pacientes podem apresentar aumento do número de ataques após a introdução de medicamentos para reduzir surtos de EM, agravando seu quadro clínico (Guo et al., 2017).

O último consenso internacional sobre critérios diagnósticos para NMOSD, publicado em 2015, definiu seis critérios básicos, além do status sorológico positivo para o anticorpo anti-AQP4 (Tabela 3). Estes critérios incluem a apresentação de (1) neurite óptica, (2) mielite aguda, (3) síndrome da área postrema (vômito e soluço), (4) síndrome do tronco encefálico agudo, (5) narcolepsia sintomática ou síndrome clínica diencefálica aguda e (6) síndrome cerebral sintomática com lesões cerebrais típicas de NMOSD (Baghbanian et al., 2018).

Para diagnosticar NMOSD com anticorpos anti-AQP4 positivo é necessário somente uma característica clínica central. Para diagnosticar casos de NMOSD com anticorpos anti-AQP4 negativo é necessário ter duas características clínicas centrais, e obrigatoriamente duas destas características deve ser neurite óptica, mielite transversa ou síndrome da área postrema. Além disso, requisitos adicionais de imagem para qualquer um dos dois critérios principais são obrigatórios (Wingerchuk et al., 2015).

2.7.2.3. Anticorpos anti-aquaporina-4

As aquaporinas (AQPs) são uma família de proteínas de canal de água altamente seletivas, com ampla distribuição em diferentes espécies, sendo

encontradas em todas as formas de vida. Esses canais promovem o transporte rápido de água, permitindo a manutenção de processos biológicos (Badaut et al., 2002; Hsu; Tran; Linninger, 2015). Até então, treze tipos diferentes de AQP4s foram identificados em mamíferos (Yukutake; Yasui, 2010).

A AQP4 é o principal canal regulador da homeostase hídrica no SNC. É um canal transmembrânico encontrado nos pés de astrócitos (Figura 9), nos vasos sanguíneos da BHE e nos axônios. A AQP4 é formada por 4 subunidades, sendo duas M1 e duas M23. As sequências de aminoácidos das duas subunidades são equivalentes, porém, a subunidade M1 possui 23 aminoácidos a mais que a subunidade M23 (Pisani et al., 2015).

Tabela 3. Critérios de diagnósticos de NMOSD estabelecidos pelo consenso internacional no ano de 2015.

Critérios diagnósticos para NMOSD com anticorpo anti-AQP4 positivo

- 1) Pelo menos uma característica clínica central;
 - 2) Teste positivo para anticorpos anti-AQP4 utilizando o melhor método de detecção disponível (ensaio baseado em células);
 - 3) Exclusão de diagnósticos alternativos.
-

Critérios diagnósticos para NMOSD com anticorpos anti-AQP4 negativo ou com status desconhecido de anticorpos anti-AQP4

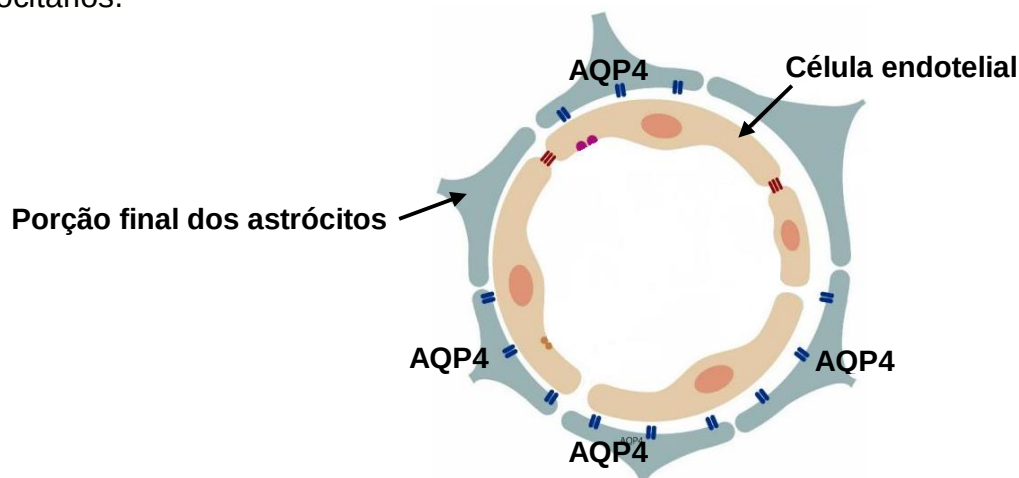
- 1) Pelo menos duas características clínicas principais ocorrem como resultado de um ou mais ataques clínicos e atendem a todos os seguintes requisitos:
 - a) Pelo menos uma característica clínica central deve ser neurite óptica, mielite aguda ou síndrome da área postrema;
 - b) Disseminação no espaço (duas ou mais características clínicas centrais diferentes);
 - c) Cumprimento de requisitos adicionais de ressonância magnética, conforme aplicável.
 - 2) Testes negativos para anticorpos anti-AQP4 utilizando o melhor método de detecção disponível (ensaio baseado em células);
 - 3) Exclusão de diagnósticos alternativos.
-

Fonte: Wingerchuk D M, Banwell B, Bennett J L, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 85(2):177-89 (2015).

O anticorpo anti-AQP4 foi originalmente chamado NMO-IgG. Este anticorpo é encontrado em pacientes com NMOSD ou em alto risco para a doença. Quando o anti-AQP4 foi identificado, revolucionou-se a compreensão dessa doença (Lennon et al., 2005). A presença do anticorpo sugere que o paciente tenha a doença, permitindo o diagnóstico precoce dos casos durante o primeiro ataque (Sato et al., 2013).

Cerca de 90% dos pacientes com NMOSD são positivos para anticorpos anti-AQP4 (Sato et al., 2014; Melamed et al., 2015). No entanto, em torno de 10% dos pacientes com NMOSD não apresentam anticorpos anti-AQP4. Neste caso, foi identificado outro anticorpo conhecido como anti-MOG, anticorpo reativo contra a glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos (MOG). Esse anticorpo foi encontrado em alguns pacientes com diagnóstico de ADEM, neurite óptica bilateral e neuropatia óptica inflamatória recidivante crônica (Cobo-Calvo et al., 2017).

Figura 9. Diagrama esquemático da localização da AQP4 nos prolongamentos astrocitários.



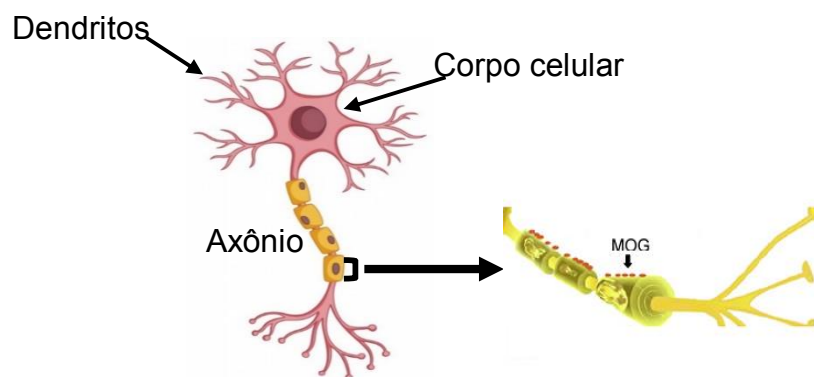
Fonte: Adaptado de Mader S, Brimber L. Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. Cells. 8(2), 90 (2019).

2.7.2.4. Anticorpos contra a Glicoproteína da Mielina dos Oligodendrócitos

A MOG é um membro da superfamília de imunoglobulinas. É composta por 245 aminoácidos e é expressa exclusivamente no SNC, na superfície mais externa da bainha de mielina e na membrana plasmática dos oligodendrócitos (Figura 10)

(Peschl et al., 2017). A MOG é expressa em paralelo com a mielinização, tornando-a um potencial marcador de maturação dos oligodendrócitos (Reindl et al., 2013). A função da MOG não é totalmente compreendida ainda, mas existem algumas evidências de que ela é uma molécula de adesão celular, reguladora da estabilidade de microtúbulos e um mediador das interações entre o sistema imune e a mielina. Embora esta proteína seja um componente minoritário da mielina (0,05%), sua conformação na superfície da mielina e oligodendrócitos e suas características especiais, tornam-na um alvo para a ligação de anticorpos e respostas imunes mediadas por células em doenças desmielinizantes inflamatórias (Peschl et al., 2017).

Figura 10. Diagrama esquemático mostrando a localização de MOG no neurônio.



Fonte: Adaptado de Horellou P, Wang M, Keo V, Chrétien P, Serguera C, Waters P, Deiva K. Increased interleukin-6 correlates with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in pediatric monophasic demyelinating diseases and multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 289, 1-7 (2015).

Kitley e colaboradores, em 2012, descreveram pela primeira vez quatro pacientes com fenótipos de NMOSD, mas sem anticorpos anti-AQP4. Esses pacientes foram apresentados com anticorpos anti-MOG (Kitley et al., 2012). Sato e colaboradores, em 2014, conduziram uma pesquisa com múltiplos pacientes e demonstraram que pacientes com NMOSD e anticorpos anti-MOG apresentavam características clínicas distintas e melhor recuperação do que aqueles com anticorpos anti-AQP4 ou soronegativos para ambos os anticorpos (Sato et al., 2014). Foi visto que pacientes com positividade para anticorpos anti-MOG seguiram

uma tendência de desenvolver somente um ataque ou menor frequência de ataques de neurite óptica e mielite extensa (Hamid et al., 2017; Sato et al., 2014). A maioria dos pacientes apresenta anticorpos anti-AQP4 positivos, mas cerca de 10% deles têm anticorpos anti-AQP4 negativos e anticorpos anti-MOG positivos (Hyun et al., 2017).

A função patogênica do MOG está bem estabelecida em modelos experimentais de encefalomyelite experimental autoimune (EAE) nos quais foi possível demonstrar que anticorpos monoclonais contra MOG induzem desmielinização *in vivo*. O objetivo mais comum é desencadear a resposta inflamatória em animais suscetíveis com autoantígenos (Ramanathan; Dale; Brilot, 2016).

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil enfrentou nos últimos anos uma epidemia de infecções causadas pelos DENV, CHIKV e ZIKV. Essas doenças possuem manifestações clínicas semelhantes, no entanto, podem ser muitas vezes assintomáticas. Além das manifestações clínicas, as infecções virais podem acarretar reações imunológicas secundárias, gerando complicações neurológicas diretas ou indiretas com grande risco de sequelas permanentes. A sequela neurológica mais grave e conhecida da infecção pelo ZIKV é a microcefalia, porém alguns pacientes podem apresentar quadros desmielinizantes do SNC ou do SNP.

Esse estudo visa verificar se há uma relação entre a infecção viral e o risco de desenvolvimento de complicações neurológicas como mielite transversa, ADEM, NMOSD, SGB e CIDP, e comparar o desenvolvimento de tais complicações entre os arbovírus, além de investigar a positividade para autoanticorpos contra antígenos do sistema nervoso que podem estar presentes em algumas destas doenças desmielinizantes. Como ainda não foi desenvolvido nenhum método de prevenção eficaz, e as vacinas ainda estão em fases de teste, os números de casos de co-infecções tendem a aumentar e, é de extrema importância entender a fisiopatogenia das complicações neurológicas pós-infecções, para identificar populações de risco e tentar prevenir mais casos com acometimento do sistema nervoso.

Com o grande número de casos de infecção pelo ZIKV como também pelos DENV e CHIKV, o aumento do número de complicações neurológicas exigiu e continuará exigindo uma resposta imediata do sistema de saúde pública. Além de que não há nenhum estudo realizado com a população brasileira feito de forma abrangente, ou seja, amostras de diversas regiões endêmicas, que verifique se há associação entre o desenvolvimento de quadros desmielinizantes e infecção pelos ZIKV, DENV e CHIKV.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar as complicações neuroimunológicas secundárias à infecção por arbovírus (Zika, Dengue e Chikungunya) no soro de pacientes infectados.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o agente infeccioso, ZIKV, DENV e/ou CHIKV em soro de paciente infectados através do método de imunofluorescência em mosaico e ELISA;
- Determinar a classe de anticorpos predominante (IgG e/ou IgM) em soro de pacientes infectados, através do método de imunofluorescência em mosaico e ELISA;
- Investigar a presença de autoanticorpos contra AQP4, MOG e gangliosídeos (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b, GQ1b) no soro de pacientes infectados;
- Descrever os sintomas clínicos, neurológicos e as síndromes neurológicas presentes em pacientes infectados pelos ZIKV, DENV e/ou CHIKV;
- Avaliar a presença de reação cruzada entre os testes sorológicos de ZIKV e DENV em soro de pacientes infectados.

5. METODOLOGIA

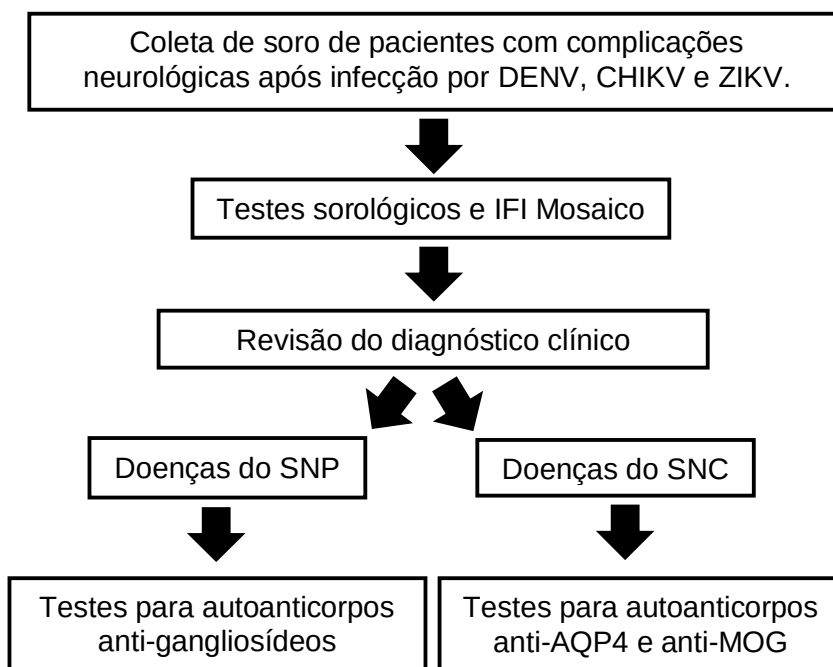
5.1. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa, por não envolver a coleta de sangue diretamente de pacientes, foi apreciada somente pela Comissão Científica da Faculdade de Medicina da PUCRS (Anexo 1), isto é, não se enquadra na Resolução N°466/12. O presente estudo seguiu a Resoluções e Normas Regulamentadoras pertinentes aos estudos envolvendo material biológico (NR 15, NR 32 e leis de biossegurança). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

5.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo foi observacional, transversal, não intervencionista para análise de aspectos clínicos e neuroimunológicos de pacientes infectados pelos ZIKV, DENV e CHIKV. A figura 11 apresenta um fluxograma dos experimentos realizados.

Figura 11. Fluxograma dos experimentos do estudo.



5.3. AMOSTRAS DE SORO

Um total de 98 amostras de soro foram obtidas de pacientes que apresentaram sintomas clínicos altamente sugestivos de infecção por ZIKV, DENV ou CHIKV, com complicações neurológicas associadas às infecções e atendidos em unidades de saúde das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil (Fortaleza/CE, Recife/PE, Sobral/CE e Rio de Janeiro/RJ). As coletas foram realizadas no período compreendido entre 2015 a 2018. Após a coleta das amostras nos seus respectivos centros, o material foi enviado ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular onde foi armazenado em freezer -80°C.

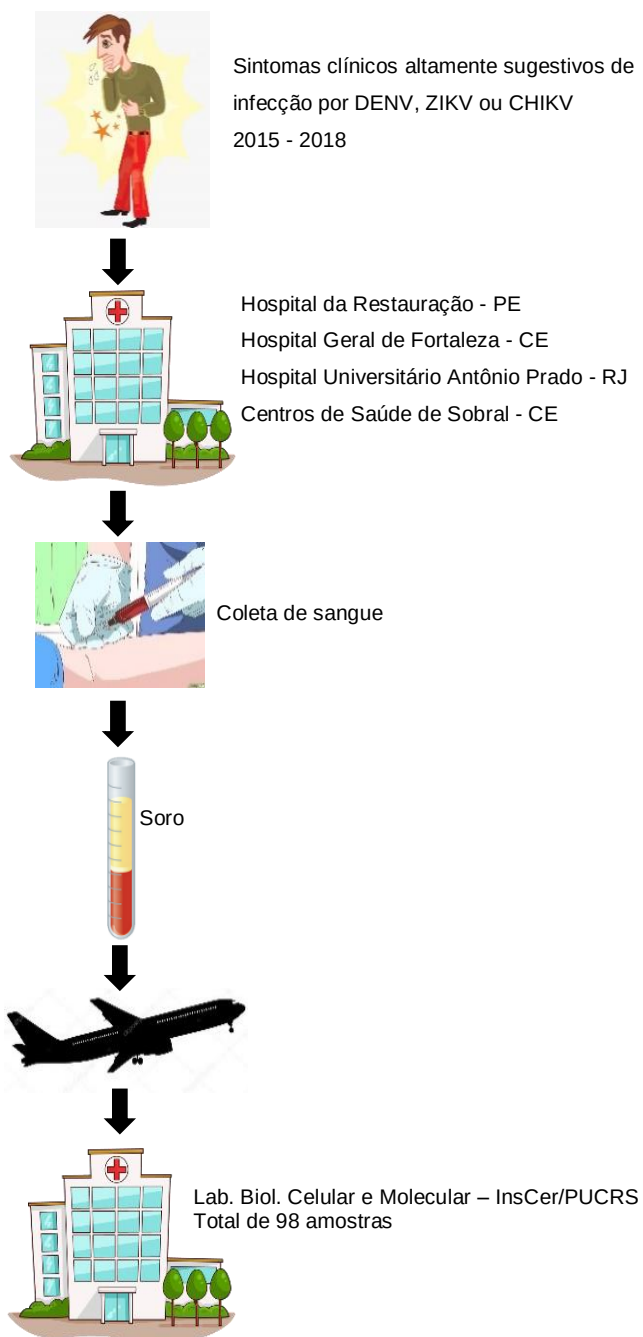
Os dados clínicos, que compreendem os sintomas virais e neurológicos, foram coletados nos centros de saúde por equipes treinadas e chefiadas por médicos neurologistas e infectologistas. O diagnóstico neurológico também foi determinado por médicos referência na área. Esses dados nos foram enviados e após, foi criado um banco de dados eletrônico, no qual foi mantido o anonimato de cada paciente (Figura 12).

5.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Inclusão: foram avaliadas todas as amostras de pacientes que desenvolveram algum sintoma neurológico depois dos sintomas clínicos sugestivos de infecção por arbovírus durando mais de 24 horas.

Exclusão: foram excluídas todas as amostras de pacientes que possuíam sintomas neurológicos antes do início dos sintomas clinicamente sugestivos de infecção por arbovírus.

Figura 12. Fluxograma da coleta de sangue e envio das amostras de soro.



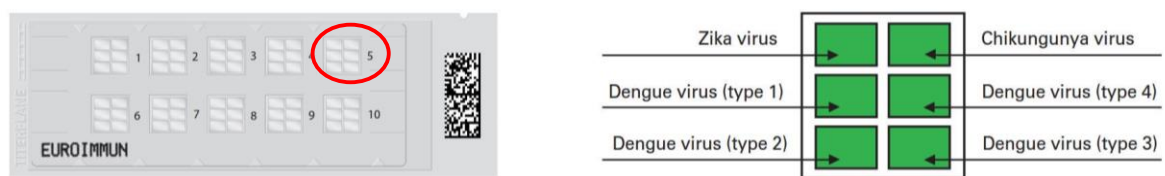
Fonte: O autor.

5.5. TESTES DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG CONTRA ARBOVÍRUS

Foram utilizados kits de imunofluorescência indireta (IFI) fornecidos pela empresa EUROIMMUN AG (Lübeck, Alemanha) para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos para ZIKV, DENV e CHIKV, em amostras de soro de pacientes infectados.

Para a identificação dos arbovírus, foi utilizado um biochip (lâmina de vidro) revestido com substrato do ZIKV, em paralelo com o substrato do CHIKV e, dos sorotipos 1 a 4 do DENV. De forma breve, os soros dos pacientes foram diluídos em tampão de amostra (1:10) e 30 µl de soro foi adicionado a cada poço do biochip, seguida de uma incubação de 30 min à temperatura ambiente (Figura 13). Após esse período, o biochip foi lavado com PBS Tween e adicionado 25 µl do anticorpo marcado com fluorescência (*fluorescein-labelled anti-human IgG*). Protegido da luz, o biochip ficou incubando por 30 min à temperatura ambiente. Por fim, os resultados positivos e negativos foram avaliados em microscópio confocal (Zeiss LSM-5 Exciter) através da intensidade da marcação da fluorescência que é proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra do paciente.

Figura 13. Biochip para identificação dos arbovírus revestido com substratos do vírus da Zika, Dengue e Chikungunya.



Fonte: Adaptado de Ohst C, Saschenbrecker S, Stiba K, et al. Reliable serological testing for the diagnosis of emerging infectious diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1062(1):19-43 (2018).

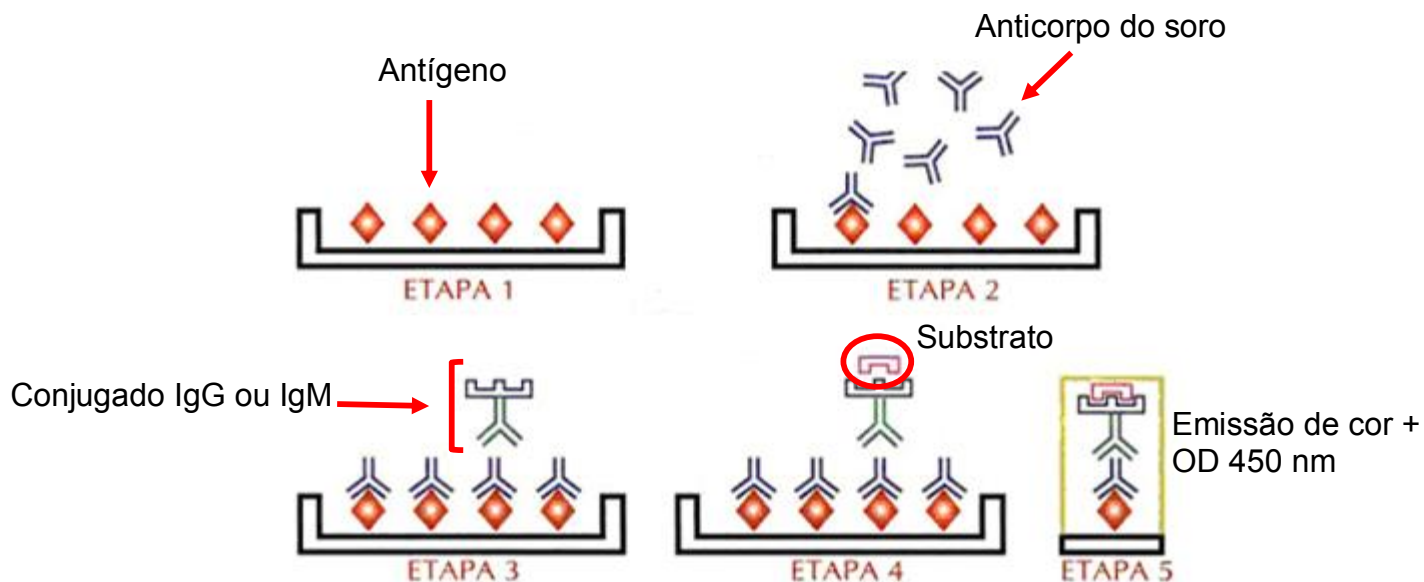
5.6. TESTE IMUNOENZIMÁTICO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG CONTRA ARBOVÍRUS

Foram utilizados kits de ELISA fornecidos pela empresa EUROIMMUN AG (Lübeck, Alemanha) para a detecção de anticorpos IgM e IgG específicos para ZIKV, DENV e CHIKV. Os valores de sensibilidade dos kits ficaram entre 95,4% a 100% e os valores de especificidade entre 98% a 100%.

Para a determinação da classe de anticorpos, isto é, IgM ou IgG, foram utilizadas placas de ELISA revestidas com antígeno NS1 específico do DENV, antígeno específico do ZIKV e antígeno recombinante do CHIKV. Os soros dos pacientes foram diluídos em tampão de amostra (1:100) e a cada poço foram adicionados 100 µl dessa solução, seguido de incubação a 37°C por 60 min (ZIKV e CHIKV) ou à temperatura ambiente por 30 min (DENV). Após esse período, a placa foi lavada com PBS Tween e adicionado 100 µl do anticorpo conjugado (anti-human IgG-HRP). A placa foi incubada à temperatura ambiente por 30 min protegida da luz. Por fim, 100 µl do substrato foi adicionado seguido de incubação à temperatura ambiente por 15 min. Os resultados foram avaliados pelo equipamento de leitura de placas de ELISA Robonik - Readwell Plate (Navi Mumbai, India) (Figura 14).

Para a detecção de anticorpos da classe IgM os passos foram semelhantes aos procedimentos descritos acima, com exceção do preparo da amostra. Antes da amostra ser testada, os anticorpos específicos da classe IgG foram removidos por centrifugação. Este procedimento foi realizado para evitar que qualquer fator reumatóide da classe IgM reagisse com ligação IgG específica, o que levaria a resultados falsos positivos de IgM. Portanto, foi adicionado à amostra um tampão contendo uma preparação de anticorpos anti-IgG humano onde todas as subclasses de IgG foram ligadas e precipitadas através de centrifugação. Os calibradores, controles positivos e negativos fornecidos pelo fabricante foram utilizados e a densidade óptica (DO) foi determinada com um comprimento de onda de 450 nm.

Figura 14. Diagrama esquemático das etapas do método ELISA indireto.



