

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia

Antônio Márcio de Faria Andrade

**INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA NA FEBRE AMARELA:
EXPERIÊNCIA CLÍNICO-CIRÚRGICA DE UM CENTRO TRANSPLANTADOR
BRASILEIRO NO ENFRENTAMENTO DA EPIDEMIA DO ANO DE 2018**

Belo Horizonte

2023

Antônio Márcio de Faria Andrade

**INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA NA FEBRE AMARELA:
EXPERIÊNCIA CLÍNICO-CIRÚRGICA DE UM CENTRO TRANSPLANTADOR
BRASILEIRO NO ENFRENTAMENTO DA EPIDEMIA DO ANO DE 2018**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Cirurgia e Oftalmologia

Orientador: Professor Dr. Cristiano Xavier Lima

Belo Horizonte

2023

Andrade, Antônio Márcio de Faria.
AN553i Insuficiência hepática aguda na Febre Amarela [recursos eletrônicos]:
experiência clínico-cirúrgica de um Centro Transplantador Brasileiro no
enfrentamento da epidemia do ano de 2018. / Antônio Márcio de Faria Andrade.
-- Belo Horizonte: 2023.
124f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Cristiano Xavier Lima.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e Oftalmologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.

1. Febre Amarela. 2. Falência Hepática Aguda. 3. Transplante de Fígado. 4.
Hepatite. 5. Sofosbuvir. 6. Dissertação Acadêmica. I. Lima, Cristiano Xavier. II.
Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 530

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA
ATA DE DEFESA DE TESE

Às 13:30 horas do dia sete de dezembro de dois mil e vinte e três, presencial, na sala 526, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **ANTÔNIO MÁRCIO DE FARIA ANDRADE**. A presidência da sessão coube ao professor Cristiano Xavier Lima (orientador). Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Cristiano Xavier Lima, UFMG, Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, FMUSP, Luciana Costa Faria, UFMG, Wanessa Trindade Clemente, UFMG e Paula Vieira Teixeira Vidigal, UFMG. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: **INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA NA FEBRE AMARELA: EXPERIÊNCIA CLÍNICO-CIRÚRGICA DE UM CENTRO TRANSPLANTADOR BRASILEIRO NO ENFRENTAMENTO DA EPIDEMIA NO ANO DE 2018**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar aprovada a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 07 de dezembro de 2023.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Cristiano Xavier Lima, Chefe de departamento**, em 08/12/2023, às 14:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Costa Faria, Professora do Magistério Superior**, em 08/12/2023, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, Usuário Externo**, em 13/12/2023, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Membro**, em 14/12/2023, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wanessa Trindade Clemente, Professora do Magistério Superior**, em 18/12/2023, às 15:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2720724** e o código CRC **2C0D6075**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA AGUDA NA FEBRE AMARELA: EXPERIÊNCIA CLÍNICO-CIRÚRGICA DE UM CENTRO TRANSPLANTADOR BRASILEIRO NO ENFRENTAMENTO DA EPIDEMIA NO ANO DE 2018.

ANTÔNIO MÁRCIO DE FARIA ANDRADE

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia sete de dezembro de dois mil e vinte e três, pela Banca Examinadora designada pelo PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Cristiano Xavier Lima

Universidade Federal de Minas Gerais

Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Luciana Costa Faria

Universidade Federal de Minas Gerais

Wanessa Trindade Clemente

Universidade Federal de Minas Gerais

Paula Vieira Teixeira Vidigal

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 07 de dezembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Cristiano Xavier Lima, Chefe de departamento**, em 08/12/2023, às 14:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Costa Faria, Professora do Magistério Superior**, em 08/12/2023, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque, Usuário Externo**, em 13/12/2023, às 10:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Vieira Teixeira Vidigal, Membro**, em 14/12/2023, às 15:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wanessa Trindade Clemente, Professora do Magistério Superior**, em 18/12/2023, às 15:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2720725** e o código CRC **EB5EF7E7**.

Para Vovó Irany,

Que comemorou cada vitória e incentivou cada passo.

Agora sou doutor sob seus olhos de luz.

Para Ana Beatriz, Elisa e João Gabriel,

Que me fazem sentir forte, ativo, pleno e ignorante.

Tão jovens e sabem a diferença entre conhecimento e sabedoria.

E cujas luzes apontam para o horizonte.

Para minha Cris.

Porque o tempo passa e minha admiração e minha gratidão aumentam.

Para meus pais, Júnior e Ecléria

– alicerce, apoio, suporte – por tudo.

AGRADECIMENTOS



Ao meu amigo e orientador *Cristiano Xavier Lima*, professor e companheiro, minha dívida é inestimável por tantas lições e tanto apoio.

À *Equipe de Transplante de Fígado do Hospital Felício Rocho*, que enfrentou os desafios da epidemia de 2018 da mesma forma como enfrenta o difícil dia-a-dia do transplante: com coragem e foco no paciente. Minha gratidão e meu orgulho por fazer parte deste time.

À toda a equipe do *Centro de Terapia Intensiva do Hospital Felício Rocho*, representada na figura do *Dr. Rogério de Castro Pereira*, meu agradecimento pelo apoio diário à atividade transplantadora, e especialmente à dedicação e coragem no trabalho durante a epidemia de 2018.

Aos dedicados *residentes de Gastroenterologia do Hospital Felício Rocho* que enfrentaram a epidemia de 2018, hoje grandes gastroenterologistas, *Juliana Papatella Araújo, Thais Ribeiro Gambogi Torres, Ana Cláudia de Souza Silva, Remo Gomes Guércio e Ricardo Fortes Monteiro de Castro*; a este último um agradecimento especial por sua inestimável ajuda coletando e armazenando os dados deste trabalho.

À equipe da *Clínica de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital Felício Rocho* pelo incentivo, apoio e acolhimento.

À *Diretoria do Hospital Felício Rocho*, que sempre apoiou a atividade transplantadora e a inovação, e que corajosamente compreendeu a importância do papel do hospital em dar suporte à sociedade mineira em um momento tão difícil da saúde pública quanto foi a epidemia de 2018.

À *Professora Paula Vieira Teixeira Vidigal*, por seu inestimável apoio na análise anatomopatológica e ajuda na interpretação destes resultados, além de infinita disponibilidade para ensinar e discutir.

À *Professora Rosângela Teixeira*, por sua paciência e carinho em revisar o texto e dar sugestões com sua grande experiência.

EPÍGRAFE



Desenho de J. Carlos representando Oswald Cruz sob a forma de mosquito, montado numa seringa, em alusão à vacina antivariólica, com o olhar posto em Cuba, de onde provinha a "teoria havanesa", de Carlos Juan Finlay, sobre a transmissão da febre amarela pelo *Stegomyia fasciata*, que passou a chamar-se depois *Aedes aegypti*.
Revista *Tagarela*, 1903.

1 *

"Não há quem não esteja embasbacado
Ante um mosquito assim tão assombroso
Que se propõe e diz que poderoso
Fará desta cidade um Eldorado

Em breve o "Mal" de todo há de acabado
Ficar, e ninguém mais do perigoso
Vírus, da grande "bicha" há de medroso
Ser no Brasil de súbito atacado!

Chamam-lhe muitos: Culicídio... ovante
Que de seringa em punho irradiante
Em Cuba irá brilhar entre portentos.

Da febre amarela, "azúla" e é bem certo,
Pois que tem medo aqui de a ver de perto,
Com todos os seus féros movimentos.