Fonte: Adaptado de Nicésio, R. G. Teste de ELISA. Disponível em: <https://www.biomedicinabrasil.com/2011/07/teste-de-elisa.html>

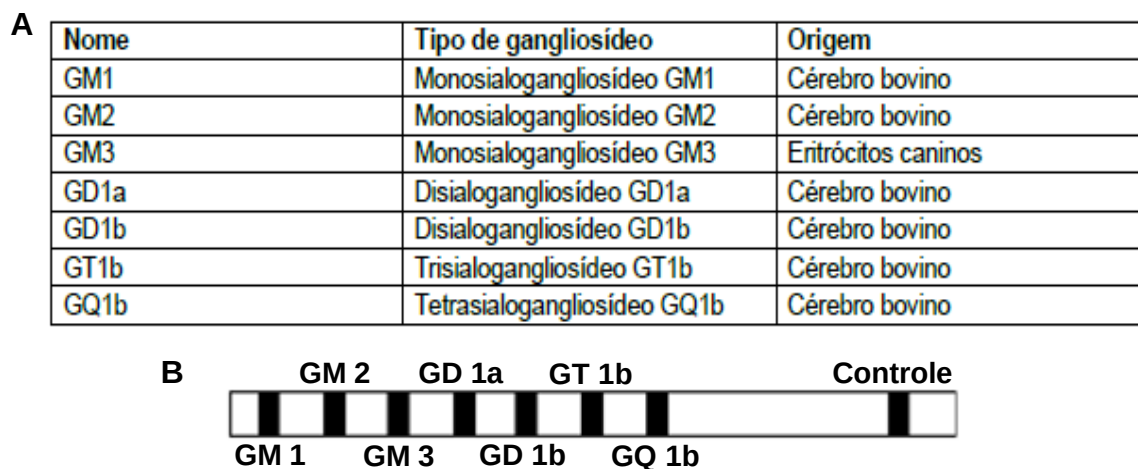
5.7. TESTE PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GANGLIOSÍDEOS

Os anticorpos IgM e IgG contra os gangliosídeos GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GT1b e GQ1b foram avaliados com o uso dos kits de *immunoblotting* fornecidos pela empresa EUROIMMUN AG (Lübeck, Alemanha). Ao usar uma combinação de diferentes antígenos altamente purificados em uma única tira, os diversos autoanticorpos contra gangliosídeos podem ser investigados simultaneamente (Figura 15).

Na primeira etapa de reação, tiras de *immunoblot* foram incubadas por 120 min à temperatura ambiente num agitador orbital com amostras diluídas (1:51) de soro de pacientes. Para detectar anticorpos específicos ligados aos antígenos correspondentes, uma segunda incubação foi realizada com uso de um conjugado enzimático (*alkaline phosphatase-labelled anti-human IgG*). A incubação por 60 min à temperatura ambiente foi realizada em um agitador orbital. Após esse período, foi adicionada a solução de substrato, seguida por 10 min de incubação à temperatura ambiente sob agitação. Após esse período, a solução foi aspirada e as tiras de

immunoblot foram posicionadas no protocolo de avaliação (Software EUROLinScan) fornecido pelo fabricante.

Figura 15. Ilustração do perfil de gangliosídeos analisados neste estudo. **A.** Autoanticorpos contra os tipos específicos de gangliosídeos. **B.** Diagrama esquemático da posição dos anticorpos específicos na tira de *immunoblot*.

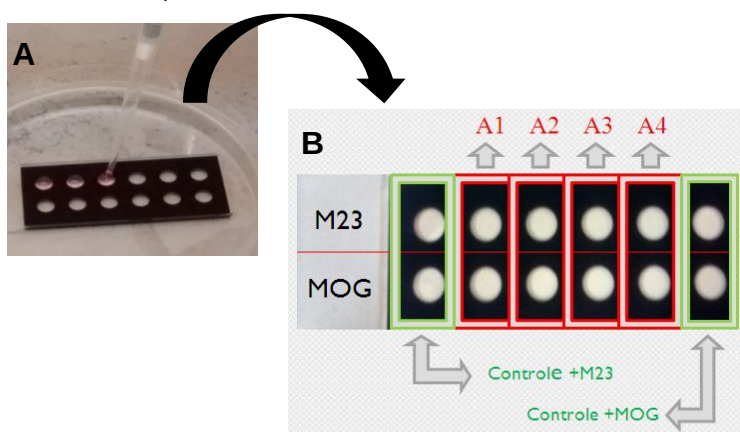


5.8. TESTE PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-AQP4 E ANTI-MOG

Os anticorpos anti-AQP4 e anti-MOG foram testados utilizando o ensaio baseado em células vivas transfectadas (CBA - *live cell-based assay*) conforme descrito por Sato e colaboradores (2014). Culturas da linhagem celular humana HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*) foram transfectadas com plasmídeos (pIRES2-DsRED2 5,3 kb) contendo o cDNA da isoforma AQP4-M23 ou MOG. Para tal, 20 µl do agente de transfecção FuGENE (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), 225 µl de Opti-MEM (Gibco, Life Technologies, EUA) e 5 µl de cDNA de AQP4-M23 ou MOG, e incubou-se por 15 min à 37°C. Após a transfecção, estas células foram incubadas à 37°C por 24 horas em lâminas de teflon (Matsunami Glass, Osaka, Japan) com 12 poços em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de gentamicina. Após esse período, as células transfectadas foram expostas ao soro de pacientes (diluição 1:16 AQP4 e diluição 1:128 MOG) e incubadas por 30 min à temperatura ambiente. As células foram

lavadas com solução de PBS, seguido da exposição a um anticorpo secundário anti-IgG humano marcado com fluorescência (Alexa-Fluor ou Dy-488, Thermo-Scientific, Life Technologies, EUA) diluído 1:500 em meio de cultura por 30 min. Por fim, as células foram lavadas novamente e fixadas com álcool absoluto por 15 min. Os resultados positivos e negativos foram avaliados no microscópio confocal (Zeiss LSM-5 Exciter) (Figura 16).

Figura 16. Fotografia e ilustração da técnica baseada em células HEK-293 vivas transfectadas. **A.** Lâmina de teflon onde são colocadas as células HEK-293 transfectadas (AQP4 e MOG). **B.** Imagem ilustrativa da organização dos controles e das amostras na lâmina, onde A são as amostras.



Fonte: O autor.

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

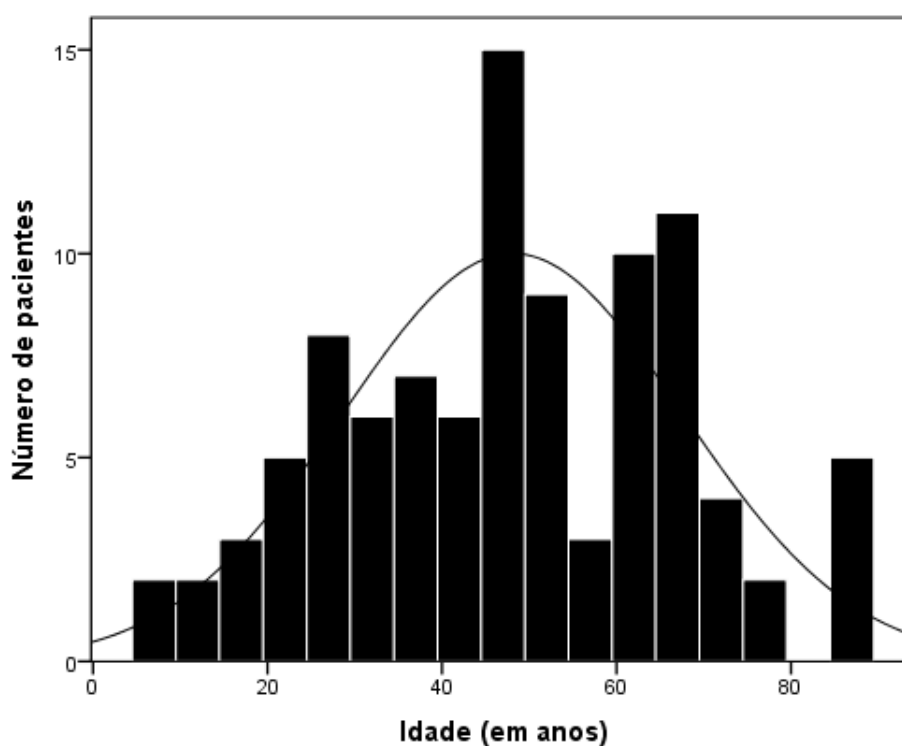
Os dados foram analisados no software SPSS v. 24 para Windows. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As variáveis categóricas foram descritas por meio de sua frequência absoluta e relativa. As variáveis contínuas foram analisadas quanto a sua parametricidade utilizando o teste de Kolmogorov Smirnov. Quando paramétricas, foram descritas através de sua média e desvio padrão. Quando não-paramétricas, foram descritas através de suas medianas e intervalos interquartis. Quando cabível, as variáveis foram plotadas em gráficos de barra (categóricas) ou box-plots (contínuas).

6. RESULTADOS

6.1. PARTICIPANTES DO ESTUDO

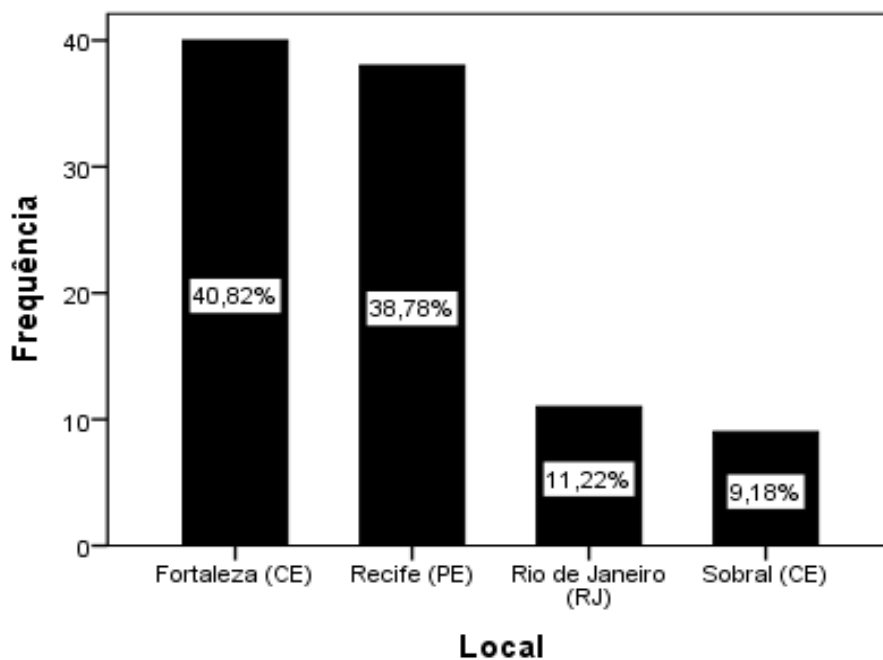
De 2015 a 2018, 98 pacientes foram avaliados em quatro centros de referência das regiões Nordeste e Sudeste do Brasil. A média de idade dos pacientes que apresentaram sintomas clínicos sugestivos de infecção por arbovírus e complicações neurológicas foi de $48,11 \pm 19,54$ anos (Figura 17). A amostra foi composta pela proporção praticamente igual de homens (51%) e mulheres (49%).

Figura 17. Distribuição dos pacientes com complicações neurológicas pós-infecção viral por grupos de idade.



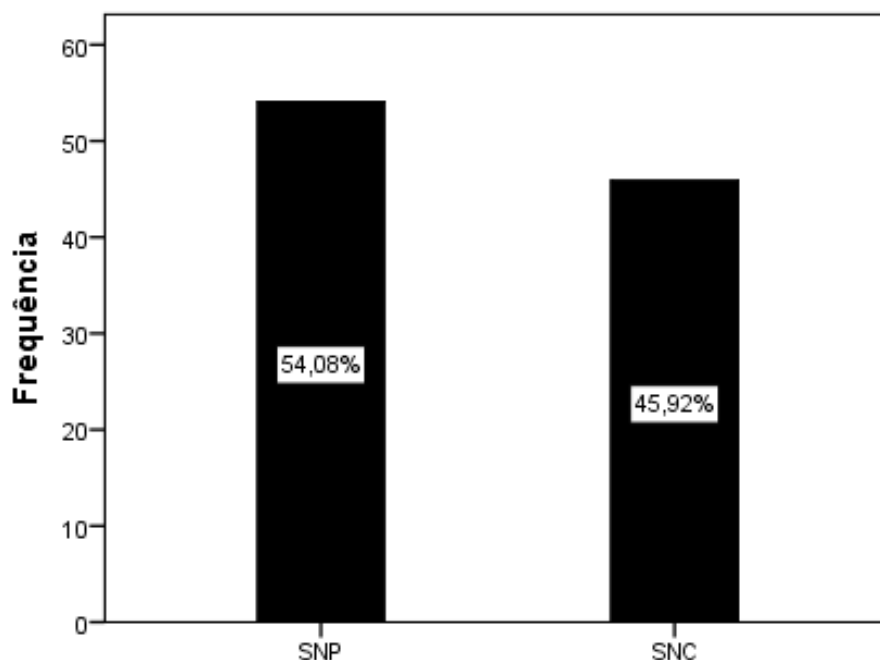
Todos os pacientes eram habitantes de áreas endêmicas e as respectivas amostras foram oriundas de centros de referência em neurologia e tratamento para infecções virais, incluindo Sobral, Rio de Janeiro, Recife e Fortaleza (Figura 18).

Figura 18. Distribuição dos pacientes com complicações neurológicas pós-infecção viral por cidade onde estão localizados os centros de referência.



Dos 98 pacientes, 84 (85,7%) apresentaram sintomas característicos de infecção viral e 14 (14,3%) eram assintomáticos. Os 98 pacientes apresentaram sintomas neurológicos, sendo 53 com diagnóstico do SNP e 45 com diagnóstico do SNC (Figura 19).

Figura 19. Frequência do diagnóstico neurológico do Sistema Nervoso Periférico e Sistema Nervoso Central.



6.2. PERFIL IMUNOLÓGICO, VIROLÓGICO E AUTOANTICORPOS DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

6.2.1. Perfil imunológico dos participantes do estudo

Após a avaliação imunológica dos 98 pacientes participantes do estudo, as amostras de soro foram testadas para ZIKV, DENV e CHIKV tanto para os anticorpos IgM quanto IgG. Para isto, foram utilizados dois métodos distintos, sendo o primeiro a IFI, e o segundo, ELISA. As duas técnicas têm sensibilidade e especificidade diferentes, mas dentro de um algoritmo de análise, elas podem ser utilizadas em conjunto conforme preconizado pela OMS (World Health Organization, 2016). Portanto, utilizando a combinação dos resultados dos dois métodos e levando em consideração que a grande maioria dos pacientes eram sintomáticos, viviam em regiões endêmicas e estavam em período epidemiológico favorável à infecção, foi possível separá-los por grupos virais, ou seja, pelo agente infeccioso (Tabela 4).

Tabela 4. Estratificação dos grupos virais.

Grupo	Tipos Virais
Grupo 1	Poliflavivírus
Grupo 2	Alphavírus
Grupo 3	Contato exclusivo com DENV
Grupo 4	Contato exclusivo com ZIKV

O grupo 1, denominado Poliflavivírus, foi caracterizado pelos flavivírus ZIKV e DENV reativos. Este grupo possui 77 pacientes (Figura 20), sendo 42,8% com diagnóstico de neuropatia de SNC, e 57,1% com diagnóstico de neuropatia de SNP (Figura 27). Todos os pacientes foram IgG positivos e somente 16 foram IgM positivos concomitante (Tabela 5).

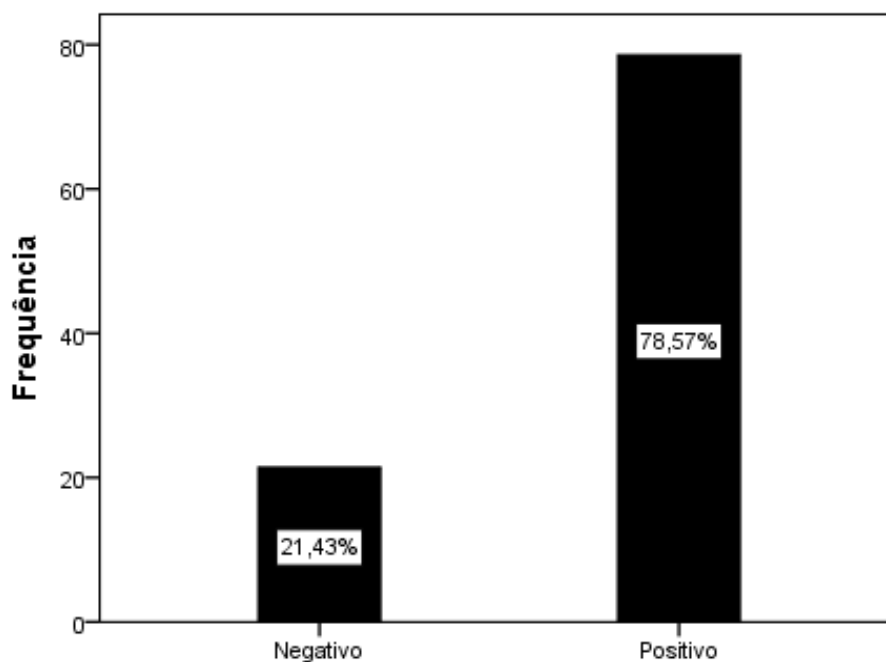
Figura 20. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos e negativos para o grupo viral Poliflavivírus.

Tabela 5. Distribuição dos pacientes do grupo viral Poliflavivírus pelos anticorpos IgM e IgG.

Anticorpos	Nº de pacientes
IgM+ e IgG+	16
IgM+	0
IgG+	61

O grupo 2, denominado Alphavírus, foi caracterizado somente pelo CHIKV reativo (Figura 21) e possui 52 pacientes (Figura 22). Do total, 55,8% foram diagnosticados com neuropatia do SNC, e 44,2% com diagnóstico de neuropatia do SNP (Figura 27). Dos 52 pacientes, 24 foram positivos para os anticorpos IgM e IgG, 24 foram positivos somente para IgG e 4 pacientes foram positivos somente para IgM (Tabela 6).

Figura 21. Fotomicrografia da imunofluorescência indireta realizada em pacientes positivos para o vírus da Chikungunya. **A.** Controle negativo (Aumento de 200X). **B.** Marcação de anticorpos IgG presentes na amostra do paciente (Aumento de 200X). **C.** Marcação de anticorpos IgG presentes na amostra do paciente (Aumento de 400X).

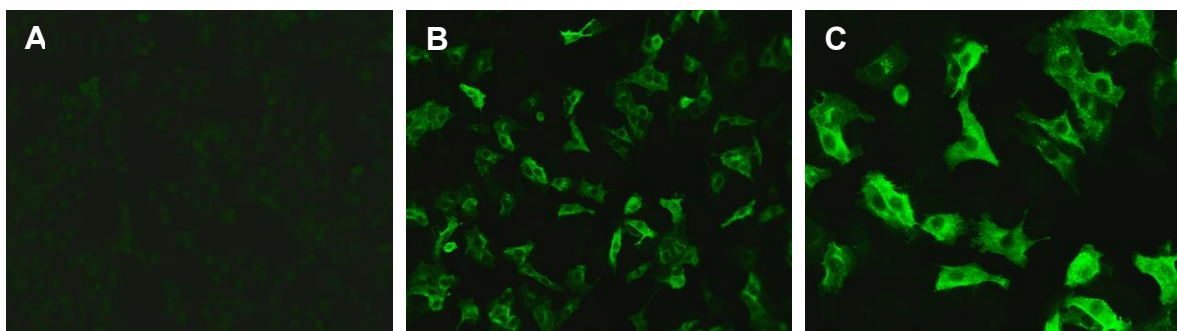


Figura 22. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos e negativos para o grupo viral Alphavírus.

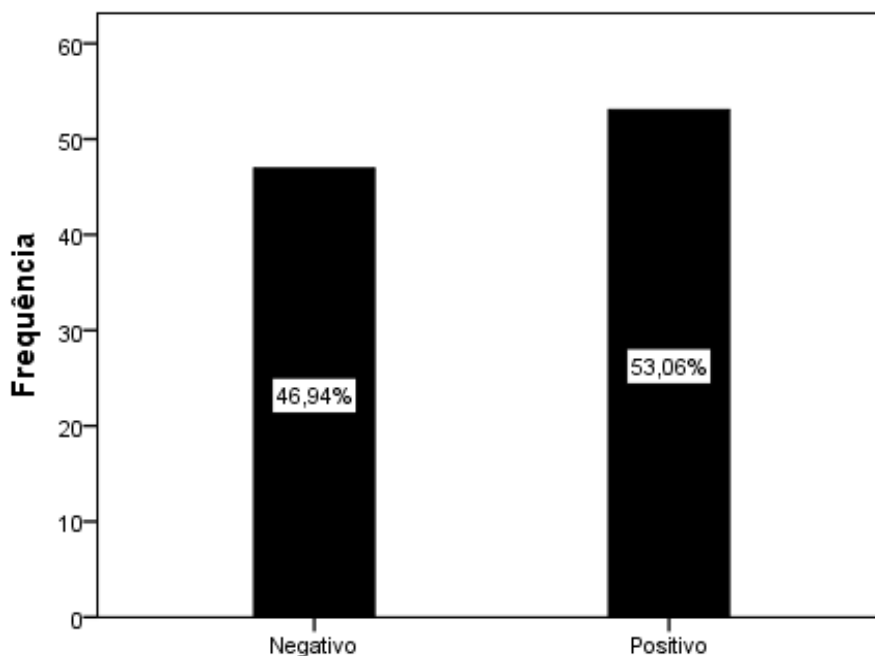


Tabela 6. Distribuição dos pacientes do grupo viral Alphavírus pelos anticorpos IgM e IgG.

Anticorpos	Nº de pacientes
IgM+ e IgG+	24
IgM+	4
IgG+	24

O grupo 3, denominado Contato exclusivo com DENV (Figura 23), possui 16 pacientes (Figura 24), sendo 56,3% pacientes com diagnóstico de neuropatia do SNC, e 43,8% pacientes com diagnóstico de neuropatia do SNP (Figura 27). De todos os pacientes deste grupo, 15 foram positivos para IgG e somente 1 foi positivo para IgM (Tabela 7).

Figura 23. Fotomicrografia da imunofluorescência indireta realizada em pacientes positivos para o vírus da Dengue. **A.** Controle negativo (Aumento de 200X). **B.** Marcação de anticorpos IgG presentes na amostra do paciente (Aumento de 200X). **C.** Marcação de anticorpos IgG presentes na amostra do paciente (Aumento de 400X).

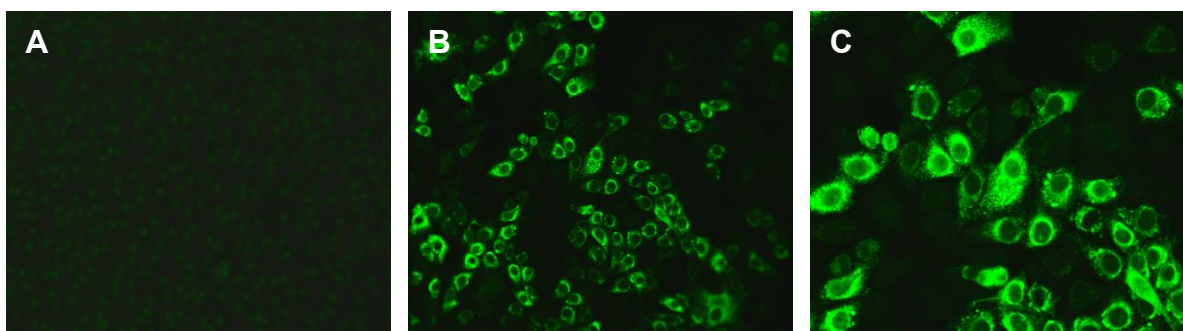


Figura 24. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos exclusivamente para DENV.

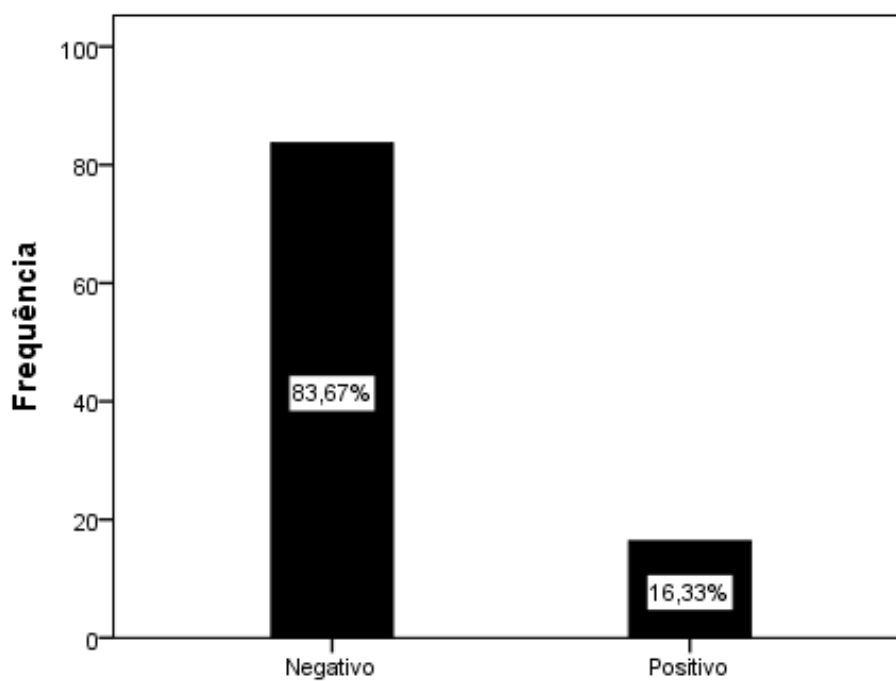


Tabela 7. Distribuição dos pacientes do grupo viral Contato exclusivo com DENV pelos anticorpos IgM e IgG.