Nós todos¹

RESUMO

Introdução: A Insuficiência Hepática Aguda (IHA) é uma condição grave caracterizada por rápida deterioração da função hepática em indivíduos sem doença hepática pré-existente, e o transplante hepático (TH) é o tratamento de maior impacto no seu tratamento. A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa endêmica de áreas florestais na África e América com altos índices de mortalidade. Trata-se de doença de comprometimento multi-sistêmico, porém o fígado é o órgão mais afetado, o que torna a IHA uma causa comum de óbito. O estado de Minas Gerais, no Brasil, foi gravemente afetado por uma grave epidemia de FA entre junho de 2017 e 2018. Neste contexto, pacientes que desenvolveram IHA foram avaliados para a realização de TH e, de forma pioneira no mundo, os primeiros TH em FA foram realizados. **Objetivos:** Descrever uma série de casos de pacientes com FA admitidos no ano de 2018 no Hospital Felício Rocho (HFR), um hospital terciário de referência em transplante no estado de Minas Gerais, Brasil. **Métodos:** HFR foi nomeado como referência para realizar TH em pacientes com IHA por FA e elaborou protocolo: parâmetros para indicação de TH, plasmaférese, uso compassivo de medicamentos antivirais, avaliação da coagulopatia, abordagem per- e pós-operatória dos pacientes. O banco de dados consistiu de informações de pacientes com FA confirmada após autorização do Comitê de ética do HFR. **Resultados:** Foram admitidos 14 pacientes com FA confirmada. Oito desenvolveram IHA com manifestações neurológicas com evolução para óbito ou IHA com necessidade de transplante. A mediana (com intervalo interquartil) dos exames laboratoriais desse grupo revelou: bilirrubinas (pico) 5,06 mg/dl (2,8-8,3), RNI 2,9 (1,4- >9,0); fator V 22% (11-29%). O intervalo médio entre os sinais neurológicos iniciais e escala de coma de Glasgow <8 foi de 20 horas (1-60h), e até o óbito 45,5 horas (10-67h). O intervalo médio icterícia-EH foi de seis dias. Quatro pacientes foram a óbito sem TH, dois por choque séptico e dois por falência de múltiplos órgãos. Quatro pacientes foram submetidos a TH. A sobrevida foi de 50% em cinco anos de seguimento. O critério de Clichy modificado (fator V (<50%) e EH graus I/II) foi utilizado nos casos de sucesso. Os dois sobreviventes apresentaram complicações infecciosas, como pneumonia, sepse de foco indeterminado e infecção pelo CMV. Foi realizada biópsia hepática dos pacientes transplantados no 2º DPO durante abordagem de hemorragia, tendo-se constatado recidiva viral sobre o enxerto em ambos. O paciente com maior marcação viral à imuno-histoquímica apresentou maior gravidade nos achados histológicos e evoluiu para óbito; em contraste, o paciente que sobreviveu estava em uso compassivo de sofosbuvir e apresentou menor quantidade de vírus e no parênquima e lesão menos intensa no enxerto. O outro paciente que sobreviveu ao TH foi submetido a plasmaférese e também fez uso de sofosbuvir. **Discussão:** Os critérios tradicionais de indicação de TH – King’s College e Clichy-Villejuif – foram mau preditores de evolução de pacientes com IHA por FA. Por outro lado, os critérios de “Clichy modificado” foram úteis para indicar o TH visto que incluíram o fator V (mais sensível) na avaliação da coagulopatia e aceitaram graus mais precoces de EH. As manifestações neurológicas na IHA por FA foram preditoras de mortalidade, mas com características peculiares, sugerindo que outros mecanismos possam estar associados à disfunção hepática. A reinfeção do enxerto pelo vírus da FA foi universal, sugerindo associação entre a gravidade da lesão hepática e a maior carga viral. Os dois pacientes que sobreviveram pós-TH fizeram uso de sofosbuvir, o que pode estar relacionado ao seu efeito anti-viral. Apesar de uma elevada mortalidade, a experiência revelou-se capaz de sugerir modificações nas condutas convencionais que podem impactar positivamente na sobrevida de pacientes transplantados por FA.

Palavras – chave: febre amarela, insuficiência hepática aguda, hepatite fulminante, transplante hepático

ABSTRACT

Introduction: Acute Liver Failure (ALF) is a serious condition characterized by rapid deterioration of liver function in individuals without pre-existing liver disease, and liver transplantation (LT) is the treatment with the greatest impact in the last decades. Yellow fever (YF) is an infectious disease endemic to forest areas in Africa and America with high mortality rates. It is a disease with multi-system involvement, but the liver is the most affected organ, which makes ALF a common cause of death. The state of Minas Gerais, in Brazil, was seriously affected by a serious YF epidemic between June 2017 and 2018. In this context, patients who developed ALF were evaluated for LT and, in a pioneering way in the world, the first LT in FA were performed. **Objectives:** To describe a case series of patients with YF admitted in 2018 at Hospital Felício Rocho (HFR), a tertiary referral hospital for transplantation in the state of Minas Gerais, Brazil. **Methods:** HFR was appointed as a reference for performing LT in patients with ALF due to YF and developed a protocol: parameters for indicating LT, plasmapheresis, compassionate use of antiviral medications, assessment of coagulopathy, pre- and postoperative approach to patients. The database consisted of information from patients with confirmed YF after authorization from the HFR Ethics Committee. **Results:** 14 patients with confirmed YF were admitted. Eight developed ALF with neurological manifestations that led to death or ALF requiring transplantation. The median (with interquartile range) of laboratory tests in this group revealed: bilirubin (peak) 5.06 mg/dl (2.8-8.3), INR 2.9 (1.4->9.0); factor V 22% (11-29%). The average interval between initial neurological signs and Glasgow Coma Scale <8 was 20 hours (1-60h), and until death 45.5 hours (10-67h). The average jaundice-HE interval was six days. Four patients died without LT, two from septic shock and two from multiple organ failure. Four patients underwent LT. Survival was 50% at five years of follow-up. The modified Clichy criterion (factor V (<50%) and HE grades I/II) was used in successful cases. The two survivors presented infectious complications, such as pneumonia, sepsis of undetermined focus and CMV infection. A liver biopsy was performed on the transplanted patients on the 2nd POD during the hemorrhage approach, and viral recurrence was found on the graft in both. The patient with the highest viral staining on immunohistochemistry showed greater severity in histological findings and died; in contrast, the patient who survived was on compassionate use of sofosbuvir and had lower amounts of virus in the parenchyma and less intense damage to the graft. The other patient who survived LT underwent plasmapheresis and also used sofosbuvir. **Discussion:** The traditional criteria for indicating LT – King's College and Clichy-Villejuif – were poor predictors of the evolution of patients with ALF due to YF. On the other hand, the “modified Clichy” criteria were useful to indicate LT as they included factor V (more sensitive) in the assessment of coagulopathy and accepted earlier degrees of HE. Neurological manifestations in ALF due to AF were predictors of mortality, but with peculiar characteristics, suggesting that other mechanisms may be associated with liver dysfunction. Reinfection of the graft by the YF virus was universal, suggesting an association between the severity of liver injury and higher viral load. The two patients who survived after LT used sofosbuvir, which may be related to its anti-viral effect. Despite a high mortality rate, the experience proved capable of suggesting changes in conventional procedures that could positively impact the survival of patients transplanted due to YF.

Key words: *yellow fever, acute liver failure, fulminant hepatitis, liver transplantation*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mapa da história natural da FA no Brasil ----- 20
- Figura 2 – Distribuição espacial dos casos de FA durante o período de 2001-2019 ----- 21
- Figura 3 - Distribuição dos casos humanos e das epizootias confirmados para FA, por município do local provável de infecção – monitoramento de julho/2017 a junho/2018, Brasil ----- 22
- Figura 4 - Série histórica do número de casos humanos confirmados para FA e a letalidade, segundo o ano de início dos sintomas, Brasil, de 1980 a junho de 2017 ----- 23
- Figura 5 - Municípios com casos humanos confirmados de FA silvestre em Minas Gerais, Brasil, no período de monitoramento de julho de 2016 a junho de 2017 e de julho de 2017 a junho de 2018 ----- 23
- Figura 6 - Estágios da infecção pelo vírus da febre amarela, com descrição das principais características clínicas e laboratoriais da doença ----- 25
- Figura 7 – Fluxograma para atendimento de febre amarela da SES-MG ----- 36
- Figura 8 - Hospitais de Referência para atendimento da febre amarela na forma moderada (GRUPO B) e forma grave (GRUPO C) no estado de MG segundo SES-MG (22/02/2018) ----- 87
- Figura 9 – Fluxograma acompanha os pacientes internados no HFR com FA confirmada considerando dois grupos a partir do seu desfecho: o grupo que evoluiu com **melhora clínica (MC)** e o grupo que evoluiu com **perda do fígado ou óbito (PFO)** e a sua relação com o desenvolvimento de manifestações neurológicas. ----- 45