Anticorpos	Nº de pacientes
IgM+ e IgG+	0
IgM+	1
IgG+	15

O grupo 4, denominado Contato exclusivo com ZIKV (Figura 25), possui 1 paciente (Figura 26), sendo este o único com diagnóstico de neuropatia do SNC (Figura 27). A amostra obteve somente IgG positivo com IgM negativo (Tabela 8).

Figura 25. Fotomicrografia da imunofluorescência indireta realizada em pacientes positivos para o vírus da Zika. **A.** Controle negativo (Aumento de 200X). **B.** Marcação de anticorpos IgG presentes na amostra do paciente (Aumento de 200X). **C.** Marcação de anticorpos IgG presentes na amostra do paciente (Aumento de 400X).

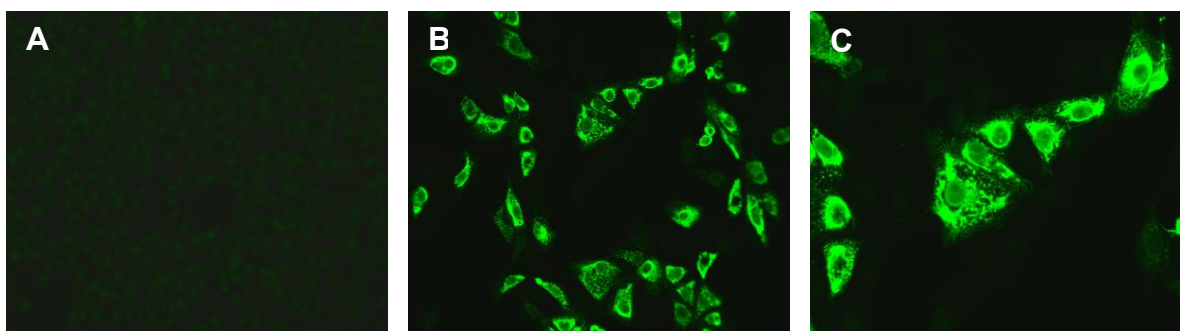


Figura 26. Porcentagem de pacientes com anticorpos positivos exclusivamente para ZIKV.

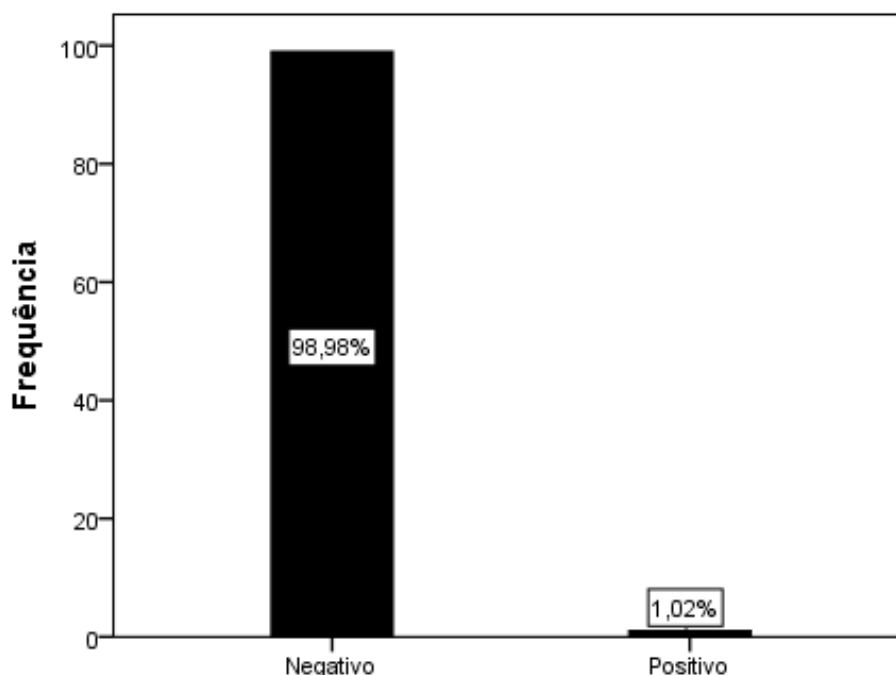
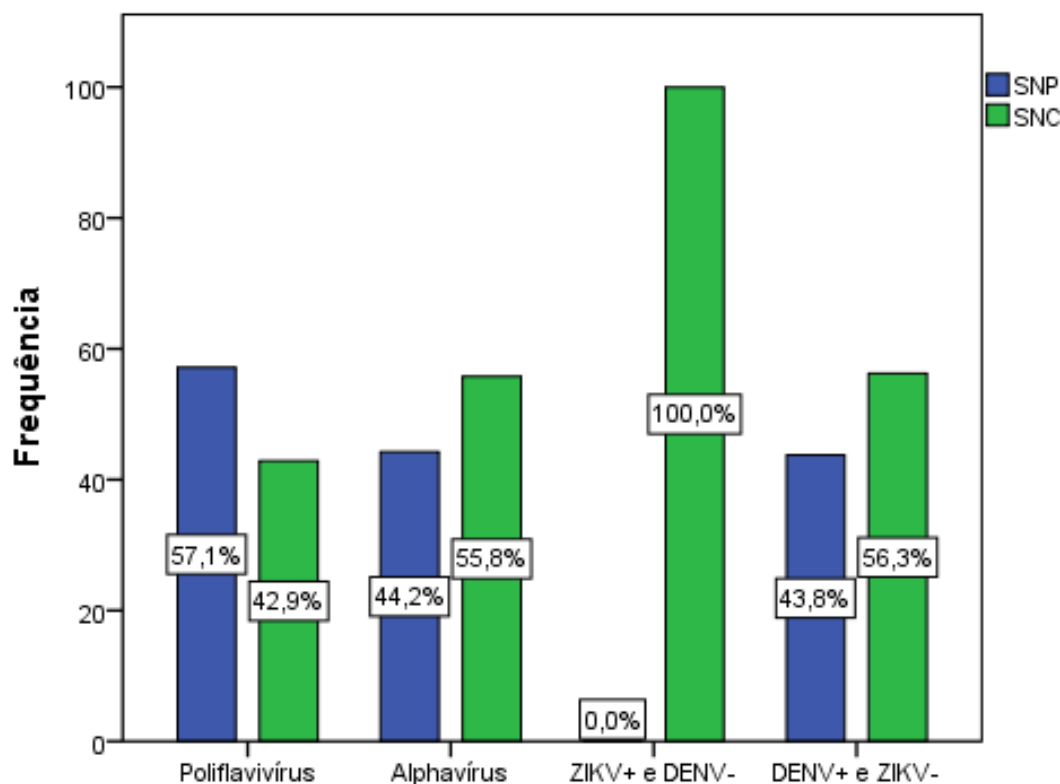


Tabela 8. Distribuição dos pacientes do grupo viral Contato exclusivo com ZIKV pelos anticorpos IgM e IgG.

Anticorpos	Nº de pacientes
IgM+ e IgG+	0
IgM+	0
IgG+	1

Dentro dos grupos virais, as amostras puderam ser divididas em diagnóstico envolvendo o SNC e SNP. A figura 27 representa a frequência, em porcentagem, dessas amostras nos seus respectivos grupos. É possível visualizar que o diagnóstico de SNC obteve maiores valores em quase todos os grupos virais, com porcentagem acima de 55%. A exceção é encontrada no grupo Poliflavivírus, no qual o diagnóstico de SNP se sobressai com 57%.

Figura 27. Porcentagem de pacientes infectados por arbovírus manifestando neuropatias no Sistema Nervoso Central e Sistema Nervoso Periférico.



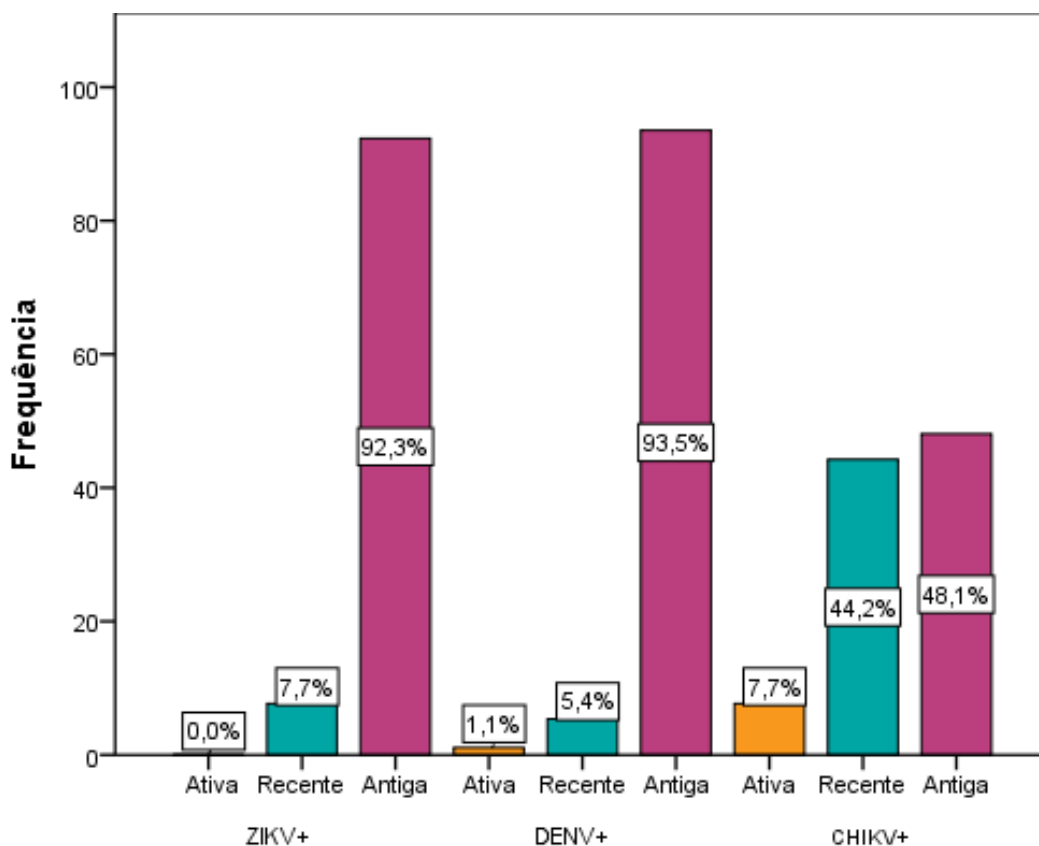
6.2.2. Perfil virológico dos participantes do estudo

Através da combinação da IFI e do ELISA, estimou-se o período virológico dos pacientes. Estes foram estratificados em três momentos: Infecção ativa (IgM+/IgG-), Soro convertendo – infecção recente (IgM+/IgG+) e Convalescente, ou seja, infecção antiga (IgM-/IgG+). Devido ao tempo decorrido entre o início dos sintomas clínicos sugestivos de infecção por arbovírus até a realização da coleta da amostra, a maioria dos pacientes já se encontravam num período convalescente da infecção, apresentando um status sorológico IgM negativo.

O período virológico foi determinado para todos os pacientes independente se eles tiveram uma, duas ou três infecções. Portanto, dos 78 pacientes que haviam sido infectados pelo ZIKV, 92,3% deles encontravam-se em período convalescente e somente 7,7% em período de infecção recente. Dentre os 93 pacientes com

positividade para DENV, 93,5% apresentaram, assim como o ZIKV, infecção antiga, 5,4% infecção recente e 1,1% infecção ativa. O CHIKV, diferente dos dois vírus anteriores, apresentou valores mais próximos entre os períodos. Sendo assim, dos 52 pacientes com infecção para o CHIKV, 48,1% estavam com infecção antiga e 44,2% estavam com infecção recente. Um número considerável de 7,7% pacientes apresentou CHIKV como infecção ativa (Figura 28).

Figura 28. Frequência, em porcentagem, do período virológico em que os pacientes se encontravam para vírus. O período virológico foi estratificado em infecção ativa, infecção recente e infecção antiga.



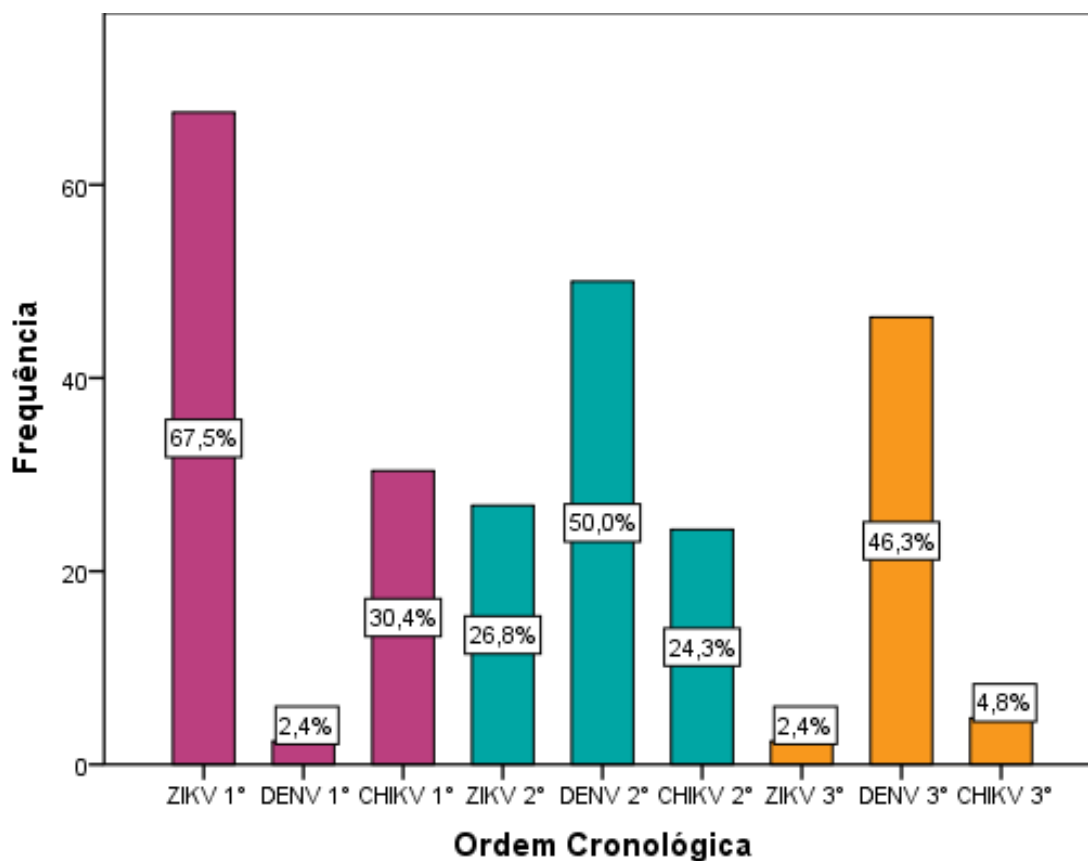
6.2.3. Infecção mais recente

Para ser possível estimar qual vírus causou a infecção mais recente, empregou-se a titulação nas amostras de soro dos pacientes. A titulação foi realizada através de uma diluição seriada onde há um ponto de corte. Este ponto

indica que um dos vírus é mais alto que o outro, sendo possível supor que o vírus que apresentar o maior valor é considerado como a infecção mais recente.

A ordem cronológica das infecções foi analisada somente nos pacientes com duas ou três infecções. O ZIKV foi a infecção mais recente (67,5%). Como infecção intermediária, o DENV obteve maior porcentagem (50%). Ordenando como infecção mais antiga, destacou-se o DENV com 46,3% (Figura 29).

Figura 29. Distribuição da ordem cronológica em que ocorreram as infecções por arbovírus.



6.2.4. Perfil de autoanticorpos dos participantes do estudo

6.2.4.1. Anti-MOG e anti-AQP4

Das 98 amostras, apenas duas foram positivas para os autoanticorpos anti-MOG (Figura 30). Estes pacientes possuíam em comum a febre como sintoma viral.

O aspecto neurológico também foi similar, assim como o diagnóstico neurológico pré-determinado pelos centros que as enviaram. Outra similaridade entre as duas amostras foi que elas pertenciam ao mesmo grupo viral (Tabela 9). O teste para autoanticorpos anti-AQP4 foi negativo para todas as amostras analisadas.

Figura 30. Fotomicrografia de células HEK-293T evidenciando a ligação dos anticorpos anti-MOG aos antígenos que são expressos nas células (Aumento de 20X).

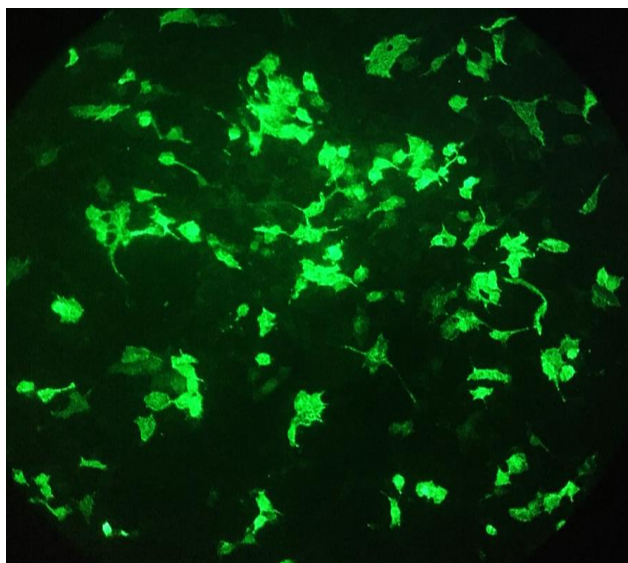


Tabela 9. Aspectos virais, neurológicos e diagnóstico das amostras positivas para autoanticorpos anti-MOG.

Aspectos viral	Aspectos neurológicos	Diagnóstico neurológico	Grupo viral
Febre, exantema e cefaleia	Déficit motor, sensitivo e esfinteriano	Mielopatia	Poliflavivírus
Febre e sintomas articulares	Déficit motor, sensitivo e esfinteriano	Mielopatia	Poliflavivírus

6.2.4.2. Anti-gangliosídeos

Não houve positividade para anticorpos IgG contra qualquer gangliosídeo nas 50 amostras analisadas. No entanto, foi encontrada, em 8 pacientes, uma positividade fraca para anticorpos IgM contra alguns dos gangliosídeos medidos, considerada *borderline* (Tabela 10). Cinco pacientes com SGB apresentaram

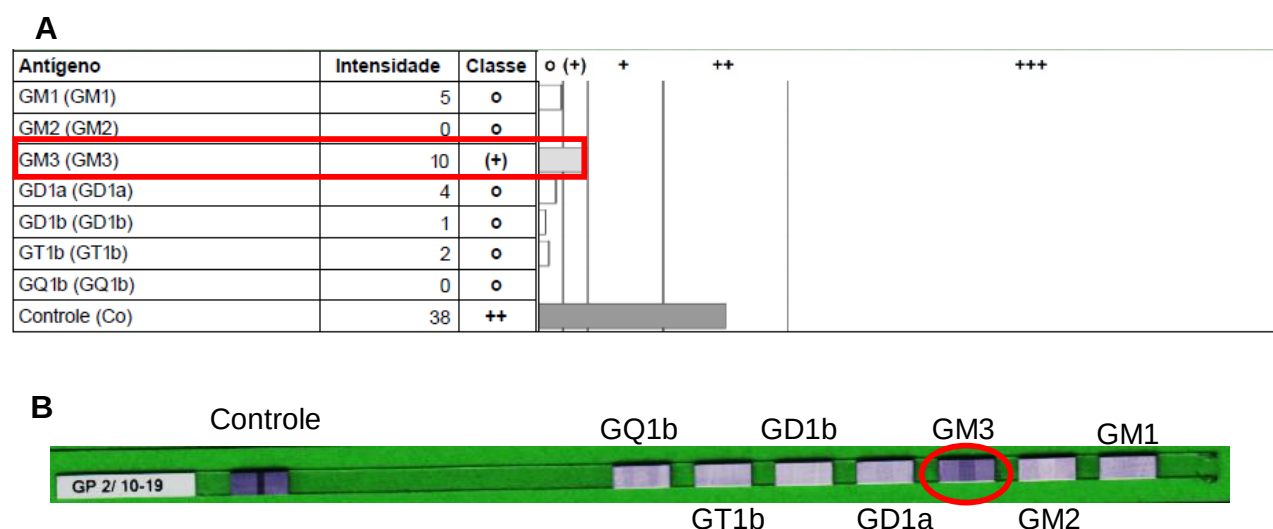
anticorpos contra GM1, GM2, GM3 e GD1b, dois pacientes com CIDP apresentaram anticorpos contra GM1 e GM2 e um paciente com polineuropatia aguda apresentou anticorpos contra GM1.

As tiras de *immunoblot* foram digitalizadas utilizando um *scanner* de bancada e avaliadas através do *Software* EUROLinScan. A figura 31 exemplifica o método de detecção de anticorpos para os gangliosídeos (GM3) utilizando o *scanner* e o *software* EUROLinScan.

Tabela 10. Valores fornecidos no kit de *immunoblot* da EUROIMMUN para interpretação dos resultados.

Avaliação visual	Sinal de Intensidade - EUROLinScan	Resultado
Sem sinal	0 - 5	Negativo
Banda muito fraca	6 - 10	<i>Borderline</i>
Banda média a forte	11 - 50	Positivo
Banda muito forte	> 50	Positivo Forte

Figura 31. Figura representativa da detecção de GM3 por *immunoblot* pelo *Software* EUROLinScan. **A.** Valor da intensidade do sinal fornecido pelo *software*. **B.** Avaliação visual da banda.



Fonte: O autor.

6.3. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS APRESENTADOS PELOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

A análise dos aspectos neurológicos foi realizada pelos médicos neurologistas dos respectivos centros do Nordeste e Sudeste do Brasil. Dos 98 pacientes analisados, déficit motor, déficit sensitivo e alteração do sensório foram os aspectos neurológicos com maior expressão (Tabela 11).

Tabela 11. Sintomas neurológicos apresentados pelos pacientes em associação à infecção viral.

Variáveis	Nº de pacientes (Frequência)
Déficit motor	69 (32,1%)
Déficit sensitivo	49 (22,8%)
Alteração do sensório ^a	26 (12,1%)
Ataxia	20 (9,3%)
Paralisia facial	20 (9,3%)
Alteração esfinteriana	9 (4,2%)
Visuais ^b	9 (4,2%)
Crises epiléticas	8 (3,7%)
Sinais de irritação meníngea	2 (0,9%)
Oftalmoparesia	2 (0,9%)
Hipoacusia	1 (0,5%)

^aCompreende alteração de nível de consciência, delirium e/ou desorientação tempo/espaço.

^bCompreende baixa acuidade visual e/ou escotomas.

6.4. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS VIRAIS APRESENTADOS PELOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

A análise dos aspectos clínicos foi realizada por profissional treinado com base no que é preconizado pelo Ministério da Saúde em relação aos sintomas para infecção por arbovírus. Dos 98 pacientes, 84 foram sintomáticos. Febre, sintomas articulares e exantema foram os sintomas mais frequentes nos pacientes (Tabela 12).

Tabela 12. Sintomas virais apresentados pelos pacientes infectados com arbovírus.

Variáveis	Nº de pacientes (Frequência)
Febre	64 (20,7%)
Articulares ^a	52 (16,8%)
Exantema	40 (12,9%)
Cefaléia	36 (11,6%)
Mialgia	34 (11%)
Astenia	33 (10,6%)
Sintomas gastrointestinais ^b	23 (7,4%)
Prurido	17 (5,5%)
Dor retroorbitária	7 (2,2%)
Conjuntivite	3 (0,9%)

^aCompreende artralgia, edema articular e artrite.

^bCompreende diarreia, vômito e náusea.

6.5. DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS NEUROLÓGICOS APRESENTADOS PELOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Os diagnósticos neurológicos foram pré-determinados pelo médico neurologista responsável pelo acompanhamento dos casos de cada centro que enviou as amostras. A tabela 13 demonstra, por ordem crescente, as neuropatias tanto do SNC quanto do SNP desenvolvidas pelos pacientes.

Tabela 13. Neuropatias identificadas em pacientes atendidos nos quatro centros.

Variáveis	Nº de pacientes
Síndrome de Guillain-Barré e variantes	33 (33,3%)
Outras neuropatias ^a	20 (21,2%)
Encefalite	15 (15,2%)
Mielopatia	14 (14,1%)
Encefalomielite Disseminada Aguda	11 (11,1%)
Neuromielite Óptica	3 (3%)
Neurite Óptica	2 (2%)

^aCompreende Polineuropatia Aguda, CIDP e Mononeurite.

6.6. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS NEUROLÓGICOS ESTRATIFICADOS POR GRUPOS VIRAIS

Ao analisar os aspectos neurológicos com os quatro principais grupos virais, foi possível verificar que tanto os sintomas de déficit motor, quanto o sensitivo, estavam prevalentes. Apesar disso, alterações do sensório, que compreende alteração de nível de consciência, delirium e/ou desorientação quanto ao tempo/espaço, estavam presentes em mais de 40% dos pacientes positivos para Alphavírus (Tabela 14).

Tabela 14. Sintomas neurológicos manifestados pelos pacientes distribuídos nos respectivos grupos virais.

Sintomas neurológicos	Poliflavivírus	Alphavírus	ZIKV+ DENV-	DENV+ ZIKV-
Sintomas visuais	6 (7,8%)	5 (9,6%)	0 (0%)	2 (12,5%)
Oftalmoparesia	1 (1,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,3%)
Paresia facial	17 (22,1%)	4 (7,7%)	0 (0%)	3 (18,8%)
Hipoacusia	1 (1,3%)	1 (1,9%)	0 (0%)	0 (0%)
Sinais de irritação meníngea	2 (2,6%)	2 (3,8%)	0 (0%)	0 (0%)
Alterações do sensório	22 (28,6%)	22 (42,3%)	0 (0%)	3 (18,8%)
Crises epiléticas	5 (6,5%)	6 (11,5%)	0 (0%)	2 (12,5%)
Ataxia	16 (20,8%)	12 (23,1%)	0 (0%)	3 (18,8%)
Déficit motor	56 (72,7%)	30 (57,7%)	1 (100%)	11 (68,8%)
Déficit sensitivo	42 (54,5%)	25 (48,1%)	0 (0%)	6 (37,5%)
Alteração Esfincteriana	8 (10,4%)	3 (5,8%)	0 (0%)	1 (6,3%)

6.7. DESCRIÇÃO DOS SINTOMAS CLÍNICOS ESTRATIFICADOS POR GRUPOS VIRAIS

Na comparação entre os grupos virais e os sintomas clínicos sugestivos das infecções, os pacientes dos grupos Poliflavivírus, ZIKV+ e DENV+ obtiveram a febre

como principal aspecto, sendo mais de 60% dos pacientes que desenvolveram esta sintomatologia. Já no grupo viral Alphavírus, mais de 80% dos pacientes tiveram problemas articulares, incluindo artralgia, edema articular e artrite (Tabela 15).

Tabela 15. Sintomas clínicos manifestados pelos pacientes subdivididos nos grupos virais.

Sintomas virais	Poliflavivírus	Alphavírus	ZIKV+ DENV-	DENV+ ZIKV-
Febre	49 (63,6%)	40 (76,9%)	1 (100%)	11 (68,8%)
Sintomas gastrointestinais	17 (22,1%)	14 (26,9%)	1 (100%)	3 (18,8%)
Milagia	26 (33,8%)	24 (46,2%)	0 (0%)	6 (37,5%)
Articulares	41 (53,2%)	42 (80,8%)	0 (0%)	8 (50%)
Conjuntivite	3 (3,9%)	3 (5,8%)	0 (0%)	0 (0%)
Exantema	34 (44,2%)	31 (59,6%)	0 (0%)	4 (25%)
Prurido	14 (18,2%)	15 (28,8%)	0 (0%)	2 (12,5%)
Cefaleia	29 (37,7%)	24 (46,2%)	0 (0%)	6 (37,5%)
Dor retrorbitária	7 (9,1%)	6 (11,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Astenia	25 (32,5%)	27 (51,9%)	1 (100%)	5 (31,3%)
Ausência de sintomas virais	11 (14,3%)	2 (3,8%)	0 (0%)	3 (18,8%)

6.8. DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS NEUROLÓGICOS ESTRATIFICADOS POR GRUPOS VIRAIS

Separando as análises do SNC do SNP, observou-se que cada grupo viral teve um diagnóstico prevalente, sendo no grupo Poliflavivírus, ADEM em mais de 14% dos pacientes. Tanto no grupo Alphavírus como o grupo DENV+, 23% e 25% dos pacientes, respectivamente, foram diagnosticados com encefalite. Já em relação ao SNP, mais de 33% dos pacientes que compõem o grupo Poliflavivírus foram diagnosticados com SGB. O mesmo foi encontrado no grupo DENV+, em 37% dos pacientes diagnosticados. Já 25% dos pacientes do grupo Alphavírus foram

diagnosticados com outras neuropatias, sendo elas, Polineuropatia Aguda, CIDP e Mononeurite (Tabela 16).

Tabela 16. Diagnóstico neurológico dos pacientes infectados por arbovírus distribuídos nos seus respectivos grupos virais.

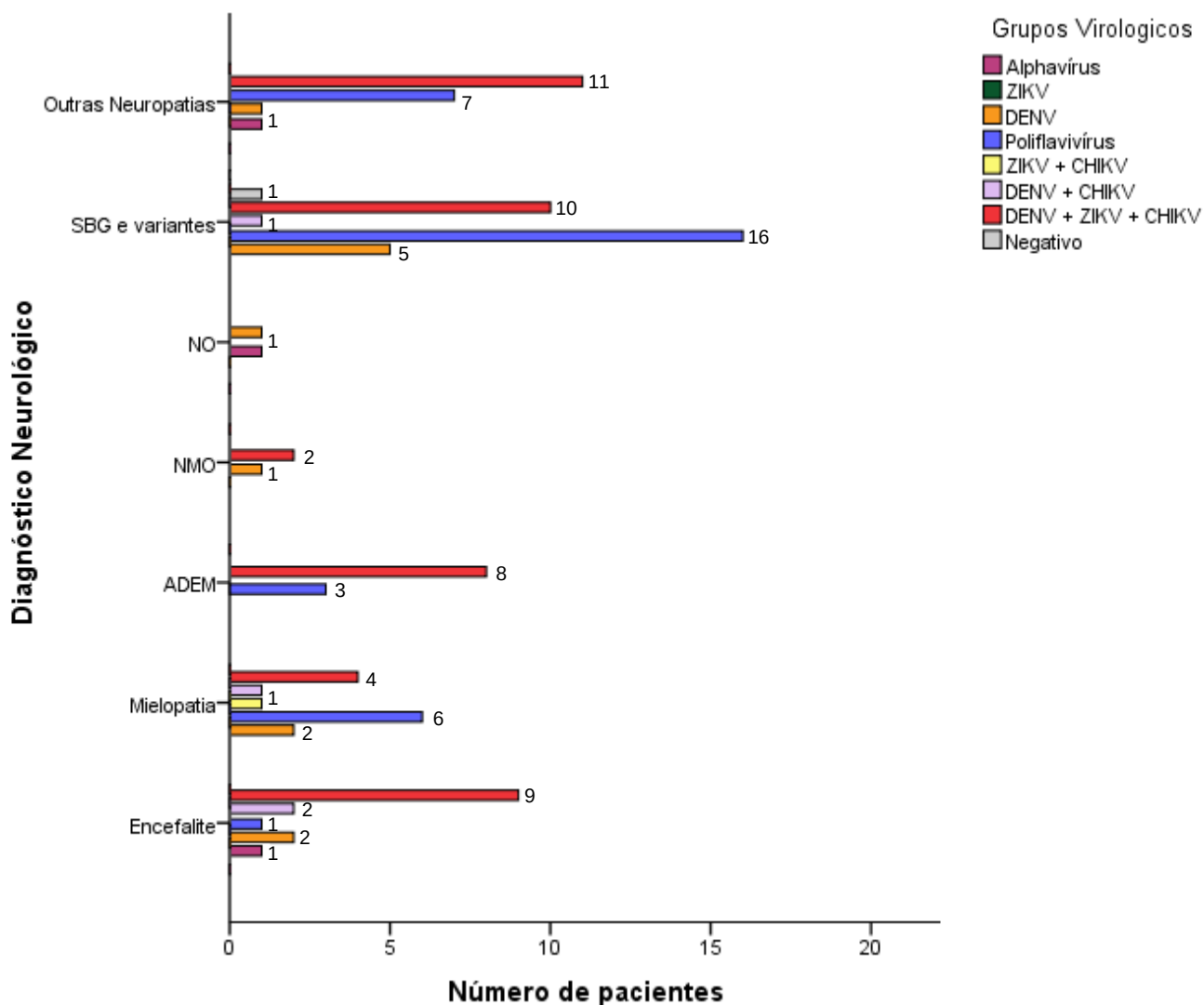
Diagnóstico neurológico	Poliflavivírus	Alphavírus	ZIKV+ DENV-	DENV+ ZIKV-
Encefalite	10 (13%)	12 (23,1%)	0 (0%)	4 (25%)
Mielopatia	10 (13%)	6 (11,5%)	1 (100%)	3 (18,8%)
ADEM	11 (14,3%)	8 (15,4%)	0 (0%)	0 (0%)
NMOSD	2 (2,6%)	2 (3,8%)	0 (0%)	1 (6,3%)
Neurite óptica	0 (0%)	1 (1,9%)	0 (0%)	1 (6,3%)
SGB e variantes	26 (33,8%)	11 (21,2%)	0 (0%)	6 (37,5%)
Outras neuropatias ^a	18 (23,4%)	13 (25%)	0 (0%)	1 (6,3%)

^aCompreende Polineuropatia Aguda, CIDP e Mononeurite.

6.9. DESCRIÇÃO DOS DIAGNÓSTICOS NEUROLÓGICOS DE PACIENTES QUE ENTRARAM EM CONTATO COM UM A TRÊS ARBOVÍRUS

Ao relacionar a frequência de neuropatias do SNC e SNP com os pacientes que entraram em contato com um, dois ou três arbovírus, a presença de neuropatias foi maior quando o paciente teve contato com os três arbovírus, sendo o diagnóstico prevalente intitulado Outras Neuropatias, ou seja, Polineuropatia Aguda, CIDP e Mononeurite. Poliflavivírus foi o segundo grupo com maior número de acometimento, sendo o diagnóstico SGB maior (Figura 32).

Figura 32. Frequência de neuropatias do SNC/SNP em pacientes que tiveram contato com um, dois ou três arbovírus.

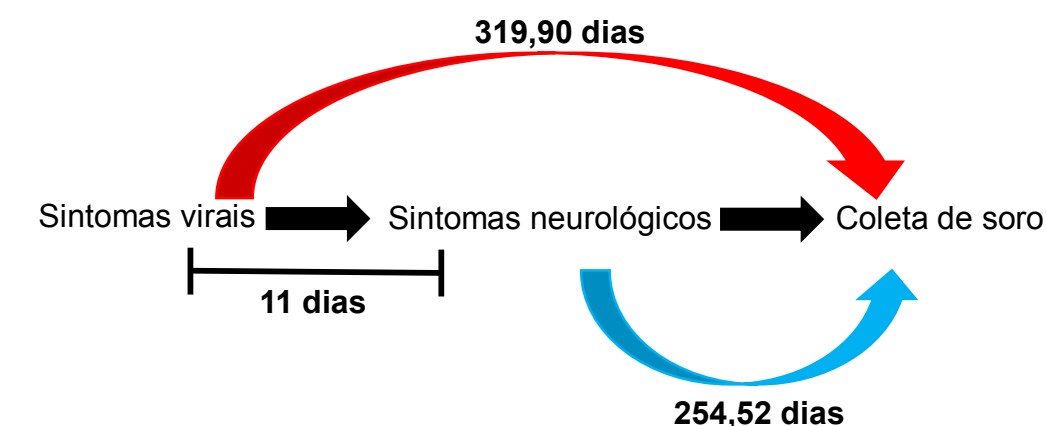


6.10. DESCRIÇÃO DO PERÍODO ENTRE SINTOMAS VIRAIS, NEUROLÓGICOS E COLETA DAS AMOSTRAS DOS PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO

O valor médio entre os dias em que os pacientes iniciaram os sintomas clínicos sugestivos de arboviroses e a chegada a um centro especializado em atendimento neurológico foi de 319,90 (DP 375,42) dias. Já o valor médio entre os dias em que os pacientes começaram a relatar sintomas neurológicos até a

admissão em centro especializado foi de 254,52 (DP 355,60) dias. O valor da mediana entre o início dos sintomas sugestivos de arbovirose e o início dos sintomas neurológicos foi de 11 dias (IQR 5,25 – 25,75) (Figura 33).

Figura 33. Dias decorridos entre o início dos sintomas clínicos sugestivos de arbovirose e a coleta da amostra, início dos sintomas neurológicos e a coleta da amostra e entre o início dos sintomas clínicos sugestivos de arbovirose e início dos sintomas neurológicos.

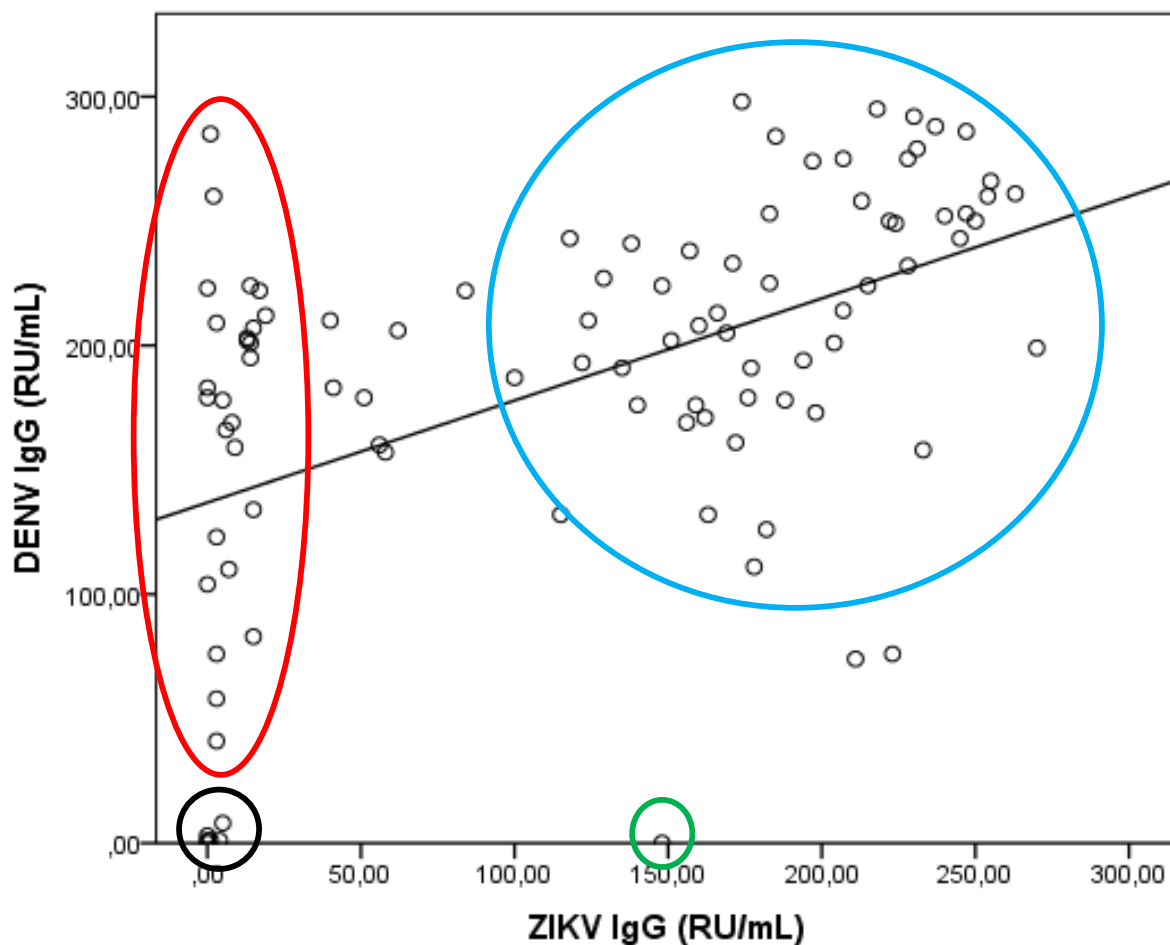


Fonte: O autor.

6.11. CORRELAÇÃO ENTRE OS TÍTULOS DE DENV E ZIKV

Considerando que populações com circulação simultânea dos vírus são passíveis de imprecisão devido ao risco de reação cruzada com epítomos comuns, podendo levar a resultados falsos positivos, os valores sorológicos para ZIKV e DENV foram correlacionados. Através da análise dos títulos dos anticorpos IgG, em relação a DENV e ZIKV, verificou-se que uma parte das amostras foram positivas somente para DENV, enquanto uma única amostra foi positiva somente para ZIKV. A grande parte das amostras ficaram num limiar em que não é possível distinguir se são positivas somente para DENV, somente para ZIKV ou para os dois vírus. Um número pequeno de amostras foram negativas para os dois vírus (Figura 34).

Figura 34. Distribuição das amostras conforme o título do anticorpo IgG tanto para DENV quanto para ZIKV.



Destaque em vermelho: amostras positivas somente para DENV; *Destaque em verde:* amostra positiva somente para ZIKV; *Destaque em azul:* não é possível distinguir se a amostra é positiva somente para DENV, somente para ZIKV ou para os dois vírus; *Destaque em preto:* amostras negativas para os dois vírus. O teste utilizado foi o Rho de Spearman com coeficiente de correlação de 0.538 sendo $p < 0,0001$.

7. DISCUSSÃO

O Brasil é considerado um país favorável para disseminação viral, uma vez que possui uma ampla extensão territorial e altos índices de vetores competentes para transmitir arbovírus. Além disso, possui uma condição climática de temperatura e umidade que beneficia a dinâmica populacional dos mosquitos do gênero *Aedes*. Atualmente, dentre as arboviroses que apresentam maior circulação, estão o DENV, CHIKV e ZIKV. Estes vírus representam um grave problema de saúde pública pois compartilham os mesmos vetores, se sobrepõem em suas áreas endêmicas e apresentam manifestações clínicas semelhantes, especialmente nos estágios iniciais da infecção (Pabbaraju et al., 2016). No entanto, a maior preocupação são os pacientes que desenvolvem complicações neurológicas pós infecção viral (Acevedo et al., 2017a). O desafio é que algumas dessas manifestações neurológicas são consideradas fenômenos auto-imunes pós-infecciosos como a SGB, mielite transversa e ADEM (Da Cruz et al., 2018).

7.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

O Ministério da Saúde do Brasil, através de boletins epidemiológicos realizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, fornece dados de carácter técnico-científico com foco na investigação e resposta à alteração do padrão de ocorrência de doenças causadas pelos ZIKV, DENV e CHIKV no país. O acesso a esses dados é livre, e a periodicidade é mensal e semanal. Através da consulta a esses boletins foi possível confirmar que, entre os anos de 2015 a 2018, as regiões que compreendem Fortaleza, Recife, Sobral e Rio de Janeiro (Nordeste e Sudeste) estavam sempre em primeiro ou segundo lugar no ranking das regiões com maiores números de casos notificados e confirmados para os três arbovírus estudados. Além disso, os primeiros seis casos neurológicos associados ao ZIKV, no Brasil, foram observados em um hospital de referência em neurologia de Pernambuco (Brito Ferreira et al., 2017). Este hospital forneceu 38,8% das amostras para o presente estudo.

Em relação a faixa etária, neste trabalho, foram incluídos pacientes com idades bem discrepantes, desde 7 anos até 88 anos. Considerando esta diferença significativa entre as idades, pode ocorrer discordância quanto a média geral de idade de pacientes em relação a literatura. Já nas séries onde foram avaliados pacientes adultos, não houve divergência com a literatura. A idade média dos pacientes foi de 48 anos o que está, em parte, de acordo com o estudo de Malta et al., (2017). Este autor investigou casos de SGB e outras complicações neurológicas advindas da infecção por DENV, CHIKV e ZIKV, na região metropolitana de Salvador/BR, em pacientes com idade em torno de 44 anos (Malta et al., 2017). Da Silva et al., (2017) com o objetivo de avaliar as taxas de infecção por ZIKV entre pacientes hospitalizados com complicações neurológicas, também obteve uma amostra com idade mediana de 44 anos (Da Silva et al., 2017).

O estudo aqui proposto obteve pequena variação entre o número de participantes do sexo masculino e feminino, tendo uma breve inclinação de 51% para o sexo masculino. Esse dado vai de acordo com os trabalhos de Acevedo et al., (2017a) e Malta et al., (2017), onde as porcentagens do sexo masculino também foram maiores, 62,5% e 56%, respectivamente. Provavelmente, as mulheres buscam mais pelos serviços de saúde enquanto os hábitos comportamentais dos homens, frente à busca pelos serviços de saúde, são mais displicentes.

7.2. CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Somente com base nos dados clínicos, é extremamente difícil diferenciar as infecções causadas pelos ZIKV, DENV e CHIKV, pois todos eles podem manifestar sintomas muito semelhantes. Assim, o diagnóstico laboratorial é essencial durante um surto de arboviroses, ainda mais em locais com casos endêmicos (Da Cruz et al., 2018). Como as infecções pelos arbovírus se tornaram um problema de saúde global, a Organização Mundial da Saúde publicou vários algoritmos para um diagnóstico preciso das doenças (Granger et al., 2017). O critério padrão baseia-se principalmente na demonstração do vírus em fluidos corporais por meio da análise de PCR em tempo real para detectar o RNA viral; entretanto, sua positividade é muito transitória, geralmente persistindo não mais do que 5 a 7 dias no sangue (Da

Cruz et al., 2018; Steinhagen et al., 2016). Algumas das manifestações neurológicas em adultos são consideradas fenômenos auto-imunes pós-infecciosos, e no período do desenvolvimento dos sintomas, o RNA viral pode não ser mais detectável. Portanto, é recomendado a avaliação sorológica para anticorpos da classe IgM e IgG, por meio de um ELISA, considerando que os anticorpos permanecem detectáveis por um período mais longo (Da Cruz et al., 2018; Granger et al., 2017; Vieira et al., 2018b).

A maioria dos serviços de saúde utiliza os testes sorológicos para confirmação de casos suspeitos de infecção por arbovírus (Charrel, 2016). Do ponto de vista biológico, estes testes são considerados qualitativos, pois permitem estimar se houve o contato entre o vírus e o organismo do paciente. Porém nesta forma de detecção, pode ocorrer uma reatividade cruzada entre ZIKV e DENV, dificultando a interpretação, e podendo levar a resultados não confiáveis (Vieira et al., 2018b). Collins et al., (2017) e Anaya et al., (2017), observaram uma extensa reatividade cruzada entre o DENV e o ZIKV, confirmando que anticorpos de ligação reativa cruzada são mantidos por muitos anos após a infecção (Anaya et al., 2017; Collins et al., 2017). Nossos resultados também demonstraram uma elevada reatividade cruzada entre ZIKV e DENV. Como o ZIKV surgiu em áreas com altas taxas de prevalência de DENV, a extensão da reatividade cruzada de anticorpos entre esses dois vírus precisa ser cuidadosamente avaliada. A reatividade cruzada na ligação de IgG entre esses vírus, claramente ocorre, consistente com a homologia de sequência e similaridade estrutural entre diferentes sorocomplexos de flavivírus (Collins et al., 2017).

Através da detecção sorológica, foi possível observar que houve a circulação de ZIKV, DENV e CHIKV nos estados de PE, CE e RJ, durante os anos de 2015, 2016, 2017 e 2018. Conforme os boletins epidemiológicos fornecidos pelo Ministério da Saúde, sabe-se que nestas regiões ocorreram a co-circulação dos três arbovírus. A maioria dos pacientes desta investigação foram positivos para o grupo Poliflavivírus (78%), ou seja, ZIKV e DENV positivo. Porém, não se sabe se houve reações cruzadas entre esses dois vírus. O número elevado de pacientes neste grupo pode ser atribuído à falta de imunidade populacional, pois o vírus da DENV

emergiu no Brasil em 1981, já o vírus da ZIKV foi mais recente, no ano de 2015 (Lessler et al., 2016), acometendo indivíduos susceptíveis. Além disso, ambas arboviroses compartilham o mesmo vetor, favorecendo a rápida expansão dos vírus por diversas localidades, especialmente regiões Nordeste e Sudeste.

O tempo médio entre os sintomas clínicos de ZIKV, DENV e/ou CHIKV e o surgimento de manifestações neurológicas foi de 11 dias. Nos relatos de Brito et al., (2017), o tempo médio variou de 3 a 5 dias, já no estudo de Anaya et al., (2017), o valor médio foi 8 dias e no estudo de Cao-Lormeau et al., (2016), uma média de 6 dias (Anaya et al., 2017; Brito Ferreira et al., 2017; Cao-Lormeau et al., 2016). O curto espaço de tempo entre a apresentação clínica da infecção viral e o aparecimento das manifestações neurológicas, pode indicar um efeito neuropático direto do vírus. Já nos casos de SGB, podem indicar mecanismos imunomediados com síntese de anticorpos que danificam os nervos periféricos e raízes espinhais que ocorre semanas após a apresentação clínica da infecção viral.

A coleta das amostras ocorreu, em média, 319 dias após o início dos sintomas virais, justificando o quase inexistente anticorpo IgM positivo para os arbovírus. Valor elevado também foi encontrado por Anaya et al., (2017) com uma média de 108 dias (Anaya et al., 2017). A coleta das amostras foi tardia pois os sintomas neurológicos começaram muitos dias após o início da infecção aguda. Outro motivo está no atendimento inicial dos pacientes em unidades básicas de saúde, e somente então encaminhados aos hospitais referências em neurologia, onde realizou-se a investigação completa para definição da etiologia.

7.3. PERFIL DE AUTOANTICORPOS

Neste estudo procuramos avaliar a presença de autoanticorpos contra MOG e AQP4 nos pacientes que manifestaram complicações neurológicas pós infecção por arbovírus. Assim como Anaya et al., (2017), anticorpos anti-AQP4 não foram observados na população estudada (Anaya et al., 2017). No entanto, anticorpos anti-MOG foram positivos em dois pacientes. Sabe-se que os sintomas mais comuns em pacientes com NMOSD e anticorpos anti-MOG positivo são neurite óptica e mielite transversa longitudinalmente extensa (LETM). A neurite óptica foi a

primeira manifestação clínica, em 64% dos pacientes, já a mielite ocorreu em 33% dos pacientes, como sintoma inicial. Conforme revisão de Armangue et al., (2016), anticorpos anti-MOG têm sido associados a vários tipos de transtornos desmielinizantes em crianças, sendo predominante em ADEM, seguido por ordem de frequência em NMOSD, neurite óptica e LETM (Armangue et al., 2016). De acordo com o estudo desenvolvido por Cobo-Calvo et al., (2017), de 177 pacientes com suspeita de transtornos desmielinizantes, 27 foram positivos para anticorpos anti-MOG. Dos 27 pacientes, 9 foram diagnosticados com mielite monofásica isolada (3 pediátricos e 6 adultos) (Cobo-Calvo et al., 2017). Já no estudo de Sepúlveda et al., (2016), foram analisadas 846 amostras de soro, 56 foram positivas para anticorpos anti-MOG e 10 apresentaram mielite isolada. Dados deste, e de outros estudos, sustentam que a neurite óptica, LETM, NMOSD e ADEM são as principais síndromes associadas a anticorpos anti-MOG (Sepúlveda et al., 2016). Da Costa et al., (2017) também relata que anticorpos anti-MOG são observados em várias síndromes clínicas, tais como NMOSD, neurite óptica, mielite isolada, ADEM e em EM pediátrica (Costa et al., 2017). Sendo assim, os dois pacientes que foram positivos para anticorpos anti-MOG, neste estudo, tiveram mielopatia como diagnóstico neurológico corroborando com a literatura.