Figura 10 – Fluxograma acompanha os pacientes internados no HFR com FA confirmada considerando dois grupos a partir do seu desfecho: o grupo que evoluiu com **melhora clínica (MC)** e o grupo que evoluiu com **perda do fígado ou óbito (PFO)** e a sua relação com o os níveis de RNI e Fator V ----- 50

Figura 11 – Aspecto macroscópico do fígado explantado de paciente submetido a TH por FA ---
----- 57

Figura 12 – Aspecto macroscópico de superfície de corte de fígado explantado fixado de paciente submetido a TH por FA ----- 58

Figura 13 – Cortes histológicos de fígado explantado de portador de FA submetido a TH por IHA (caso 11) em coloração por HE ----- 59

Figura 14 – Cortes histológicos em coloração por HE de biópsias de enxertos hepáticos, realizadas ambas no 2º DPO durante reabordagem cirúrgica de dois pacientes distintos. ----- 60

Figura 15 – Visão em microscopia eletrônica de cortes histológicos do fígado explantado de paciente submetido a TH por FA (caso 11) em aumentos progressivos ----- 62

Figura 16 - Imunohistoquímica realizada com anticorpo contra proteína do envelope de flavivírus 4G2 realizada em amostra de fígado explantado de paciente submetido a TH por FA (caso 11)
----- 62

Figura 17 - Imunohistoquímica com anticorpo contra proteína 4G2 do envelope de flavivírus em biópsias de enxertos hepáticos, realizadas no 2º DPO durante reabordagem cirúrgica de dois pacientes distintos ----- 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASFA – *American Society for Apheresis*

CDC – *Center of Disease Control and Prevention*

CIEVS – Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde

CTI – centro de terapia intensiva

DAMP – *damage associated molecular pattern*

EH – encefalopatia hepática

FA – Febre Amarela

FHEMIG – Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

HC-USP – Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

HEM – Hospital Eduardo de Menezes

HFR – Hospital Felício Rocho

IHA – Insuficiência Hepática Aguda

MBE – Medicina baseada em evidências

MG – Minas Gerais

OPAS – Organização Panamericana de Saúde

PCR – *polymerase chain reaction*

SES – Secretaria estadual de saúde

SP – São Paulo

SUS – Sistema Único de Saúde

TH – Transplante hepático

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Número de casos e óbitos por FA silvestre no estado de Minas Gerais nos anos de 1989 a 2021 – período de monitoramento de julho a junho -----	84
Tabela 2 – Critérios para indicação do transplante hepático na insuficiência hepática aguda de acordo com a Portaria 2600 de 21/10/2009 -----	85
Tabela 3 – Critérios modificados para transplante hepático na FA segundo Portaria 2117 (11/07/2018) do Ministério da Saúde do Brasil -----	35
Tabela 4 – Fluxo de comunicação entre a CENTRAL NACIONAL DE TRANSPLANTES - CNT e as Centrais Estaduais de Transplantes - CET para a submissão de casos para avaliação do Ministério da Saúde -----	86
Tabela 5 – Orientações para coleta e transporte de material para diagnóstico laboratorial de FA segundo o Manual de Manejo Clínico da Febre Amarela da SES-MG (27/01/2017) -----	88
Tabela 6 - Protocolo para realização de plasmaferese em pacientes com IHA no Hospital Felício Rocho -----	89
Tabela 7 – Características clínicas, demográficas e laboratoriais à admissão no Hospital Felício Rocho de pacientes com quadro confirmado de febre amarela entre 20/01/2018 e 20/02/2018 -- -----	43
Tabela 8 – Descrição das manifestações neurológicas em pacientes com FA confirmada internados no HFR -----	46
Tabela 9 – Evolução do RNI em pacientes com diagnóstico confirmado de FA internados no HFR -----	49
Tabela 10 – Evolução dos níveis de fator V entre portadores de FA internados no HFR -----	50
Tabela 11 – Dados relativos ao doador e eventos per-operatórios dos pacientes submetidos a TH por FA -----	54
Tabela 12 – Dados relativos ao período pós-operatório dos pacientes submetidos a TH por FA - -----	56