Em relação aos anticorpos anti-gangliosídeos, nenhum paciente foi positivo para anticorpos IgG, o que também foi verificado no estudo de Anaya et al., (2017) através da técnica de *imunoblot* (Anaya et al., 2017). Já os anticorpos anti-gangliosídeos IgM, 8 pacientes (16%) obtiveram uma positividade fraca sendo considerados *bordeline* para GM1, GM2, GM3 e GD1b. O estudo de Langerak et al., (2016), apresentou três pacientes do Suriname com diagnóstico de SGB durante o surto de ZIKV. Não foram encontrados anticorpos anti-gangliosídeos IgM e IgG no soro desses pacientes (Langerak et al., 2016). Conforme descrito por Van Doorn et al., (2016), anticorpos anti-gangliosídeos são encontrados apenas em cerca de 50% dos casos de SGB, e sua ausência não descarta o diagnóstico de SGB (Van Doorn; Jacobs, 2016). O estudo de Nico et al., (2018), relata que a SGB ocorre, geralmente, devido a infecção prévia por *Campylobacter jejuni*. Esse patógeno tem epítomos semelhantes a gangliosídeos, acarretando em um mimetismo molecular. O

mimetismo molecular é um mecanismo pelo qual as infecções precedentes podem desencadear a produção de anticorpos de reação cruzada aos gangliosídeos, conforme demonstrado para a SGB relacionada ao *C. jejuni*. No entanto, a origem da autoimunidade na SGB pós infecção por ZIKV ainda não está clara, uma vez que anticorpos anti-gangliosídeos foram encontrados apenas em uma fração pequena de pacientes (Nico et al., 2018). Segundo Bonyadi et al., (2010), a frequência de anticorpos anti-GM1, em diferentes séries de pacientes com SGB, varia de menos de 2% a cerca de 30% (Bonyadi et al., 2010). Além disso, Schessl et al., (2007), relata que anti-gangliosídeos raramente são mostrados em mais de 30% dos pacientes com SGB (Schessl et al., 2007). Todos os estudos mencionados estão de acordo com os nossos achados aonde não foram encontrados positividade para anticorpos anti-gangliosídeos.

7.4. SINTOMAS VIRAIS MANIFESTADOS PELOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

A maioria dos pacientes deste estudo, 85,7%, relataram sintomas de infecção viral prévia, antes do início das manifestações neurológicas. Esse resultado está de acordo com os estudos anteriores realizados na Polinésia Francesa, que mostraram sintomas em 88% dos casos (Cao-Lormeau et al., 2016).

Analizando os achados clínicos, observou-se que os pacientes apresentaram manifestações típicas da fase aguda da infecção, como a febre, causados pelos ZIKV, DENV e CHIKV (Poliflavivírus - 63,6%) (ZIKV reativo - 100%) (DENV reativo - 68,8%). Este dado vai de acordo com relatos de que a febre é um dos sintomas mais comuns durante a infecção por ZIKV, DENV e CHIKV (Acosta-Ampudia et al., 2018; Anaya et al., 2017; Carod-Artal et al., 2013; Da Cruz et al., 2018; Vieira et al., 2018b). No entanto, no estudo de Brito Ferreira et al., (2017), o rash foi o sintoma mais encontrado seguido por febre. No estudo de Cao-Lormeau et al., (2016), a erupção cutânea (81%), artralgia (74%) e febre (58%) foram os sintomas mais comumente relatados. Apesar das diferenças na frequência dos sintomas relatados nesses artigos em comparação com os nossos achados, os sintomas virais descritos são sugestivos de infecção pelos ZIKV, DENV e CHIKV.

No grupo viral Alphavírus, o sintoma mais frequente foi problemas articulares (80,8%). Estes sintomas vão de acordo com a literatura que destaca a poliartralgia como sintoma mais característico de infecção pelo CHIKV. Os estudos de Mehta et al., (2018b), Campos et al., (2018), Da Cruz et al., (2018) e Costa-da-silva et al., (2017) destacam a artralgia como frequente na fase aguda da infecção durando de 1 a 2 semanas. O segundo sintoma mais encontrado no nosso estudo, foi a febre em 76,9% dos pacientes com CHIKV. Conforme Campos et al., (2018) e Costa-da-Silva et al., (2017), a infecção por CHIKV também está associada a febre com início súbito, dor nas costas, dor de cabeça, fotofobia e erupção cutânea. Em relação a poliartralgia, acredita-se que esse sintoma se deve à produção das citocinas pró-inflamatórias IL-7 e IL-15 (Borgherini et al., 2007; Chow et al., 2011). A IL-6 também parece ser fundamental para a persistência da artrite causada pelo CHIKV por meio da osteoclastogênese (Ng et al., 2009).

7.5. PERFIL NEUROLÓGICO DOS PACIENTES INFECTADOS PELOS ARBOVÍRUS

As infecções pelos arbovírus ZIKV, DENV e/ou CHIKV têm sido associadas a uma série de manifestações neurológicas. Em adultos, um elevado número de síndromes como a SGB, mielite transversa, encefalite, ADEM e meningoencefalite, são relatadas.

7.5.1. Manifestações neurológicas dos pacientes infectados pelo vírus Chikungunya

Ao se tratar de CHIKV (Alphavírus), as complicações neurológicas são responsáveis por até 25% dos casos atípicos, e de até 60% dos casos atípicos graves. Os casos variam de encefalite, neurite óptica ou mielorradiculite a SGB. Os sinais neurológicos, muitas vezes, iniciam após um intervalo sem sintomas de uma a três semanas, apontando para um processo autoimune (Vieira et al., 2018b). Ainda é desconhecido o exato mecanismo patogênico pelo qual há acometimento do SNC, no entanto, já foi demonstrado o neurotropismo de cepas africanas e asiáticas do CHIKV em camundongos, por meio de lesões cerebrais (Griffin, 2005).

Microevolução genômica, distúrbios imunológicos e interações vírus-hospedeiro, de uma maneira global, podem ser fatores influentes na neurovirulência do CHIKV (Schuffenecker et al., 2006).

No estudo de Crosby et al., (2016), as manifestações neurológicas relacionadas ao CHIKV foram observadas em 18 pacientes (28%). Cinco pacientes (8%) apresentaram distúrbios do SNC, sendo que três deles preencheram os critérios para encefalite, e dois apresentaram isquemia cerebral difusa, levando à morte encefálica (Crosby et al., 2016). Segundo Crosby et al., (2016) e Rajapakse (2010), a infecção pelo CHIKV pode afetar o sistema nervoso. Até o momento, a encefalite parece representar a manifestação neurológica mais comum, relatada em 19 dos 33 pacientes hospitalizados na UTI durante as epidemias das ilhas Reunião (Lemant et al., 2008). No estudo de Mehta et al., (2018), a apresentação clínica mais comum da doença neurológica associada à infecção por CHIKV, em adultos, foi a encefalite, responsável por 322 (40,5%) dos 781 pacientes descritos (Mehta et al., 2018b). No estudo de Viera et al., (2018), a encefalite acometeu 47,2% dos pacientes e destes, 17% haviam tido contato com CHIKV (Vieira et al., 2018b). No presente estudo, 23,1% dos pacientes receberam diagnóstico para encefalite pós infecção por CHIKV, apresentado uma porcentagem semelhante ao estudo de Crosby et al., (2016).

A incidência da SGB relacionada ao CHIKV (21,2%) neste estudo, é consistente com relatos de epidemias anteriores. Na Polinésia Francesa, entre 2014 e 2015, foram relatados 66.000 casos de infecções por CHIKV e destes, 50 desenvolveram SGB. No Hospital Terciário da Polinésia Francesa, 9 pacientes foram internados por SGB com base em avaliação clínica e com resultado sorológico positivo tanto para IgM quanto para IgG para CHIKV (Oehler et al., 2015). No estudo de Wielanek et al., (2007), foram relatados 3 casos de pacientes com SGB após infecção pelo CHIKV, na ilha da Reunião. A ilha sofreu um grande surto de CHIKV envolvendo 38% da população (297.000 casos). Em comum, os três pacientes desenvolveram formigamento, fraqueza e paralisia facial em torno de 7 dias após sintomas como febre, artralgia e erupção cutânea. Através de testes neurofisiológicos, foi confirmada a SGB, e através de testes sorológicos, a infecção

por CHIKV (Wielanek et al., 2007). Lebrun et al., (2009), também relatou dois casos de SGB pós infecção por CHIKV. Os sintomas iniciais foram febre, artralgia, erupção cutânea e diarreia. Uma semana depois, os pacientes desenvolveram fraqueza motora e distúrbios sensoriais. O diagnóstico de SGB foi baseado em resultados da eletromiografia que mostrou sinais típicos da síndrome, e a infecção por CHIKV foi detectada no soro dos dois pacientes (Lebrun et al., 2009). Agarwal et al., (2017) descreveu dois casos de SGB ocorridos na Índia, aonde a apresentação neurológica foi grave e ambos pacientes necessitaram de suporte ventilatório (Agarwal et al., 2017). O estudo de Balavoine et al., (2017) demonstrou que 48% dos casos estudados desenvolveram SGB relacionado ao CHIKV. O diferencial deste estudo é que os pacientes eram mais velhos, com idade média de 61 anos (Balavoine et al., 2017). Embora outros surtos de doenças virais, como ZIKV, tenham sido exhaustivamente relacionados a SGB, a ameaça do CHIKV ainda é menos relatada. O tropismo neurológico do CHIKV parece ser menor do que o de outros arbovírus, como DENV, vírus do Nilo Ocidental ou febre amarela, mas vários estudos descreveram, especialmente durante epidemias, manifestações neurológicas como SGB.

Como outras infecções virais, o CHIKV pode desencadear uma síndrome inflamatória aguda envolvendo o parênquima cerebral e a medula espinhal, que é considerada uma resposta imunomediada à infecção, e não devido à invasão viral direta. Essa síndrome é chamada de ADEM (Mait et al., 2014). O estudo de Teixeira et al., (2019) descreve o caso de uma paciente com sinais clássicos de CHIKV e sintomas neurológicos onde, através de análise do LCR e ressonância magnética, foi possível confirmar o diagnóstico de ADEM. O CHIKV foi positivo no soro e no LCR, confirmando-o como agente etiológico (Teixeira; Ferreira; Neto, 2018). Conforme diagnóstico de ADEM pós infecção por CHIKV, descrito por Taraphdar et al., (2015), o paciente iniciou com sintomas clínicos como febre, mialgias severas, dores de cabeça e desorientação e após desenvolveu fraqueza nos quatro membros, semiconsciência e fraqueza cardíaca. Tanto as amostras de soro quanto de LCR foram positivas para CHIKV através de ELISA. Os achados de ressonância magnética demonstraram lesões fechando diagnóstico de ADEM (Taraphdar; Roy;

Chatterjee, 2015). Musthafa et al., (2008) relata um caso, no Sul da Índia, em que um paciente desenvolveu febre, dor e inchaço nas articulações durante surto de CHIKV no país. Seis dias após o início dos sintomas, ele desenvolveu tetraplegia progressiva, problema de fala e reflexos alterados. O soro do paciente foi positivo para CHIKV. Através de ressonância magnética foi possível ver múltiplas lesões consistentes com ADEM (Musthafa; Abdurahiman; Jose, 2008). No nosso estudo, 15,4% dos pacientes tiveram o diagnóstico de ADEM e infecção confirmada por CHIKV.

Em relação a mielopatia, a partir de relatos da epidemia que assombrou a Índia em 2005, Wadia (2007) relata que dos 74 pacientes atendidos com manifestações neurológicas, 33 (44,6%) tinham sinais de mielopatia, 16 apresentavam mielopatia como característica predominante e 4 tinham mielopatia isolada. O estudo mostrou que a epidemia é causada pelo genótipo do CHIKV da África central/oriental e não pelo genótipo asiático que causou epidemias anteriores na Índia. Como esta é uma nova cepa, a falta de imunidade pode ser um fato para essa enorme epidemia (Wadia, 2007). Conforme estudo realizado no distrito de Nagpur, uma província no Oeste da Índia, por Chandak et al., (2009), dos 300 pacientes com CHIKV vistos durante o período de junho a dezembro de 2006, 49 apresentaram complicações neurológicas. As complicações incluíram encefalite (n = 27), mielopatia (n = 7), neuropatia periférica (n = 7), mieloneuropatia (n = 7) e miopatia (n = 1) (Chandak et al., 2009). Na Índia, no ano de 2006, Tandale et al., (2009) relata as síndromes neurológicas em casos de Ahmedabad e Pune. Síndromes neurológicas foram detectadas em 40 casos de Ahmedabad, e em 59 casos de Pune. Dos 99 pacientes, 14 foram diagnosticados com mielopatia e 12 com mieloneuropatia (Tandale et al., 2009). Todos os estudos relatados anteriormente demonstram mielopatias pós CHIKV ficando semelhante ao deste estudo aonde foram encontrados 11,5% dos pacientes com diagnóstico de mielopatias.

O envolvimento ocular na infecção por CHIKV inclui múltiplas manifestações que vão desde o comprometimento do segmento anterior até o desenvolvimento de lesões no polo posterior (Martínez-Pulgarín et al., 2016). Dentre

as manifestações oculares estão uveíte, episclerite, panuveíte, neurite óptica, paralisia do sexto nervo, neurite retrobulbar, retinite, ceratite, descolamento de retina e glaucoma secundário (Lalitha et al., 2007; Mahendradas et al., 2008; Murthy et al., 2008; Rose et al., 2011). O mecanismo exato do envolvimento do nervo óptico após a infecção pelo CHIKV é desconhecido, no entanto, a manifestação ocular pode estar presente no momento da doença sistêmica ou após a resolução da doença sistêmica (Martínez-Pulgarín et al., 2016). No estudo de Mittal (2007), de 15 pacientes, 14 desenvolveram algum problema visual, e destes, 12 pacientes tiveram envolvimento do nervo óptico na forma de papilite, neurite retrobulbar ou neurorretinite. Os dois pacientes restantes possuíam características sugestivas de comprometimento do trato óptico. O início simultâneo da doença sistêmica e ocular em 5 pacientes sugere envolvimento viral direto, no entanto, os 9 pacientes restantes apresentaram comprometimento tardio do nervo óptico, sugerindo uma resposta imune tardia (infecção pós-viral) (Mittal, 2007). Rose et al., (2011) relatou as características dos seus 10 pacientes com neurite óptica associada a infecção por CHIKV. As possíveis causas podem ser o envolvimento viral direto e uma resposta imune retardada após uma infecção viral (Rose et al., 2011). Os sintomas oftalmológicos podem ser observados em casos agudos ou crônicos de CHIKV. No entanto, fotofobia e dor retro-orbital são características principalmente da fase aguda da CHIKV (Mahendradas; Avadhani; Shetty, 2013). Células endoteliais e epiteliais da córnea, bem como ceratócitos esclerais, são descritos como alvos preferenciais de CHIKV (Martínez-Pulgarín et al., 2016). A uveíte anterior, granulomatosa ou não granulomatosa, é o sintoma ocular mais comumente associado a doença, já os distúrbios do nervo óptico são os sintomas menos comuns (Giacomin et al., 2018). O nosso estudo demonstrou um valor bem reduzido de pacientes com neurite óptica e NMOSD (1,9% e 3,8%, respectivamente). Estudos abordando NMOSD e CHIKV são escassos, o que reflete a falta de casos com esse diagnóstico.

7.5.2. Manifestações neurológicas dos pacientes infectados pelo vírus Dengue

As manifestações neurológicas têm sido observadas há muito tempo entre os casos de DENV (Wan Sulaiman et al., 2017). Como a incidência de DENV aumentou nas últimas duas décadas, uma variedade de manifestações neurológicas também começaram a ser relatadas. Desde 2009, a Organização Mundial da Saúde considerou a presença de manifestações neurológicas como um marcador de apresentação de Dengue Grave (Vieira et al., 2018b).

A SGB é relacionada não somente com o ZIKV, mas também com o DENV. A infecção pelo DENV que precede a SGB foi descrita em diversos relatos de casos de pacientes com manifestações neurológicas. O relato de Kumar e Prabhakar (2005) trata sobre um paciente que apresentou febre, mialgia, dor lombar grave e erupção cutânea por 3 dias. O diagnóstico virológico foi confirmado por PCR e sete dias depois, o paciente desenvolveu fraqueza de início agudo e arreflexia. A SGB foi confirmada por testes eletrofisiológicos (Kumar; Prabhakar, 2005). Ralapanawa et al., (2015) relata o caso de um paciente do Sri Lanka que apresentou febre, dor de cabeça e mialgia por 3 dias. O diagnóstico de DENV foi confirmado, pois ele apresentou teste de antígeno NS1 positivo para DENV. Seis dias após os sintomas iniciais, o paciente apresentou fraqueza flácida aguda em todos os membros. A eletromiografia e o LCR apresentavam evidências de SGB (Ralapanawa; Kularatne; Jayalath, 2015). Esack et al., (1999) descreveram um caso de SGB com confirmação eletroneuromiográfica e sorologia IgM positiva para DENV (Esack; Teelucksingh; Singh, 1999). Santos et al., em 2004, publicaram um caso de SGB no 7º dia de evolução do DENV (Santos et al., 2004). Gonçalves (2011) relata o caso de uma criança com sintomas virais, incluindo febre, mialgia e paresia, que obteve a confirmação de diagnóstico, por teste sorológico, para DENV. A paciente desenvolveu SGB 20 dias após o início dos sintomas virais, com a confirmação sendo feita por exames de LCR e achados de eletrofisiológicos (Gonçalves, 2011). Há diversos outros relatos que relacionam a SGB pós infecção por DENV, estando de acordo com os nossos achados (Oehler et al., 2011; Qureshi et al., 2012; Ralapanawa; Kularatne; Jayalath, 2015; Santos et al., 2004; Soares et al., 2008). Conforme nossos resultados, o grupo composto por ZIKV e DENV obteve 33,8%

dos pacientes diagnosticados com SGB além de 37,5% dos pacientes do grupo somente com DENV.

Encefalite e encefalopatia são as complicações parainfecciosas neurológicas mais comumente descritas durante a fase aguda do DENV, enquanto as complicações no período pós-infecção incluem ADEM, neurite óptica, SGB e mielite transversa (Carod-Artal et al., 2013; Lana-Peixoto et al., 2018; Vieira et al., 2018b; Wan Sulaiman et al., 2017). Segundo avaliação retrospectiva da Indonésia, Hendarto et al., (1992) relata que 6% dos pacientes com DENV positivo, desenvolveram encefalopatia (Hendarto; Hadinegoro, 1992). No estudo de Domingues et al., (2008), 61% dos pacientes com características de infecção por DENV foram classificados como portadores de encefalite (Domingues et al., 2008). Em vários estudos realizados em áreas endêmicas, uma grande proporção de encefalites foi causada pelo DENV. No entanto, embora o envolvimento do SNC seja incluído como critério para Dengue Grave na classificação de casos da OMS de 2009, não foram estabelecidas definições de casos padronizados ou critérios diagnósticos para encefalite ou encefalopatia por DENV, o que leva ao uso inconsistente desses termos em publicações (Carod-Artal et al., 2013). No nosso estudo, o segundo diagnóstico mais encontrado em pacientes com DENV foi a encefalite (25%). Evidências recentes sugerem que o DENV tem capacidade neuroinvasiva aonde infiltrados perivasculares e alterações endoteliais mediados por citocinas pró-inflamatórias, durante o quadro viral, favorecem o aumento da permeabilidade capilar com quebra da BHE, justificando a presença do vírus ou anticorpo no sistema nervoso (Cam et al., 2001).

Diversos estudos relacionando a mielite transversa pós infecção por DENV já foram descritos. Seet et al., (2006) relata o caso de uma paciente internada com febre, dor nas articulações e erupções cutâneas. Dezesesseis dias depois, a paciente desenvolveu fraqueza, retenção urinária e dormência nos membros inferiores e superiores. Foi feito diagnóstico clínico de mielopatia torácica e o diagnóstico virológico confirmado por sorologia (Seet; Lim; Wilder-Smith, 2006). Chanthamat et al., (2010) descreveu o caso de uma mulher com sintomas de febre, cefaleia e petéquias generalizadas. Após três dias de tratamento, ela desenvolveu retenção

urinária seguida de paraplegia aguda com perda sensitiva. A avaliação neurológica, juntamente com a ressonância magnética, confirmou a suspeita de mielopatia. A confirmação de contato com DENV foi por teste sorológico (Chanthamat; Sathirapanya, 2010). No estudo retrospectivo de Puccioni-Sohler et al., (2009) envolvendo 10 pacientes com manifestações neurológicas associadas a infecção por DENV em diversas instituições do RJ, a infecção aguda por DENV foi confirmada através de IgM positivo no teste ELISA. Dentre esses 10 pacientes, 3 foram diagnosticados com mielopatia. O diagnóstico de mielopatia foi confirmado pelo teste de ressonância magnética (Puccioni-Sohler et al., 2009). Salomon et al. (2000) relataram no seu estudo uma série de 21 pacientes aonde dois desenvolveram mielite (Solomon et al., 2000). No estudo de Ferreira et al., (2005) em uma coorte de 41 pacientes, dois obtiveram diagnóstico de mielite (Ferreira et al., 2005). Soares et al., (2006) descreveram 2 casos de mielite numa série de 13 pacientes (Soares et al., 2006). O envolvimento da medula espinhal pode acontecer em pacientes com DENV durante e após a infecção. A invasão direta do vírus pode ocorrer na fase parainfecciosa, enquanto os fatores imunomediados são notados após a infecção (Carod-Artal et al., 2013). Nos casos de mielopatia, a invasão da infecção viral na medula espinhal produz um local específico de resposta imune (Puccioni-Sohler et al., 2009). O nosso estudo apresenta 18,8% de pacientes com DENV reativo e diagnóstico de mielopatia.

O comprometimento dos nervos ópticos é descrito como uma das complicações neurológicas do DENV. Preechawat et al., (2005) descreveram um caso de neurite óptica bilateral após infecção pelo DENV (Preechawat; Poonyathalang, 2005). De Aragão et al., (2010) relata dois casos de neurite bilateral pós infecção por DENV. Ambos apresentavam baixa acuidade visual, papilite e alterações no campo visual. A contaminação por DENV foi avaliada no soro. Os pacientes foram avaliados detalhadamente para determinar a causa da neurite. Como ambos apresentaram sorologia positiva para DENV sem nenhuma outra causa aparente de neurite e também pelo fato da neurite ter resolvido espontaneamente, como pode ocorrer em doenças virais, concluiu-se que os casos resultaram da infecção pelo DENV (De Aragão, 2010). De Sousa et al., (2006)

relatou um caso de criança brasileira que desenvolveu NMO após uma semana dos sintomas de DENV. A infecção foi confirmada através do soro e do LCR (De Sousa et al., 2006). Lana-Peixoto et al., (2018) traz dois relatos de pacientes que apresentaram sintomas sugestivos de infecção por arbovírus e, após alguns dias, realizaram exames sorológicos que identificaram o DENV no soro dos pacientes. Um dos pacientes iniciou episódios de náuseas, vômitos, vertigem e zumbido. O outro desenvolveu perda de visão. Através de um ensaio baseado em células HEK-293 transfectadas, foi possível determinar que o anticorpo AQP4 era positivo para os dois pacientes, iniciando o tratamento para NMOSD (Lana-Peixoto et al., 2018). Puccioni-Sohler et al., (2017) relatou o caso de uma paciente com viremia por DENV e diagnóstico de NMOSD. A infecção por DENV foi detectada por RT-PCR (Puccioni-Sohler et al., 2017). Conforme demonstrado pelos estudos anteriores, casos de neurite óptica já foram relatados e nosso estudo encontrou 6,3% dos pacientes com esse diagnóstico e associação ao DENV. No entanto, casos de NMOSD pós infecção por DENV ainda não são rotineiros e nosso estudo encontrou somente um paciente.

7.5.3. Manifestações neurológicas dos pacientes infectados pelo vírus Zika

Desde o início da epidemia global do ZIKV, diferentes países relataram um aumento na incidência de SGB em paralelo com o aumento da incidência de infecção por ZIKV (Leonhard et al., 2018). Em 2013–2014, um aumento na ocorrência de casos neurológicos, especialmente da SGB, foi relatado na Polinésia Francesa após a epidemia de ZIKV, sendo estabelecida pela primeira vez em um estudo caso-controle (Oehler et al., 2014). No Brasil, os primeiros surtos da doença foram registrados em novembro de 2014, especialmente nos estados de Pernambuco e Rio Grande do Norte (Pan American Health Organization, 2016). A partir de então, o ZIKV foi associado a SGB, bem como a outros distúrbios neurológicos em adultos (Acevedo et al., 2017b; Acosta-Ampudia et al., 2018; Aid et al., 2017; Campos et al., 2018). Parra et al., (2016), demonstrou que, de 2015 a 2016, ocorreram 2.603 infecções por ZIKV na Colômbia, e dentre elas, 401 pacientes com alguma síndrome neurológica. Dos 401 pacientes, 270 (67%)

correspondiam a SGB (Parra et al., 2016). Langerak et al., (2016) descreveu três casos de SGB, no Suriname, em 2016. No ano de 2015, foi observado um aumento de 5 a 10 vezes na incidência de SGB. Neste estudo, dois pacientes tiveram fraqueza muscular nas pernas, e parestesias nas mãos e pés. Eles também desenvolveram erupções cutâneas, olhos vermelhos e artralgia sete dias antes do início dos sintomas de fraqueza e parestesias. Devido a apresentação típica de sintomas sugestivos de SGB e ausência de sintomas confundidores, o diagnóstico foi concluído. O terceiro paciente apresentou paralisia do nervo facial periférico e nenhum sintoma viral. Após alguns dias internado, o paciente desenvolveu fraqueza muscular e arreflexia em todos os membros. O PCR para ZIKV foi realizado na urina dos três pacientes. Amostras de soro, plasma e LCR também foram analisadas (Langerak et al., 2016). No estudo de Anaya et al., (2017), 69% dos pacientes com ZIKV foram diagnosticados com SGB e os pacientes restantes foram classificados com outros distúrbios neurológicos. Dentro deste grupo, 6 pacientes apresentavam mielite transversa, 3 apresentavam encefalite e 1 apresentava mielopatia (Anaya et al., 2017). É possível verificar que nossos resultados possuem uma semelhança com o estudo citado, pois o único paciente ZIKV reativo, foi diagnosticado com mielopatia. Encontramos uma proporção inferior de casos de SGB (33,8%) e esse grupo de pacientes era composto por DENV e ZIKV reativo.

A partir do surto da infecção pelo ZIKV, surgiram relatos de outros casos de síndromes neurológicas, como mielite aguda. Mécharles et al., (2016) descreve o caso de um paciente do Caribe que desenvolveu hemiparesia, dor lombar aguda e fraqueza nos membros superiores, no entanto, sete dias antes ele havia demonstrado cefaleia e hiperemia conjuntival. Através de PCR foi detectado altas concentrações de ZIKV no soro, urina e LCR. O diagnóstico de mielopatia foi confirmado através de ressonância magnética (Mécharles et al., 2016). Conforme revisão de Da Cruz et al., (2018), com a descrição de casos de infecção pelo ZIKV e complicações neurológicas, há relatos sugerindo a associação entre mielopatia e o vírus. O comprometimento da medula espinhal no ZIKV pode variar, e relatos anteriores descreveram diferentes formas de envolvimento. Os sintomas clínicos são diversos e dependem da localização e extensão da lesão (Da Cruz et al., 2018).

Palacios et al., (2016), relata o caso de um paciente com dor pélvica seguida de retenção urinária. Após 24 horas, ele desenvolveu perda progressiva de força nos membros inferiores. Os sintomas eram compatíveis com mielite transversa e a infecção pelo ZIKV foi confirmada por PCR no soro (Palacios et al., 2019). Conforme Acosta-Ampudia et al., (2018), aproximadamente metade dos casos de mielopatia é parainfecciosa, isto é, a lesão neurológica pode estar associada a infecção microbiana direta, ou infecção indireta, seguida por uma resposta sistêmica, induzindo lesão neural. Entre os agentes causadores da mielopatia parainfecciosa estão bactérias, parasitas, fungos e vírus. Em relação a infecção viral, recentemente, o ZIKV parece ser um novo agente desencadeante da doença, uma vez que em alguns países onde ocorreram surtos, casos associados à mielopatia têm sido relatados (Acosta-Ampudia et al., 2018). No nosso estudo, 13% dos pacientes tiveram diagnóstico de mielopatia, no entanto, esses pacientes eram ZIKV e DENV positivo.

Da Cruz et al., (2018) relata que, semelhante às observações de outras infecções virais, a infecção por ZIKV também pode estar relacionada à ADEM (Da Cruz et al., 2018). O estudo de Brito Ferreira et al., (2017), descreve os primeiros seis casos neurológicos associados ao ZIKV no Brasil. Entre os seis, somente um teve diagnóstico de ADEM relacionado à infecção pelo vírus (Brito Ferreira et al., 2017). Alves-Leon et al., (2019) descreveu a detecção de ZIKV em um paciente com EM com evento de ADEM. Os anticorpos IgM e IgG foram positivos para ZIKV em soro e urina. Uma resposta imune concomitante a infecção por ZIKV pode estar envolvida nos mecanismos da síndrome tipo ADEM (Alves-Leon et al., 2019). O estudo de Niemeyer et al., (2017), relata o caso de um paciente que apresentou tetraplegia, retenção urinária e redução do nível de consciência. Este paciente tinha um histórico de infecção por ZIKV 3 semanas antes destes sintomas. O exame neurológico confirmou o diagnóstico de ADEM, e o PCR, a infecção pelo vírus (Niemeyer et al., 2017). Os nossos resultados totalizam 14,3% dos pacientes com diagnóstico de ADEM e infecção por ZIKV e DENV.

O nosso estudo obteve dois casos de NMOSD em pacientes com infecção pelos DENV e ZIKV (2,6%). O relato de caso feito por Aspahan et al., (2019),

demonstra que um paciente infectado por DENV desenvolveu, 18 meses depois, sintomas sugestivos de infecção por arbovírus. A confirmação de infecção pelo ZIKV foi realizada através de exames de PCR no sangue, urina e saliva. Este paciente demonstrou parestesias em membros inferiores e face, vertigem, constipação, vômito, sonolência e perda auditiva. O paciente preenchia os critérios 1 para NMOSD com AQP4-IgG negativa (Aspahan et al., 2019).

A encefalite associada ao ZIKV está relacionada a uma série de desfechos clínicos, desde a recuperação completa, até a morte (Leonhard et al., 2018). Vieira et al., (2018), relata o caso de um paciente de 8 anos que teve sintomas epilépticos, além de ataxia cerebelar, espasmos e déficit intelectual. Três dias após estes sintomas, a criança apresentou febre, sonolência e adinamia. O LCR foi testado para ZIKV, que deu positivo. Conforme as definições de casos de encefalite da *Brighton Collaboration*, o caso se enquadrava no nível 3 de certeza diagnóstica (Vieira et al., 2018a). Rozé et al., (2016) descreveu dois casos de encefalite que ocorreram no Caribe, em 2016. Um dos pacientes apresentou episódio de convulsões seis horas após o aparecimento de sintomas, como febre, artralgia, astenia e cefaleia. O outro paciente demonstrou confusão mental aguda, distúrbio de fala e paralisia facial. Sintomas como conjuntivite, edema bilateral das mãos e artrite estavam presentes. A detecção do ZIKV por PCR no soro, urina e LCR foi positiva para os dois pacientes. A encefalite foi confirmada através dos critérios diagnósticos definidos pela *Brighton Collaboration* (Rozé et al., 2016). Soares et al., (2016) relata o primeiro caso fatal de encefalite associada ao ZIKV. A paciente do Brasil apresentou erupção cutânea e artralgia. Quatro dias depois, ela desenvolveu fraqueza nos membros inferiores, disartria e confusão. No mesmo dia em que foi internada, seu quadro clínico deteriorou rapidamente. A análise por PCR e ELISA para o ZIKV foi positivo na urina, soro e LCR, e uma tomografia computadorizada do cérebro confirmou o diagnóstico de encefalite (Soares et al., 2016). O presente estudo demonstra 13% dos pacientes com diagnóstico de encefalite e contato viral com ZIKV e DENV.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- O grupo viral Poliflavivírus obteve maior positividade em comparação aos demais grupos;
- O SNP apresentou maior positividade em relação ao SNC;
- A maior parte dos pacientes apresentou os três vírus como infecção antiga;
- Em ordem cronológica das infecções, ZIKV foi a infecção mais recente, dentre os três vírus;
- Não foi encontrada positividade para os anticorpos anti-gangliosídeos IgG;
- Em 8 pacientes encontrou-se uma positividade fraca (borderline) para os anticorpos anti-gangliosídeos IgM (GM1, GM2, GM3 e GD1b);
- Os autoanticorpos anti-AQP4 foram negativos para todas as amostras, e o anti-MOG, positivo somente para duas amostras. Provavelmente, o mecanismo relacionado ao desenvolvimento das síndromes neurológicas, após infecções por arbovírus, não seja mediado pela formação desses anticorpos.
- Todos os três arbovírus causam uma síndrome inicial febre-artralgia associados a complicações neurológicas;
- Déficit motor foi a complicação neurológica mais relatada;
- Nossos dados demonstraram a amplitude de síndromes neurológicas associadas às infecções por ZIKV, CHIKV e/ou DENV, sendo relatado SGB, mielopatia, encefalite, ADEM, NMOSD e neurite óptica;
- Foi possível verificar um número considerável de reações cruzadas entre as amostras positivas para o vírus da Zika e da Dengue, o que não foi observado para as amostras positivas para Chikungunya.

Dentre as limitações da pesquisa, destacam-se (1) a grande concentração de amostras recebidas na fase convalescente da infecção, o que resultou num maior

número de positividade sorológica para IgG; (2) a falta de um grupo controle; (3) a reatividade cruzada entre os flavivírus tornando a diferenciação do ZIKV e DENV por testes sorológicos desafiadores e (4) o estudo incluiu um número relativamente pequeno de pacientes.

Este estudo apresenta importante relevância pois as complicações neurológicas das arboviroses tendem a se tornar mais importantes, uma vez que as epidemias continuam a ocorrer, e em proporções cada vez maiores. Evidenciamos a relevância de casos neurológicos em regiões endêmicas durante epidemia, onde preponderou ZIKV e DENV. Nosso estudo contribui para as crescentes evidências que defendem um amplo espectro de doenças neurológicas associadas à infecção pelos ZIKV, DENV e CHIKV, incluindo doenças do sistema nervoso central. A emergência de saúde pública foi recentemente declarada encerrada, reconhecendo que os vírus vão permanecer, logo, uma resposta técnica e de pesquisa contínua são necessárias. Para entender completamente a carga da doença dos arbovírus, médicos e autoridades de saúde pública precisam olhar além da SGB, e investigar outros arbovírus que podem causar doença neurológica semelhante.

9. PERSPECTIVAS

Futuramente, a presença dos vírus Zika, Dengue e Chikungunya nas amostras de soro e LCR dos pacientes poderão ser quantificadas por meio da PCR em tempo real, a fim de confirmar a hipótese de que os vírus permanecem por um período prolongado no LCR quando comparado com a presença no soro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD, H. et al. Treatment of acute relapses in neuromyelitis optica: Steroids alone versus steroids plus plasma exchange. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 22, n. 2, p. 185–192, 28 fev. 2016.

ACEVEDO, N. et al. Zika virus, chikungunya virus, and dengue virus in cerebrospinal fluid from adults with neurological manifestations, Guayaquil, Ecuador. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 42, p. 1–6, 2017a.

ACEVEDO, N. et al. Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus in Cerebrospinal Fluid from Adults with Neurological Manifestations, Guayaquil, Ecuador. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 42, p. 1–6, 24 jan. 2017b.

ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 116, p. 1–14, 2018.

AGARWAL, A. et al. Guillain-Barre syndrome complicating chikungunya virus infection. **Journal of NeuroVirology**, v. 23, n. 3, p. 504–507, 13 jun. 2017.

AID, M. et al. Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. **Cell**, v. 169, n. 4, p. 610–620, maio 2017.

ALLENDE, M. L.; PROIA, R. L. Lubricating cell signaling pathways with gangliosides. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 1, p. 587–592, 2002.

ALVES-LEON, S. V. et al. Zika virus found in brain tissue of a multiple sclerosis patient undergoing an acute disseminated encephalomyelitis-like episode. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 25, n. 3, p. 427–430, 18 mar. 2019.

ANAYA, J.-M. et al. A comprehensive analysis and immunobiology of autoimmune neurological syndromes during the Zika virus outbreak in Cúcuta, Colombia. **Journal of Autoimmunity**, v. 77, n. 1, p. 123–138, fev. 2017.

ARMANGUE, T. et al. Antibodies in acquired demyelinating disorders in children. **Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders**, v. 1, n. 5, p. 1–9, 16 dez. 2016.

ASPAHAN, M. C. et al. Neuromyelitis optica spectrum disorder associated with Zika virus infection. **Neurology: Clinical Practice**, v. 9, n. 1, p. e1–e3, fev. 2019.

BADAUT, J. et al. Aquaporins in Brain: distribution, physiology, and pathophysiology. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 367–378, 2002.

BAGHBANIAN, S. M. et al. A comparison of pediatric and adult neuromyelitis optica spectrum disorders: A review of clinical manifestation, diagnosis, and treatment. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 388, p. 222–231, maio 2018.

BALAVOINE, S. et al. Guillain–Barré Syndrome and Chikungunya: Description of All Cases Diagnosed during the 2014 Outbreak in the French West Indies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 2, p. 356–360, 2 ago. 2017.

BLUMBERG, E. A.; FISHMAN, J. A. Zika Virus in Transplantation: emerging infection and opportunities. **American Journal of Transplantation**, v. 17, n. 3, p. 599–600, 2017.

BOGOCH, I. I. et al. Anticipating the international spread of Zika virus from Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 1, p. 335–336, 2016.

BONYADI, M. R. et al. Comparison of Immunoblotting and ELISA for Detection of Anti-Ganglioside Antibodies in Children with Guillain-Barre Syndrome. **Iran Journal Immunology**, v. 7, n. 2, p. 117–123, 2010.

BORGHERINI, G. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p. 1401–1407, 1 jun. 2007.

BRASIL et al. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança**. [s.l.: s.n.].

BRASIL, M. DA S. DO. **Chikungunya: Manejo Clínico**. Disponível em: <<http://portal.arquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/25/chikungunya-novo-protocolo.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

BRAZ, L.; GUIMARÃES, J. Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: a definite case with Autoimmune Thyroiditis. **International Journal of Clinical Neurosciences and Mental Health**, v. 3, n. 1, 20 out. 2016.

BRITO FERREIRA, M. L. et al. Guillain–Barré Syndrome, Acute Disseminated Encephalomyelitis and Encephalitis Associated with Zika Virus Infection in Brazil: Detection of Viral RNA and Isolation of Virus during Late Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1405–1409, 8 nov. 2017.

BRIZZI, K. T.; LYONS, J. L. Peripheral Nervous System Manifestations of Infectious Diseases. **The Neurohospitalist**, v. 4, n. 4, p. 230–240, 2014.

BUKHARI, S.; TABOADA, J. A Case of Miller Fisher Syndrome and Literature Review. **Cureus**, v. 9, n. 2, p. 1–5, 2017.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature**

Communications, v. 9, n. 1, p. 475, 2 dez. 2018.

CALVET, G. A.; SANTOS, F. B. DOS; SEQUEIRA, P. C. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 459–466, out. 2016.

CAM, B. V et al. Prospective case-control study of encephalopathy in children with dengue hemorrhagic fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 848–851, 2001.

CAMPOS, T. D. L. et al. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. **International Journal of Genomics**, v. 2018, p. 1–9, 8 out. 2018.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 1, p. 1531–1539, 2016.

CAROD-ARTAL, F. J. et al. Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 9, p. 906–919, set. 2013.

CHANDAK, N. H. et al. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurology India**, v. 57, n. 2, p. 177–180, 2009.

CHANTHAMAT, N.; SATHIRAPANYA, P. Acute transverse myelitis associated with dengue viral infection. **Journal Spinal Cord Medicine**, v. 33, n. 4, p. 425–427, 2010.

CHARLIER, C. et al. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 1, n. 2, p. 134–146, out. 2017.

CHARREL, R. N. Diagnosis of arboviral infections – A quagmire of cross reactions and complexities. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 1, p. 11–12, jan. 2016.

CHEN, L. H.; WILSON, M. E. Dengue and chikungunya infections in travelers. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 438–444, out. 2010.

CHOW, A. et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 15 jan. 2011.

COBO-CALVO, Á. et al. MOG antibody-related disorders: common features and uncommon presentations. **Journal of Neurology**, v. 264, n. 9, p. 1945–1955, 2017.

COLLINS, M. H. et al. Lack of durable cross-neutralizing antibodies against zika virus from dengue virus infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 773–781, 2017.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–11, 2017.

COSTA, B. K. DA et al. MOG-IgG associated optic neuritis is not multiple sclerosis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 75, n. 10, p. 687–691, 2017.

CROSBY, L. et al. Severe manifestations of chikungunya virus in critically ill patients during the 2013–2014 Caribbean outbreak. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 48, p. 78–80, jul. 2016.

DA CRUZ, L. C. H. et al. Neuroimaging findings of zika virus-associated neurologic complications in adults. **American Journal of Neuroradiology**, v. 39, n. 11, p. 1–8, 2018.

DA SILVA, I. R. F. et al. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. **JAMA Neurology**, v. 74, n. 10, p. 1190–1198, 2017.

DE ALWIS, R. et al. Dengue Viruses are enhanced by Distinct Populations of Serotype Cross-Reactive Antibodies in Human Immune Sera. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1–12, 2014.

DE ARAGÃO, R. E. M. Neurite óptica bilateral após infecção viral por dengue: relato de casos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 73, n. 2, p. 175–178, 2010.

DE ORY, F. et al. Comparative Evaluation of Indirect Immunofluorescence and NS-1-Based ELISA to Determine Zika Virus-Specific IgM. **Viruses**, v. 10, n. 7, p. 379, 19 jul. 2018.

DE SOUSA, A. M. et al. Post-dengue neuromyelitis optica: case report of a Japanese-descendent Brazilian child. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 12, n. 6, p. 396–398, 2006.

DELMONT, E.; WILLISON, H. Diagnostic Utility of Auto Antibodies in Inflammatory Nerve Disorders. **Journal of Neuromuscular Diseases**, v. 2, n. 2, p. 107–112, 4 jun. 2015.

DIMACHKIE, M. M.; BAROHN, R. J. Guillain-Barré Syndrome and Variants. **Neurologic Clinics**, v. 31, n. 2, p. 491–510, maio 2013.

DOMINGUES, R. B. et al. Involvement of the central nervous system in patients with dengue virus infection. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 267, n. 1–2, p. 36–40, abr. 2008.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 1, p. 283–285, mar.

2015.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 1–6, 2017.

DYCK, P. J. B.; TRACY, J. A. History, Diagnosis, and Management of Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 93, n. 6, p. 777–793, 2018.

ESACK, A.; TEELUCKSINGH, S.; SINGH, N. The Guillain-Barre syndrome following dengue fever. **West Indian Medicine Journal**, v. 48, n. 1, p. 36–37, 1999.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, v. 352, n. 6283, p. 345–349, 15 abr. 2016.

FERREIRA-DE-LIMA, V. H.; LIMA-CAMARA, T. N. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 77, 1 dez. 2018.

FERREIRA, M. L. B. et al. Manifestações neurológicas de dengue: estudo de 41 casos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 2, p. 488–493, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M. The recent arbovirus disease epidemic in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 233–234, jun. 2015.

FIOCRUZ, F. O. C.-. **Dengue: Vírus e vetor**. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/longatraje.html>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

FRANÇA, G. V. A. et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891–897, ago. 2016.

GIACOMIN, N. T. et al. Optic neuritis secondary to chikungunya virus infection. **Revista Brasileira de Oftalmologia**, v. 77, n. 4, p. 222–224, 2018.

GONÇALVES, E. Acute inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (Guillain-Barré syndrome) following dengue fever. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 4, p. 223–225, ago. 2011.

GONG, Y. et al. Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. **Brain**, v. 125, n. 11, p. 2491–2506, 2002.

GRANGER, D. et al. Serologic Testing for Zika Virus: comparison of three Zika virus IgM-screening enzyme-linked immunosorbent assays and initial laboratory experiences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 7, p. 2127–2136, jul. 2017.

GREGIANINI, T. S. et al. Emerging arboviruses in Rio Grande do Sul, Brazil:

Chikungunya and Zika outbreaks, 2014-2016. **Reviews in Medical Virology**, v. 27, n. 6, p. e1943, nov. 2017.

GRIFFIN, D. E. Neuronal Cell Death in Alphavirus Encephalomyelitis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 289, p. 57–78, 2005.

GROUX-DEGROOTE, S.; GUÉRARDEL, Y.; DELANNOY, P. Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. **ChemBioChem**, v. 18, n. 13, p. 1146–1154, 4 jul. 2017.

GUIMARÃES, J.; GARRETT, C. Inflammatory demyelinating disease of central nervous system in clinical practice. **International Journal of Clinical Neurosciences and Mental Health**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 20 out. 2016.

GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **BMJ**, v. 352, n. 1, p. i657, 2 fev. 2016.

GUO, Y. et al. Pathogenic implications of cerebrospinal fluid barrier pathology in neuromyelitis optica. **Acta Neuropathologica**, v. 133, n. 4, p. 597–612, 9 abr. 2017.

HAJRA, A.; BANDYOPADHYAY, D.; HAJRA, S. Zika virus: A global threat to humanity: A comprehensive review and current developments. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 8, n. 3, p. 123–128, 2016.

HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of Dengue: Dawn of a New Era. **F1000Research**, v. 4, n. 0, p. 1–8, 2015.

HAMID, S. H. M. et al. What proportion of AQP4-IgG-negative NMO spectrum disorder patients are MOG-IgG positive? A cross sectional study of 132 patients. **Journal of Neurology**, v. 264, n. 10, p. 2088–2094, 24 out. 2017.

HASAN, S. et al. Dengue virus: A global human threat: Review of literature. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2016.

HENDARTO, S. K.; HADINEGORO, S. R. Dengue Encephalopathy. **Journal of the Japan Pediatrics International**, v. 34, n. 3, p. 350–357, 1992.

HSU, Y.; TRAN, M.; LINNINGER, A. A. Dynamic regulation of aquaporin-4 water channels in neurological disorders. **Croatian Medical Journal**, v. 56, n. 5, p. 401–421, 2015.

HYUN, J.-W. et al. Longitudinal analysis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in CNS inflammatory diseases. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 88, n. 10, p. 811–817, out. 2017.

ITO, M. et al. Ataxic Guillain-Barre syndrome and acute sensory ataxic neuropathy

form a continuous spectrum. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 82, n. 3, p. 294–299, 1 mar. 2011.

KAM, Y.-W. et al. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus–Infected Patients in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 15 jul. 2017.

KILPATRICK, T.; RANSOHOFF, R. M.; WESSELINGH, S. (EDS.). **Inflammatory Diseases of the Central Nervous System**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

KITLEY, J. et al. The differential diagnosis of longitudinally extensive transverse myelitis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 18, n. 3, p. 271–285, 13 mar. 2012.

KUMAR, S.; PRABHAKAR, S. Guillain-Barre syndrome occurring in the course of dengue fever. **Neurology India**, v. 53, p. 250–251, 2005.

LALITHA, P. et al. Ocular Involvement Associated With an Epidemic Outbreak of Chikungunya Virus Infection. **American Journal of Ophthalmology**, v. 144, n. 4, p. 552–556, out. 2007.

LANA-PEIXOTO, M. A. et al. Neuromyelitis optica spectrum disorder associated with dengue virus infection. **Journal of Neuroimmunology**, v. 318, n. 1, p. 53–55, maio 2018.

LANGERAK, T. et al. Zika Virus Infection and Guillain–Barré Syndrome in Three Patients from Suriname. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. 233, p. 1–5, 2016.

LEBRUN, G. et al. Guillain-Barré Syndrome after Chikungunya Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 495–496, mar. 2009.

LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005–2006*. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536–2541, set. 2008.

LENNON, V. A. et al. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 4, p. 473–477, 2005.

LEONHARD, S. E. et al. Zika virus infection in the returning traveller: what every neurologist should know. **Practical Neurology**, v. 18, n. 4, p. 271–277, ago. 2018.
LESSLER, J. et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, n. 1, p. 1–17, 2016.

LEWIS, R. A. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. **Current Opinion in Neurology**, v. 30, n. 5, p. 508–512, out. 2017.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 25 jan. 2015.

LIN, H. H.; YIP, B. S.; HUANG, L. M.; WU, S. C. Zika vírus structural biology and progress in vaccine development. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 47-53, 2018.

LO PRESTI, A. et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, n. 1, p. 270–278, 2016.

LUESSEN, D. J.; CHEN, R. Psychostimulants, Brain Membrane Lipids and Dopamine Transmission. **J Biomol Res Ther**, v. 5, n. 2, p. 2, 2016.

MADER, S.; BRIMBER, L. Aquaporin-4 Water Channel in the Brain and Its Implication for Health and Disease. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 90, 2019.

MAHENDRADAS, P. et al. Ocular Manifestations Associated with Chikungunya. **Ophthalmology**, v. 115, n. 2, p. 287–291, fev. 2008.

MAHENDRADAS, P.; AVADHANI, K.; SHETTY, R. Chikungunya and the eye: a review. **Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection**, v. 3, n. 1, p. 35, 2013.

MAIT, P. et al. A case of ADEM following Chikungunya fever. **Journal of the Association of Physicians India**, v. 62, n. 5, p. 441–442, 2014.

MALTA, J. M. A. S. et al. Síndrome de Guillain-Barré e outras manifestações neurológicas possivelmente relacionadas à infecção pelo vírus Zika em municípios da Bahia, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 26, n. 1, p. 09-18, jan. 2017.

MARTINES, R. B. et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **The Lancet**, v. 388, n. 1, p. 898–904, ago. 2016.

MARTÍNEZ-PULGARÍN, D. F. et al. Ophthalmologic aspects of chikungunya infection. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 5, p. 451–457, set. 2016.

MASSAAD, C. A. et al. Fluorescently-tagged anti-ganglioside antibody selectively identifies peripheral nerve in living animals. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15766, 30 dez. 2015.

MATAS, S. L. DE A. et al. Cerebrospinal fluid analysis in the context of CNS demyelinating diseases. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 71, n. 9B, p. 685–688, 2013.

MATHEY, E. K. et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 86, n. 9, p. 973–985, set. 2015.

MAVIGNER, M. et al. Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2018.

MÉCHARLES, S. et al. Acute myelitis due to Zika virus infection. **The Lancet**, v. 387, n. 10026, p. 1481, abr. 2016.

MEDEIROS, A. S. et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0194108, 13 mar. 2018.

MEHTA, R. et al. The spectrum of neurological disease associated with Zika and chikungunya viruses in adults in Rio de Janeiro, Brazil: A case series. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006212, 12 fev. 2018a.

MEHTA, R. et al. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. **Reviews in Medical Virology**, v. 28, n. 3, p. e1978, maio 2018b.

MELAMED, E. et al. Update on biomarkers in neuromyelitis optica. **Neurology - Neuroimmunology and Neuroinflammation**, v. 2, n. 4, p. e134, 23 ago. 2015.

MELO, C. F. O. R. et al. Serum Metabolic Alterations upon Zika Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 10 out. 2017.

MENDES, A.; KUHN, R. Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly. **Viruses**, v. 10, n. 3, p. 138, 20 mar. 2018.

MITTAL, A. Optic Neuritis Associated With Chikungunya Virus Infection in South India. **Archives of Ophthalmology**, v. 125, n. 10, p. 1381, 1 out. 2007.

MOTA, M. T. DE O. et al. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 38–50, dez. 2016.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–22, jan. 2005.

MULLER, D. A.; DEPELSENAIRE, A. C. I.; YOUNG, P. R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_2, p. 89–95, 1 mar. 2017.

MURTHY, K. R. et al. Bilateral retinitis following Chikungunya fever. **Indian Journal**

of Ophthalmology, v. 56, n. 4, p. 329–331, 2008.

MUSTHAFA, A. K.; ABDURAHIMAN, P.; JOSE, J. Case of ADEM following Chikungunya fever. **Journal of Association of Physicians India**, v. 56, n. 473, 2008.

NASCIMENTO, O. J. M. et al. Zika virus infection—associated acute transient polyneuritis. **Neurology**, v. 88, n. 24, p. 2330–2332, 13 jun. 2017.

NG, L. F. P. et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4261, 21 jan. 2009.

NICO, D. et al. Prevalence of IgG Autoantibodies against GD3 Ganglioside in Acute Zika Virus Infection. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 25, p. 1–8, 9 mar. 2018.

NIEMEYER, B. et al. Acute Disseminated Encephalomyelitis Following Zika Virus Infection. **European Neurology**, v. 77, n. 1–2, p. 45–46, 2017.

NUNES, J.; PIMENTA, D. N. A Epidemia de Zika e os Limites da Saúde Global. **Lua Nova: Revista de Cultura e Política**, v. 1, n. 98, p. 21–46, ago. 2016.

OEHLER, E. et al. Guillain-Barre syndrome following type 4 dengue in Polynesia. **Médecine tropicale**, v. 71, n. 2, p. 203–204, 2011.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by guillain-barre syndrome case report, French Polynesia, December, 2013. **Euro Surveill**, v. 19, n. 9, 2014.

OEHLER, E. et al. Increase in cases of Guillain-Barré syndrome during a Chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 48, p. 30079, 3 dez. 2015.

PABBARAJU, K. et al. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. **Journal of Clinical Virology**, v. 83, n. 1, p. 66–71, out. 2016.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, jan. 2018.

PALACIOS, E. et al. Longitudinal extensive transverse myelitis and zika virus: a diagnostic challenge in a hospital in Colombia. **Neurología**, v. 34, n. 3, p. 204–206, 2019.

PALMANO, K. et al. The role of gangliosides in neurodevelopment. **Nutrients**, v. 7, n. 5, p. 3891–3913, 2015.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Neurological syndrome, congenital**

malformations, and Zika virus infection - Epidemiological Update.

PARRA, B. et al. Guillain–Barré Syndrome Associated with Zika Virus Infection in Colombia. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 16, p. 1513–1523, 20 out. 2016.

PESCHL, P. et al. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: deciphering a target in inflammatory demyelinating diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1, p. 529–543, 2017.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

PISANI, F. et al. Development of an Aquaporin-4 Orthogonal Array of Particle-Based ELISA for Neuromyelitis Optica Autoantibodies Detection. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143679, 24 nov. 2015.

POHL, D. et al. Acute disseminated encephalomyelitis: updates on an inflammatory CNS syndrome. **Neurology**, v. 87, n. 9, p. 38–45, 30 ago. 2016.

POLWIANG, S. The seasonal reproduction number of dengue fever: impacts of climate on transmission. **PeerJ**, v. 3, p. e1069, 9 jul. 2015.

PREECHAWAT, P.; POONYATHALANG, A. Bilateral optic neuritis after dengue viral infection. **Journal of Neuro-Ophthalmology**, v. 25, n. 1, p. 51–52, 2005.

PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Neurologic dengue manifestations associated with intrathecal specific immune response. **Neurology**, v. 73, n. 17, p. 1413–1417, 2009.

PUCCIONI-SOHLER, M. et al. First report of persistent dengue-1-associated autoimmune neurological disturbance: neuromyelitis optica spectrum disorder. **Journal of NeuroVirology**, v. 23, n. 5, p. 768–771, 2017.

PUSTIGLIONE, M. Medicina do Trabalho e doenças emergentes, reemergentes e negligenciadas: A conduta no caso das febres da dengue, do Chikungunya e do Zika vírus. **Revista Brasileira de Medicina do Trabalho**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2016.

QURESHI, N. et al. Guillain-Barre Syndrome Following Dengue Fever in Adult Patient. **Journal of Medicine**, v. 13, n. 2, p. 246–249, 26 nov. 2012.

RAJABALLY, Y. A. et al. CIDP and other inflammatory neuropathies in diabetes — diagnosis and management. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 10, p. 599–611, 15 set. 2017.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 89–96, fev. 2010.

RALAPANAWA, D. M. P.; KULARATNE, S. A. M.; JAYALATH, W. A. T. A. Guillain–Barre syndrome following dengue fever and literature review. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p. 729, 27 dez. 2015.

RAMANATHAN, S.; DALE, R. C.; BRILOT, F. Anti-MOG antibody: The history, clinical phenotype, and pathogenicity of a serum biomarker for demyelination. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 4, p. 307–324, abr. 2016.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981–1987, 2016.

REINDL, M. et al. The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 8, p. 455–461, 2013.

ROSE, N. et al. Acute optic neuritis following infection with chikungunya virus in southern rural India. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. e147–e150, fev. 2011.

ROZÉ, B. et al. Zika virus detection in cerebrospinal fluid from two patients with encephalopathy, Martinique, February 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 16, p. 1–4, 2016.

RÜCKERT, C. et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 15412, 19 maio 2017.

SALLES, T. S. et al. History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 264, 24 dez. 2018.

SANTOS, N. Q. et al. Guillain-Barré syndrome in the course of dengue: case report. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 62, n. 1, p. 144–146, mar. 2004.

SATO, D. K. et al. Aquaporin-4 antibody-positive cases beyond current diagnostic criteria for NMO spectrum disorders. **Neurology**, v. 80, n. 1, p. 2210–2216, 2013.

SATO, D. K. et al. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. **Neurology**, v. 82, n. 5, p. 474–481, 29 jul. 2014.

SAÚDE, S. DE V. EM. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2017.** Disponível em:

<<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/10/2017-046-Publicacao.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2019.

SAÚDE, S. DE V. EM. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018.** Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2019.

SCHESSL, J. et al. Prospective study on anti-ganglioside antibodies in childhood Guillain-Barre syndrome. **Archives of Disease in Childhood**, v. 92, n. 1, p. 48–52, 1 jan. 2007.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 7, p. e263, 23 maio 2006.

SEET, R. C. S.; LIM, E. C. H.; WILDER-SMITH, E. P. V. Acute transverse myelitis following dengue virus infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 3, p. 310–312, mar. 2006.

SEPÚLVEDA, M. et al. Clinical spectrum associated with MOG autoimmunity in adults: significance of sharing rodent MOG epitopes. **Journal of Neurology**, v. 263, n. 7, p. 1349–1360, 4 jul. 2016.

SLON CAMPOS, J. L.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCRETON, G. R. The immune response against flaviviruses. **Nature Immunology**, v. 19, n. 11, p. 1189–1198, 17 nov. 2018.

SOARES, C. N. et al. Dengue infection: neurological manifestations and cerebrospinal fluid (CSF) analysis. **Journal of Neurology Science**, v. 249, n. 1, p. 19–24, 2006.

SOARES, C. N. et al. Oligosymptomatic dengue infection: a potential cause of Guillain Barré syndrome. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. 2a, p. 234–237, jun. 2008.

SOARES, C. N. et al. Fatal encephalitis associated with Zika virus infection in an adult. **Journal of Clinical Virology**, v. 83, n. January, p. 63–65, out. 2016.

SOLOMON, T. et al. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1053–1059, 2000.

SONG, G. et al. Multiplexed Biomarker Panels Discriminate Zika and Dengue Virus Infection in Humans. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 17, n. 2, p. 349–356, fev. 2018.

STEINHAGEN, K. et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. **Euro Surveill**, v. 21, n. 1, p. 16002, 2016.

v. 21, n. 50, p. 1–16, 15 dez. 2016.

STYCZYNSKI, A. R. et al. Increased rates of Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus outbreak in the Salvador metropolitan area, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005869, 30 ago. 2017.

TANDALE, B. V. et al. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. 2, p. 145–149, out. 2009.

TARAPHDAR, D.; ROY, B.; CHATTERJEE, S. Chikungunya virus infection amongst the acute encephalitis syndrome cases in West Bengal, India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 153, 2015.

TEIXEIRA, A. A. R.; FERREIRA, L. F.; NETO, R. DA J. P. Acute Disseminated Encephalomyelitis After Chikungunya Infection. **Clinical Review & Education**, v. 28, n. 3, p. e1978, maio 2018.

VAN DEN BERG, B. et al. Guillain-Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 8, p. 469–482, 15 ago. 2014.

VAN DOORN, P. A.; JACOBS, B. C. Neuronal endocytosis of anti-ganglioside antibodies: implications for Guillain-Barré syndrome. **Brain**, v. 139, n. 6, p. 1622–1625, 27 jun. 2016.

VASCONCELOS, P. F. DA C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 2, p. 9–10, 2015.

VIANA, D. V.; IGNOTTI, E. A ocorrência da dengue e variações meteorológicas no Brasil: revisão sistemática. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 2, p. 240–256, jun. 2013.

VIEIRA, M. A. DA C. E S. et al. Encephalitis associated with Zika virus infection and reactivation of the varicella-zoster virus in a Brazilian child. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 390–392, jun. 2018a.

VIEIRA, M. A. DA C. E S. et al. Potential role of dengue virus, chikungunya virus and Zika virus in neurological diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 11, p. 1–6, 29 out. 2018b.

WADIA, R. S. A neurotropic virus (chikungunya) and a neuropathic aminoacid (homocysteine). **Ann Indian Acad Neurology**, v. 10, p. 198–213, 2007.

WAN SULAIMAN, W. A. et al. Acute disseminated encephalomyelitis in dengue viral infection. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 43, p. 25–31, set. 2017.

WANG, Q.-S. et al. The single nucleotide polymorphism site of aquaporin-4 gene in patients with neuromyelitis optica. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 6, p. 6017–6021, 6 out. 2017.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 26 mar. 2015.

WIELANEK, A. C. et al. GUILLAIN-BARRE SYNDROME COMPLICATING A CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION. **Neurology**, v. 69, n. 22, p. 2105–2107, 27 nov. 2007.

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 717–727, ago. 2016.

WINGERCHUK, D. M. et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. **Neurology**, v. 85, n. 2, p. 177–189, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory testing for Zika virus infection**. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204671/WHO_ZIKV_LAB_16.1_eng.pdf;jsessionid=BA26B2F887CB8BDA0D2EF1639EBBDA1E?sequence=1. Acesso em: 10 abr. 2019.

YACOUN, S.; MONGKOLSAPAYA, J.; SCRETON, G. Recent advances in understanding dengue. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 1–10, 19 jan. 2016.

YEPISHIN, I. V. et al. Miller Fisher Syndrome: a case report highlighting heterogeneity of clinical features and focused differential diagnosis. **Hawaii Journal of Medicine Public Health**, v. 75, n. 7, p. 196–199, 2016.

YILDIRIM, S. et al. Acute Motor Axonal Neuropathy (Aman) Case With Motor Conduction Blocks In Childhood. **Iranian Journal of Child Neurology**, v. 10, n. 1, p. 65–69, 2016.

YUKI, N. Guillain-Barré syndrome and anti-ganglioside antibodies: a clinician-scientist's journey. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 88, n. 7, p. 299–326, 2012.

YUKI, N.; HARTUNG, H.-P. Guillain-Barré Syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 24, p. 2294–2304, 14 jun. 2012.

YUKUTAKE, Y.; YASUI, M. Regulation of water permeability through aquaporin-4. **Neuroscience**, v. 168, n. 4, p. 885–891, jul. 2010.

ZALEWSKI, N. L. et al. Ring-enhancing spinal cord lesions in neuromyelitis optica spectrum disorders. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 88, n.

3, p. 218–225, mar. 2017.

ZAMVIL, S. S.; SLAVIN, A. J. Does MOG Ig-positive AQP4-seronegative opticospinal inflammatory disease justify a diagnosis of NMO spectrum disorder? **Neurology: Neuroimmunology and Neuroinflammation**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2015.

ANEXOS**ANEXO 1 - ACEITE DA COMISSÃO CIENTÍFICA DA PUCRS**

Esta mensagem foi emitida automaticamente pelo SIPESQ - Sistema de Pesquisas da PUC

Prezado(a) Coordenador(a) de Projeto de Pesquisa,

A Comissão Científica da(o) FACULDADE DE MEDICINA considerou que o projeto **7456 - AUTOANTICORPOS EM COMPLICAÇÕES**

NEUROIMUNOLÓGICAS SECUNDARIAS À INFECÇÃO POR

FLAVIVÍRUS (ZIKA, DENGUE, CHIKUNGUNYA) atende aos requisitos por ela definidos.

Desta forma, o projeto passa a constar nos dados oficiais relativos à pesquisa da Universidade, e caso necessário, já pode ser encaminhado para análise da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) ou Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Atenciosamente,

Pró-Reitoria de Pesquisa, Inovação e Desenvolvimento

ANEXO 2 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO
COLABORADOR DE SOBRAL/CE

INSTITUTO SUPERIOR DE
TEOLOGIA APLICADA - INTA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS DE INFECÇÕES PELAS ARBOVIROSES NA
REGIÃO NORTE DO CEARÁ.

Pesquisador: Theodora Thays Arruda Cavalcante

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 92652717.7.0000.8133

Instituição Proponente: INSTITUTO SUPERIOR DE TEOLOGIA APLICADA - INTA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Pesquisa apta para início.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.005.948

ANEXO 3 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO
COLABORADOR DO RIO DE JANEIRO/RJ

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE/ FM/ UFF/ HU	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: ARBOVIROSES E SUAS COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS: ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E TERAPÊUTICO	
Pesquisador: OSVALDO JOSÉ MOREIRA DO NASCIMENTO	
Área Temática:	
Versão: 2	
CAAE: 55216916.0.0000.5243	
Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Neurologia / Neurociências	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 1.645.629	

ANEXO 4 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO
COLABORADOR DE RECIFE/PE



Título do Projeto: "Manifestações neurológicas associados a infecção por Zika virus"

Pesquisador responsável: Maria de Fatima Pessoa Militão de Albuquerque

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 14/03/2016

Registro no CAAE: 51106115.8.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.449.432

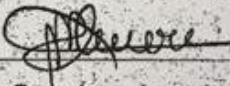
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 11 de fevereiro de 2018.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 12 de abril de 2016.



Vice - Coordenadora do CEP/CPqAM

Mana Almence Lopes da Silva
Vice-coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. Siape 1362520
CPqAM / Fiocruz



ANEXO 5 – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO
COLABORADOR DE FORTALEZA/CE

HOSPITAL GERAL DE
FORTALEZA/SUS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil dos pacientes com manifestações neurológicas relacionadas ao vírus chikungunya assistidos no Hospital Geral de Fortaleza

Pesquisador: RENATO RODRIGUES VIANA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 89668418.3.0000.5040

Instituição Proponente: Hospital Geral de Fortaleza/SUS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.720.862

ANEXO 6 – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO NA REVISTA MULTIPLE SCLEROSIS AND RELATED DISORDERS

Dear Dr. Rachel Molina,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Multiple Sclerosis and Related Disorders

Title: Detection of autoantibodies in central nervous system inflammatory disorders: clinical application of cell-based assays

Corresponding Author: Douglas Sato

Co-Authors: Rachel D Molina; Lucas P Conzatti; Ana Paula B Da Silva; Leise Daniele S Goi; Bruna K da Costa; Denise C Machado;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/msard/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Rachel&lname=Molina&email=rachelmolina16@hotmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/msard/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=rachelmolina16@hotmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at douglas.sato@pucrs.br; douglas.sato@icloud.com.

Thank you,

Multiple Sclerosis and Related Disorders

ANEXO 7 – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO NA REVISTA MULTIPLE
SCLEROSIS AND RELATED DISORDERS

**Detection of autoantibodies in central nervous system
inflammatory disorders: clinical application of cell-based assays**

Rachel Dias Molina^{a,b}, Lucas Piccoli Conzatti^c, Ana Paula Bornes da Silva^{a,d}, Leise Daniele Skenal Goi^{a,b}, Bruna Klein da Costa^{a,b}, Denise Cantarelli Machado^{a,b,d}, Douglas Kazutoshi Sato^{a,b*}.

^a Neuroinflammation and Neuroimmunology Lab, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Medical School, Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^c São Lucas Hospital, Neurology Service, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Medical School, Graduate Program in Biomedical Gerontology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

*** Correspondence**

Douglas Kazutoshi Sato / douglas.sato@pucrs.br

Address: Neuroinflammation and Neuroimmunology Lab, Brain Institute of Rio Grande do Sul, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6690, building 63 - Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Brazil - Zip Code 90610-000.

Abstract

The identification of autoantibodies in central nervous system (CNS) inflammatory disorders improves diagnostic accuracy and the identification of patients with a relapsing disease. Usual methods to detect autoantibodies are usually divided into 3 categories: tissue-based assays, protein-based assays and cell-based assays (CBA). Tissue-based assays are commonly used for initial identification of autoantibodies based on staining patterns and co-localization. Once the antigen is known, autoantibodies can be detected using other antigen-specific methods based on recombinant proteins and CBA using transfected cells expressing the protein in their cell membranes. Compared to traditional methods using recombinant proteins such as ELISA and western-blot, the CBA have advantage of detecting conformational sensitive antibodies using natively folded proteins in the cell membrane. This article reviews the utility of CBA into the clinical practice.

Keywords: Cell-Based Assay; Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders; Aquaporin-4; Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein; Autoimmune Encephalitis.

1. Autoantibodies as disease biomarkers

The acquired inflammatory central nervous system (CNS) diseases encompass a heterogeneous group that includes multiple sclerosis (MS), neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD), acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) and autoimmune encephalitis, among others (Hu and Lucchinetti, 2009). Sometimes, the initial clinical presentation may overlap (e.g. isolated optic neuritis, myelitis or solitary brain lesions), making precise diagnosis very difficult without surrogate markers.

In the recent years, autoantibodies have emerged as important tools as biomarkers for the diagnosis of an increasing number of diseases. In 2004, antibodies against aquaporin-4 (AQP4) water channels expressed in the end-foot processes of astrocytes were found in patients with NMOSD (Lennon et al., 2004, 2005). In 2007, antibodies against N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) were described in paraneoplastic encephalitis associated with ovarian teratoma (Dalmau

et al., 2008, 2007), following an increasing number of autoimmune encephalitis associated with antibodies targeting neuronal surface antigens (Dalmau and Graus, 2018). More recently, antibody against myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) have been associated with transverse myelitis (Ramanathan et al., 2014), optic neuritis (ON) (Chalmoukou et al., 2015; Nakajima et al., 2015), ADEM (Di Pauli and Berger, 2018), cortical encephalitis (Ogawa et al., 2017) and antibodies to aquaporin-4 (AQP4-Ab) seronegative NMOSD (Sato et al., 2014).

Identification of these autoantibodies as biomarkers can not only help us better understand the underlying mechanism of each disorder, but also improve diagnostic accuracy, stratify prognosis (including the risk of a relapsing disease) and even help developing new treatments targeting specific molecules. In this review, we will describe the main techniques for the detection of autoantibodies, specially the clinical application of cell-based assays in neurological diseases.

2. Identification of antibody in CNS inflammatory disorders

Over 40 different methods have been described to identify specific autoantibodies. Some of these tests are developed using in-house research protocols, others are already commercially available. In common, all of them require the binding of patient's antibody to animal tissue slices, recombinant proteins (Lennon et al., 2004) or transfected cells expressing the protein of interest in the membrane surface (Takahashi et al., 2007, 2006; Waters et al., 2008). These assays can be divided into three categories: tissue-based assays, protein-based assays and cell-based assays (CBA) (Wolburg et al., 2011).

2.1 Tissue-based assays

Tissue-based immunohistochemistry (TBI) assays use animal tissue sections (e.g. brain slices from mouse, rat or monkeys) with a few micrometers of thickness. These slices are chemically fixed and pre-treated to reduce unspecific binding. After these slices have been exposed to diluted patient serum samples, they are labelled with a secondary anti-human antibody conjugated to fluorophores or non-fluorescent peroxidase-conjugated polymer (conventional immunohistochemistry) (Sven Jarius and Wildemann, 2013).

TBI assays are commonly used for initial identification of autoantibodies based on staining patterns for unknown CNS antigens. The potential antigen can be identified by the mass-spectroscopy or co-localization using a monoclonal antibody. However, TBI results interpretation is subjective and requires an experienced observer to discriminate specific and unspecific binding patterns. In addition, sensitivity can be very low, and TBI protocols are time- and resource-consuming (Chan et al., 2010; Fazio et al., 2009).

2.2 Protein-based assays

2.2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Compared to other tests, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a simple method widely commercially available in routine clinical laboratories, as it does not require cutting-edge research laboratory resources. ELISA usually uses coated wells with recombinant proteins or linear peptides produced in transfected bacteria (e.g. *E. coli*) or baculovirus-infected insect cells (Jarius et al., 2012; Possee, 1997).

ELISA-based antibody assays usually has a low variability between laboratories and allows high-output testing of a large number of samples, since it can be fully-automated (Jarius et al., 2012). However, it cannot quantify samples that exceed the reference range of its standard curve (S Jarius and Wildemann, 2013).

The test has a sensitivity usually is higher than immunohistochemistry (IHC), as the antigen concentration many times higher than it is expressed on normal tissue (S Jarius and Wildemann, 2013; Kim et al., 2012). However, ELISA-based antibody assays may not discriminate unspecific binding patterns and have higher rate false-positive results. Moreover, ELISA is not suitable for the detection of conformational sensitive antibodies, which requires expression of human protein in the cellular membrane of eukaryotic cells.

2.2.2 Western Blot

Western Blot (WB) uses proteins extracted from a protein lysate from cells expressing the targeted protein. After the exposition to the patient sample, proteins are separated by gel electrophoresis based on their weight and electrical properties (Jensen, 2012; Towbin et al., 1979).

WB is useful to confirm the antibody binding to single or multiple proteins that may be present in a single sample. However, since WB requires protein denaturation, it is not suitable for conformational sensitive antibodies. Moreover, WB assays may have nonspecific protein binding, leading to a lower specificity compared to assays using natively folded membrane expressed proteins (Bass et al., 2017).

2.2.3 Fluorescence immunoprecipitation assay

Fluorescence immunoprecipitation assay (FIPA) uses recombinant proteins based on the protein of interest tagged with a fluorescent protein produced in eukaryotic cells. The antigen-antibody complex is purified using protein-A or -G beads binding to immunoglobulins. The advantage of protein-based assays such as FIPA is to reduce the substrate complexity, eliminating non-target proteins that may provide unspecific binding seen on the TBI. FIPA may provide quantitative antibody titer results, as the fluorescence signal is proportional to the amount of antibodies binding to the antigen (S Jarius and Wildemann, 2013; Kim et al., 2012). This may be useful for monitoring circulating antibody levels as a surrogate marker of antibody production and disease activity. FIPA usually has a high specificity but a relatively low sensitivity. This may be attributable to changes in the protein conformation after the protein processing or due to the protein tagging. For some antigens, the loss of specific membrane arrays may also interfere in the sensitivity. Furthermore, it is also an time- and resource-consuming technique, requiring multiple step protocols (S Jarius and Wildemann, 2013; Waters and Vincent, 2008).

2.2.4 Radioimmunoassay

Radioimmunoassay (RIPA) are similar to FIPA, but the protein is labeled with a radioisotope and incubated with the patient sample. The radioactivity quantification of the antigen-antibody bound is done throughout a scintillation counter. RIPA has a

relatively low sensitivity but provides high specificity. Due to its cost and time required for execution, this technique is has limited use in the clinical practice (S Jarius and Wildemann, 2013; Paul et al., 2007).

2.3 Cell-based Assays

CBA uses eukaryotic cell lines (such as HEK293 and CHO) transfected with plasmids encoding the human sequence of the protein of interest. Mock-transfected cells are usually used as controls. Transfected cells used in CBA express high levels of natively folded protein in the cell membrane, being useful for the validation of new protein targets for autoantibodies (Ricken et al., 2018). Therefore, CBA usually have a higher sensitivity compared to TBI and protein-based assays (Fryer et al., 2014; Höftberger et al., 2013; S Jarius and Wildemann, 2013; E. S. Kang et al., 2012).

The pattern of the antigen-antibody binding can be verified using indirect immunofluorescence or by multiparametric flow-cytometry, but some antigens may not be suitable for both methodologies. Indirect immunofluorescence requires attention on binding patterns and a highly trained reader. Antibodies titers are usually provided in semi-quantitative serial dilutions using indirect immunofluorescence. Flow-cytometry requires a multi-channel flow-cytometer equipment and experienced user on cell gating and analysis protocol. Antibodies titers using flow-cytometry are usually calculated in two main formats - mean fluorescence intensity (MFI) between transfected and non-transfected cells or a ratio between the patient's sample MFI and a negative sample MFI (Amatoury et al., 2013; Chan et al., 2010; Gastaldi et al., 2018; E. Kang et al., 2012; Ramberger et al., 2015; Ricken et al., 2018).

Pre-fixed slices containing transfected cells may be produced on a commercial scale and stored for a relatively long period of time on low temperatures (E. S. Kang et al., 2012), thus, it can be performed in clinical laboratories using indirect immunofluorescence. However, there may have some loss of sensitivity and specificity compared to the live CBA performed in research laboratories (Waters et al., 2016). Although increasing, the CBA is not widely available yet. Commercially available kits are usually expensive and the need of a specialized environment for the transfection and maintenance of eukaryotic cell culture lines for live-CBA makes

it inaccessible for most laboratories, especially in poor-resource or developing countries (Jarius and Wildemann, 2010).

3. Clinical Applications of CBA in CNS inflammatory disorders

3.1 NMOSD

After the discovery of AQP4-Ab in 2004 in NMOSD patients using TBI assay (Lennon et al., 2004), an increasing number of AQP4-Ab positive patients were described having limited forms such as longitudinally extensive myelitis (LETM) or recurrent and/or bilateral ON, area postrema attacks with persistent (>48 hours) hiccups, nausea and vomiting and those patients with associated diencephalic, brainstem and cerebral lesions or coexisting autoimmune systemic diseases. According to the international consensus diagnostic criteria for NMOSD published on 2015, the diagnosis of NMOSD for AQP4-Ab positive cases is possible if there is a suggestive attack with involvement 1 of 6 core locations (optic nerve, spinal cord, area postrema of the dorsal medulla, brainstem, diencephalon or cerebrum). In seronegative patients, two or more core locations must be affected, with at least one of the attacks in the optic nerve, spinal cord or the area postrema, and additional magnetic resonance imaging (MRI) criteria should be fulfilled (Wingerchuk et al., 2015).

The 2015 NMOSD diagnostic criteria recommends that AQP4-Ab should be tested with CBA. Waters *et al.* (2012) performed a multicenter study that compared the AQP4-Ab assays, concluding that the most sensitive and specific assays were those using CBA protocols (73-77%) (Waters et al., 2012). In general, CBA using AQP4 M23-isoform results in slightly higher sensibility compared to assays using AQP4 M1-isoform due to the formation of AQP4 orthogonal array of particles. In addition, CBA using live transfected cells usually have lower background and higher sensitivity compared to pre-fixed cells.

3.2 MOG-associated disease

MOG-associated disease has recently emerged as a new subgroup of inflammatory CNS demyelinating disorder distinct from MS. Although antibodies to MOG were firstly described in patients with clinical isolated syndromes converting to

definitive MS using a WB assay with recombinant MOG peptide (Reindl et al., 2013), this finding was not confirmed in other studies indicating limited clinical utility of this methodology (Kuhle et al., 2007).

Nevertheless, the clinical spectrum of antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG-Ab) positive patients clarified when conformational sensitive antibodies against MOG were evaluated using CBA. The first studies reported the association of MOG-Ab with ADEM in pediatric patients (Brilot et al., 2009; Mclaughlin et al., 2009; O'Connor et al., 2007). Moreover, patients with persistent MOG-Ab have a higher rate of relapsing disease among those that remained seropositive after an ADEM-like episode (Pröbstel et al., 2011).

Further studies related MOG-Ab seropositivity in NMOSD patients who were negative to AQP4-Ab (Reindl et al., 2013; Sato et al., 2014). Sato *et al.* (2014) described the clinical features of NMOSD MOG-Ab positive in comparison to AQP4-Ab positive patients (Sato et al., 2014). NMOSD MOG-Ab patients have no gender predominance, with high frequency of ON and with better functional recovery after an attack compared to AQP4-Ab positive patients. When myelitis was present it commonly involved lower spinal segments compared to AQP4-Ab patients. Other studies correlated MOG-Ab to recurrent and/or bilateral isolated ON (Chalmoukou et al., 2015; Nakajima et al., 2015; Ramanathan et al., 2014), isolated LETM (Cobo-Calvo et al., 2016), ON following an ADEM episode (Baumann et al., 2016) and encephalitis (Ogawa et al., 2017). Taken together, the identification of MOG-IgG using CBA allowed the clinical characterization of the patients encompassed under the term MONEM (MOG-IgG-associated ON, encephalitis - including ADEM-like lesions and cortical encephalitis, and myelitis) (dos Passos et al., 2018). As the clinical spectrum of MOG-associated disease expands, the clinical phenotypes associated with MOG-Ab are not limited to ADEM and aquaporin-4-IgG-negative NMOSD (dos Passos et al., 2018).

Even though significant advances have been accomplished to guarantee high specificity of detection of MOG-Ab using CBA, there is still some issues that need to be improved. Waters *et al.* (2015) evaluated the specificity of the secondary

autoantibodies used in CBA assays and they found that use of anti-human IgG1 secondary antibodies was more specific than IgG that recognizes heavy and light chains. This was partially explained by cross-reactivity of IgG light chains secondary antibody with IgM. The use of secondary IgG1 anti-human antibody increased the assay accuracy and differentiated MOG-Ab positive from MS patients (sensitivity 24%, 95% confidence interval [CI] 9%–45%; specificity 100%, 95% CI 88%–100%) (Waters et al., 2015). Therefore, it is recommended to select secondary antibodies against human IgG without cross-reactivity to other immunoglobulin subclasses.

Although these findings still need to be confirmed by larger studies, apparently MONEM represents a new phenotype of CNS demyelinating disorder with MOG-Ab detected by CBA. For persistent MOG-Ab seropositive patients, MOG-Ab titers might be a prognostic tool that could be used to guide therapeutic decision-making. The follow-up of the titers of this autoantibody may help to identify the cases that remain seropositive and potentially might have a higher recurrence rate and could benefit from long-term immunosuppression (Oliveira et al., 2018).

3.3 Autoimmune encephalitis

Autoimmune encephalitis is a group of recently described diseases with autoantibodies directed to cell-surface neuronal antigens that are pathogenic by altering the function of neuronal receptors (Dalmau et al., 2017). Following the antibodies against N-methyl-D-aspartate positive cases, this emerging group of diseases has been characterized from the observation of groups of patients with similar phenotypes and patterns of IHC staining that allowed the identification of the specific antigens by mass-spectroscopy (Dalmau et al., 2017). Then, these antigens were validated in CBA with transfected cells.

The antibodies directed to these cell-surface antigens can only be detected if they are in their native conformation preserving protein folding (Graus et al., 2016). This is accomplished by CBA, IHC of fresh animal brain sections or immunocytochemistry of live neurons (Lai et al., 2009). CBA has been used in commercial kits of prefixed transfected cells in several centers. Even though this method has been proven to be specific, it may lack sensitivity to some antibodies (McCracken et al., 2017). To

increase sensibility, ideally both serum and cerebrospinal fluid should be tested and in case of doubt the CBA results should be confirmed by IHC (Graus et al., 2016).

Overall, the detection of autoantibody in autoimmune encephalitis using CBA allows the definition of the diagnosis, helps to make differential diagnosis in atypical cases (Graus et al., 2016) and in research, and helps to define the spectrum of phenotypes associated with each autoantibody. Nevertheless, its prognosis value is still under investigation.

CBA has several advantages in the evaluation of autoimmune encephalitis. It is more available than other methods that preserve the native conformation of the antigens making possible to test a higher number of suspected cases. Moreover, some auto-Ab, such as glycine receptor antibody, are better detected using specific CBA than IHC (McCracken et al., 2017). However, it is important to evaluate the results of the CBA (as any other diagnostic method) according to the clinical hypothesis to define its interpretation and the necessity of further analysis.

4. Conclusions

Autoantibodies have revolutionized the diagnosis of inflammatory CNS disorders. NMOSD diagnostic criteria have incorporated the presence of AQP4-Ab as a major criterion, and MOG-associated disease have been described as a new potential disease entity. Moreover, an increased number of surface neuronal antigens have been described in autoimmune encephalitis. All these autoantibodies have high diagnostic application in the clinical practice with the development of CBA detecting conformational sensitive antibodies. Nevertheless, the prognostic value of most of them is still unclear and requires further research.

5. Conflict of Interest

The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

RDM has received a scholarship from CAPES/Brazil.

LPC has nothing to disclosure.

APBS has received a scholarship from CNPq/Brazil.

LSG has received a scholarship from CAPES/Brazil.

BKC has received a scholarship from CNPq/Brazil and speaker honoraria from Libbs.

DCM has nothing to disclosure.

DKS has received a scholarship from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) of Japan; a Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (KAKENHI 15K19472); research support from CNPq/Brazil (425331/2016-4), FAPERGS/MS/CNPq/SESRS (17/2551-0001391-3) PPSUS/Brazil, TEVA (research grant for EMOCEMP Investigator Initiated Study), and Euroimmun AG (Neuroimmunological Complications associated with Arboviruses); and speaker honoraria from Biogen, Novartis, Genzyme, TEVA, Merck-Serono, Roche, and Bayer and has participated in advisory boards for Shire, Roche, TEVA, Merck-Serono and Quest/Athena Diagnostics.

6. Author Contributions

All authors contributed to the manuscript preparation and wrote, read and approved the submitted version.

7. Funding

This review is based on research supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Finance Code 001 - Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (PROEX Program) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com nº 425.331/2016-4.

8. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Finance Code 001 - Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (PROEX Program) and

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com nº 425.331/2016-4.

9. References

- Amatoury, M., Merheb, V., Langer, J., Wang, X.M., Dale, R.C., Brilot, F., 2013. High-throughput Flow Cytometry Cell-based Assay to Detect Antibodies to N-Methyl-D-aspartate Receptor or Dopamine-2 Receptor in Human Serum. *J. Vis. Exp.* 1–7.
- Bass, J., Wilkinson, D., Rankin, D., Phillips, B., Szewczyk, N., Smith, K., Atherton, P., 2017. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research 27, 69–81.
- Baumann, M., Hennes, E.-M., Schanda, K., Karenfort, M., Kornek, B., Seidl, R., Diepold, K., Lauffer, H., Marquardt, I., Strautmanis, J., Syrbe, S., Vieker, S., Hoffberger, R., Reindl, M., Rostasy, K., 2016. Children with multiphasic disseminated encephalomyelitis and antibodies to the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): Extending the spectrum of MOG antibody positive diseases. *Mult. Scler. J.* 22, 1821–1829.
- Brilot, F., Dale, R.C., Selter, R.C., Grummel, V., Kalluri, S.R., Aslam, M., Busch, V., Zhou, D., Cepok, S., Hemmer, B., 2009. Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in children with inflammatory demyelinating central nervous system disease. *Ann Neurol* 66, 833–842.
- Chalmoukou, K., Alexopoulos, H., Akrivou, S., Stathopoulos, P., Reindl, M., Dalakas, M.C., 2015. Anti-MOG antibodies are frequently associated with steroid-sensitive recurrent optic neuritis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2, 1–3.
- Chan, K.H., Kwan, J.S., Ho, P.W., Ho, J.W., Chu, A.C., Ramsden, D.B., 2010. Aquaporin-4 autoantibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders: comparison between tissue-based and cell-based indirect immunofluorescence assays. *J. Neuroinflammation* 7, 1–9.
- Cobo-Calvo, Á., Sepúlveda, M., Bernard-Valnet, R., Ruiz, A., Brassat, D., Martínez-

- Yélamos, S., Saiz, A., Marignier, R., 2016. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in aquaporin 4 antibody seronegative longitudinally extensive transverse myelitis: Clinical and prognostic implications. *Mult. Scler. J.* 22, 312–319.
- Dalmau, J., Geis, C., Graus, F., 2017. Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System. *Physiol. Rev.* 97, 839–887.
- Dalmau, J., Gleichman, A.J., Hughes, E.G., Rossi, J.E., Peng, X., Lai, M., Dessain, S.K., Rosenfeld, M.R., Balice-Gordon, R., Lynch, D.R., 2008. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet. Neurol.* 7, 1091–8.
- Dalmau, J., Graus, F., 2018. Antibody-Mediated Encephalitis. *N. Engl. J. Med.* 378, 840–851.
- Dalmau, J., Tüzün, E., Wu, H.Y., Masjuan, J., Rossi, J.E., Voloschin, A., Baehring, J.M., Shimazaki, H., Koide, R., King, D., Mason, W., Sansing, L.H., Dichter, M.A., Rosenfeld, M.R., Lynch, D.R., 2007. Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Ann. Neurol.* 61, 25–36.
- Di Pauli, F., Berger, T., 2018. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disorders: Toward a New Spectrum of Inflammatory Demyelinating CNS Disorders? *Front. Immunol. Immunol* 9, 2753.
- Dos Passos, G.R., Oliveira, L.M., da Costa, B.K., Apostolos-Pereira, S.L., Callegaro, D., Fujihara, K., Sato, D.K., 2018. MOG-IgG-associated optic neuritis, encephalitis, and myelitis: Lessons learned from neuromyelitis optica spectrum disorder. *Front. Neurol.* 9, 1–10.
- Fazio, R., Malosio, M.L., Lampasona, V., De Feo, D., Privitera, D., Marnetto, F., Centonze, D., Ghezzi, A., Comi, G., Furlan, R., Martino, G., 2009. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients. *Mult. Scler.* 15, 1153–1163.
- Fryer, J.P., Lennon, V.A., Pittock, S.J., Jenkins, S.M., Fallier-Becker, P., Clardy, S.L., Horta, E., Jedynek, E.A., Lucchinetti, C.F., Shuster, E.A., Weinshenker,

- B.G., Wingerchuk, D.M., McKeon, A., 2014. AQP4 autoantibody assay performance in clinical laboratory service. *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflammation* 1, e11.
- Gastaldi, M., Nosadini, M., Spatola, M., Sartori, S., Franciotta, D., 2018. N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: laboratory diagnostics and comparative clinical features in adults and children. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 18, 181–193.
- Graus, F., Titulaer, M.J., Balu, R., Benseler, S., Bien, C.G., Cellucci, T., Cortese, I., Dale, R.C., Gelfand, J.M., Geschwind, M., Glaser, C.A., Honnorat, J., Höftberger, R., Iizuka, T., Irani, S.R., Lancaster, E., Leypoldt, F., Prüss, H., Rae-Grant, A., Reindl, M., Rosenfeld, M.R., Rostásy, K., Saiz, A., Venkatesan, A., Vincent, A., Wandering, K.P., Waters, P., Dalmau, J., 2016. A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis. *Lancet Neurol* 15, 391–404.
- Höftberger, R., Sabater, L., Marignier, R., Aboul-Enein, F., Bernard-Valnet, R., Rauschka, H., Ruiz, A., Blanco, Y., Graus, F., Dalmau, J., Saiz, A., 2013. An optimized immunohistochemistry technique improves NMO-IgG detection: Study comparison with cell-based assays. *PLoS One* 8, 6–11.
- Hu, W., Lucchinetti, C.F., 2009. The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases. *Semin. Immunopathol.* 31, 439–453.
- Jarius, S., Franciotta, D., Paul, F., Bergamaschi, R., Rommer, P.S., Ruprecht, K., Ringelstein, M., Aktas, O., Kristoferitsch, W., Wildemann, B., 2012. Testing for antibodies to human aquaporin-4 by ELISA: Sensitivity, specificity, and direct comparison with immunohistochemistry. *J. Neurol. Sci.* 320, 32–37.
- Jarius, Sven, Wildemann, B., 2013. Aquaporin-4 antibodies (NMO-IgG) as a serological marker of neuromyelitis optica: A critical review of the literature. *Brain Pathol.* 23, 661–683.
- Jarius, S., Wildemann, B., 2013. The history of neuromyelitis optica. *J. Neuroinflammation* 10, 1–12.
- Jarius, S., Wildemann, B., 2010. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: Diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 383–392.
- Jensen, E.C., 2012. The basics of Western blotting. *Anat. Rec.* 295, 369–71.
- Kang, E., Min, J., Lee, K.H., Kim, B.J., 2012. Clinical Usefulness of Cell-based

- Indirect Immunofluorescence Assay for the Detection of Aquaporin-4 Antibodies in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. *Ann. Lab. Med.* 32, 331–338.
- Kang, E.S., Min, J.H., Lee, K.H., Kim, B.J., 2012. Clinical usefulness of cell-based indirect immunofluorescence assay for the detection of aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica spectrum disorder. *Ann. Lab. Med.* 32, 331–338.
- Kim, Y.J., Jung, S.W., Kim, Y., Park, Y.J., Han, K., Oh, E.J., 2012. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: comparison of tissue-based and cell-based indirect immunofluorescence assays and ELISA. *J. Clin. Lab. Anal.* 26, 184–189.
- Kuhle, J., Pohl, C., Mehling, M., Edan, G., Freedman, M.S., Hartung, H.-P., Polman, C.H., Miller, D.H., Montalban, X., Barkhof, F., Bauer, L., Dahms, S., Lindberg, R., Kappos, L., Sandbrink, R., 2007. Lack of Association between Antimyelin Antibodies and Progression to Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 356, 371–378.
- Lai, M., Hughes, E.G., Peng, X., Zhou, L., Gleichman, A.J., Shu, H., Matà, S., Kremens, D., Vitaliani, R., Geschwind, M.D., Bataller, L., Kalb, R.G., Davis, R., Graus, F., Lynch, D.R., Balice-Gordon, R., Dalmau, J., 2009. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann. Neurol.* 65, 424–34.
- Lennon, P.V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., Weinshenker, B.G., 2004. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364, 2106–2112.
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., Hinson, S.R., 2005. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J. Exp. Med.* 202, 473–477.
- McCracken, L., Zhang, J., Greene, M., Crivaro, A., Gonzalez, J., Kamoun, M., Lancaster, E., 2017. Improving the antibody-based evaluation of autoimmune encephalitis. *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflammation* 4, 1–7.
- McLaughlin, K.A., Chitnis, T., ȧ, J.N., Franz, B., Mcardel, S., Kuhle, J., Kappos, L., Rostasy, K., Gagne, D., Ness, J.M., ȧȧ, S.T., Connor, K.C.O., Viglietta, V.,

- Wong, S.J., Tavakoli, N.P., Seze, J. De, Samia, J., Bar-or, A., Hafler, D.A., Banwell, B., Kai, W., 2009. Age-dependent B cell Autoimmunity to a Myelin Surface Antigen in Pediatric Multiple Sclerosis 183, 4067–4076.
- Nakajima, H., Motomura, M., Tanaka, K., Fujikawa, A., Nakata, R., Maeda, Y., Shima, T., Mukaino, A., Yoshimura, S., Miyazaki, T., Shiraishi, H., Kawakami, A., Tsujino, A., 2015. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in idiopathic optic neuritis. *BMJ Open* 5, e007766.
- O'Connor, K.C., McLaughlin, K.A., Jager, P.L., Chitnis, T., Bettelli, E., Xu, C., Robinson, W.H., Cherry, S. V., Bar-Or, A., Banwell, B., Fukaura, H., Fukazawa, T., Tenembaum, S., Wong, S.J., Tavakoli, N.P., Idrissova, Z., Viglietta, V., Rostasy, K., Pohl, D., Dale, R.C., Freedman, M., Strinman, L., Buckle, G.J., Kuchroo, V.K., Hafler, D.A., Wucherpfennig, K.W., 2007. Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nat. Med.* 13, 211–217.
- Ogawa, R., Nakashima, I., Takahashi, T., Kaneko, K., Akaishi, T., Takai, Y., Sato, D.K., Nishiyama, S., Misu, T., Kuroda, H., Aoki, M., Fujihara, K., 2017. MOG antibody-positive, benign, unilateral, cerebral cortical encephalitis with epilepsy. *Neurol. Neuroimmunol. NeuroInflammation* 4, 1–10.
- Oliveira, L.M., Apóstolos-Pereira, S.L., Pitombeira, M.S., Bruel Torretta, P.H., Callegaro, D., Sato, D.K., 2018. Persistent MOG-IgG positivity is a predictor of recurrence in MOG-IgG-associated optic neuritis, encephalitis and myelitis. *Mult. Scler. J.* 1–8.
- Paul, F., Jarius, S., Aktas, O., Bluthner, M., Bauer, O., Appelhans, H., Franciotta, D., Bergamaschi, R., Littleton, E., Palace, J., Seelig, H.P., Hohlfeld, R., Vincent, A., Zipp, F., 2007. Antibody to aquaporin 4 in the diagnosis of neuromyelitis optica. *PLoS Med.* 4, e133.
- Possee, R.D., 1997. Baculoviruses as expression vectors. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 569–72.
- Pröbstel, A.K., Dornmair, K., Bittner, R., Sperl, P., Jenne, D., Magalhaes, S., Villalobos, A., Breithaupt, C., Weissert, R., Jacob, U., Krumbholz, M., Kuempfel, T., Blaschek, A., Stark, W., Gärtner, J., Pohl, D., Rostasy, K., Weber, F., Forne,

- I., Khademi, M., Olsson, T., Brilot, F., Tantsis, E., Dale, R.C., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Banwell, B., Bar-Or, A., Meinl, E., Derfuss, T., 2011. Antibodies to MOG are transient in childhood acute disseminated encephalomyelitis. *Neurology* 77, 580–588.
- Ramanathan, S., Reddel, S.W., Henderson, A., Parratt, J.D., Barnett, M., Gatt, P.N., Merheb, V., Kumaran, R.Y., Pathmanandavel, K., Sinmaz, N., Ghadiri, M., Yiannikas, C., Vucic, S., Stewart, G., Bleasel, A.F., Booth, D., Fung, V.S., Dale, R.C., Brilot, F., 2014. Antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in bilateral and recurrent optic neuritis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 1, 1–12.
- Ramberger, M., Peschl, P., Schanda, K., Irschick, R., Höftberger, R., Deisenhammer, F., Rostásy, K., Berger, T., Dalmau, J., Reindl, M., 2015. Comparison of diagnostic accuracy of microscopy and flow cytometry in evaluating N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in serum using a live cell-based assay. *PLoS One* 10, 1–18.
- Reindl, M., Di Pauli, F., Rostasy, K., Berger, T., 2013. The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 455–461.
- Ricken, G., Schwaiger, C., De Simoni, D., Pichler, V., Lang, J., Glatter, S., Macher, S., Rommer, P.S., Scholze, P., Kubista, H., Koneczny, I., Hoftberger, R., 2018. Detection Methods for Autoantibodies in Suspected Autoimmune Encephalitis. *Front. Neurol.* 9, 841.
- Sato, D.K., Callegaro, D., Lana-Peixoto, M.A., Waters, P.J., de Haidar Jorge, F.M., Takahashi, T., Nakashima, I., Apostolos-Pereira, S.L., Talim, N., Simm, R.F., Lino, A.M., Misu, T., Leite, M.I., Aoki, M., Fujihara, K., 2014. Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology* 82, 474–481.
- Takahashi, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Misu, T., Miyazawa, I., Nakamura, M., Watanabe, S., Ishii, N., Itoyama, Y., 2006. Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica. *Tohoku J. Exp Med* 210, 307–313.
- Takahashi, T., Fujihara, K., Nakashima, I., Misu, T., Miyazawa, I., Nakamura, M.,

- Watanabe, S., Shiga, Y., Kanaoka, C., Fujimori, J., Sato, S., Itoyama, Y., 2007. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain* 130, 1235–1243.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4350–4354.
- Waters, P., Jarius, S., Littleton, E., Leite, M.I., Jacob, S., Gray, B., Gheraldes, R., Vale, T., Jacob, A., Palace, J., Maxwell, S., Beeson, D., Vincent, A., 2008. Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica and longitudinally extensive transverse myelitis. *Arch Neurol* 65, 913–919.
- Waters, P., Reindl, M., Saiz, A., Schanda, K., Tuller, F., Kral, V., Nytrova, P., Sobek, O., Nielsen, H.H., Barington, T., Lillevang, S.T., Illes, Z., Rentzsch, K., Berthele, A., Berki, T., Granieri, L., Bertolotto, A., Giometto, B., Zuliani, L., Hamann, D., Van Pelt, E.D., Hintzen, R., Höftberger, R., Costa, C., Comabella, M., Montalban, X., Tintoré, M., Siva, A., Altintas, A., Deniz, G., Woodhall, M., Palace, J., Paul, F., Hartung, H.P., Aktas, O., Jarius, S., Wildemann, B., Vedeler, C., Ruiz, A., Leite, M.I., Trillenber, P., Probst, M., Saschenbrecker, S., Vincent, A., Marignier, R., 2016. Multicentre comparison of a diagnostic assay: Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 1005–1015.
- Waters, P., Vincent, A., 2008. Detection of anti-Aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: Current status of the assays. *Int. MS J.*
- Waters, P., Woodhall, M., O'Connor, K.C., Reindl, M., Lang, B., Sato, D.K., Jurynczyk, M., Tackley, G., Rocha, J., Takahashi, T., Misu, T., Nakashima, I., Palace, J., Fujihara, K., Isabel Leite, M., Vincent, A., 2015. MOG cell-based assay detects non-MS patients with inflammatory neurologic disease. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2, e89.
- Waters, P.J., McKeon, A., Leite, M.I., Rajasekharan, S., Lennon, V.A., Villalobos, A., Palace, J., Mandrekar, J.N., Vincent, A., Bar-Or, A., Pittock, S.J., 2012. Serologic diagnosis of NMO: A multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology* 78, 665–671.

- Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., De Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., Jarius, S., Lana-Peixoto, M., Levy, M., Simon, J.H., Tenenbaum, S., Traboulsee, A.L., Waters, P., Wellik, K.E., Weinshenker, B.G., 2015. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., Mack, A.F., 2011. Structure and functions of aquaporin-4-based orthogonal arrays of particles. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 287, 1–41.

Table. Clinical application of autoantibodies in patients using CBA.

Disease	Antigen	Diagnostic application	Prognostic application
NMOSD	AQP4	Yes	High-risk of relapsing disease; Antibody titers might be used in selected individual cases for disease monitoring
MONEM	MOG	Yes	Seroconversion to negative status during the follow-up may indicate a lower risk of relapsing disease
Autoimmune encephalitis*	NMDA receptor	Yes	Unknown
	LGI1		
	Caspr2		
	AMPA receptor		
	GABAb receptor		
	GABAA receptor		
	DPPX		
	Dopamine-2 receptor		
	IgLON5		
	P-Q-type VGCC		
	mGLUR1		
	mGLUR5		
	Glycine receptor		

NMOSD: Neuromyelitis optica spectrum disorders, **MONEM:** MOG-associated optic neuritis, encephalitis and myelitis, **AQP4:** Aquaporin-4, **MOG:** Myelin oligodendrocyte glycoprotein, **NMDA:** N-methyl-D-aspartate, **LGI1:** Leucine-rich glioma inactivated 1, **CASPR2:** Contactin-associated protein-like 2, **AMPA:** α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, **GABA:** Gamma-aminobutyric acid, **DPPX:** Dipeptidyl-peptidase-like protein-6, **VGCC:** voltage-gated calcium channel, **mGLUR:** Metabotropic glutamate receptor.

** This list refers only to cell-surface autoantigens with detected autoantibodies*