Gráfico 1 – Evolução da média dos níveis de bilirrubinas totais entre pacientes com FA confirmada internados no HFR ----- 47

SUMÁRIO

1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
1.1 – Introdução	17
1.2 – Epidemiologia da febre amarela	17
1.3 – Aspectos históricos da febre amarela	19
1.4 – Aspectos clínicos e laboratoriais da febre amarela	24
1.5 – Insuficiência Hepática Aguda	26
1.6 – Transplante Hepático	27
1.7 – Avaliação da coagulação na IHA e manejo transfusional no TH	28
1.8 – Plasmaférese na IHA	30
1.9 – Terapias antivirais na febre amarela	31
1.10 – O primeiro transplante hepático em São Paulo	32
2 – OBJETIVOS	33
2.1 – Objetivo primário	33
2.2 – Objetivos secundários	33
3 – PACIENTES E MÉTODOS	34
3.1 – Revisão de prontuário e coleta de dados	34
3.2 – Normatização dos critérios brasileiros para TH na febre amarela	34
3.3 – Organização estadual em Minas Gerais e fluxograma de encaminhamento ----	36
3.4 – Protocolo de abordagem clínica do portador de FA no Hospital Felício Rocho -	38
3.5 – Protocolo de preparação pré-operatória, protocolo cirúrgico e imunossupressão --	40
3.6 – Protocolo de Plasmaférese	40
3.7 – Uso compassivo de terapias antivirais na febre amarela	41
3.8 – Aspectos éticos	42
4- RESULTADOS	43
4.1 – Características dos pacientes	43
4.2 – Manifestações neurológicas	44
4.3 – Análise da evolução dos níveis séricos de bilirrubina e intervalo icterícia-encefa- lopatia	47
4.4 – Análise dos níveis de Tempo de Protrombina e RNI	48
4.5 – Análise dos níveis de Fator V	49
4.6 – Abordagem pré-transplante e indicação de TH	51

4.7 – Transplante hepático: per- e pós-operatório -----	54
4.8 – Anatomia Patológica -----	57
4.9 – Acompanhamento a longo prazo -----	64
5 – DISCUSSÃO -----	66
6 – CONCLUSÕES -----	82
Lista de FIGURAS e TABELAS -----	84
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	90
8 – ANEXOS -----	95
ANEXO A – Descrição de casos -----	95
ANEXO B – Apresentações realizadas em eventos científicos -----	102
ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Felício Rocho ----	107
ANEXO D – Artigo científico publicado: “ <i>Molecular Mechanism for Protection Against Liver Failure in Human Yellow Fever Infection</i> ” -----	111

1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 - Introdução

A febre amarela (FA) é uma doença transmitida por mosquitos e causada por um arbovírus do gênero *Flavivírus*. O ciclo de transmissão urbana da doença no Brasil foi interrompido nos anos 1940 após uma campanha de vacinação maciça e programas de controle do vetor. Entretanto, o ciclo silvestre enzoótico persiste nas regiões tropicais brasileiras e a infecção humana continua a ocorrer de forma esporádica.² Em 2017 um aumento incomum no número de casos de infecção em humanos foi relatado no estado de Minas Gerais, precedido por epizootias entre primatas não-humanos; em paralelo, um aumento da incidência foi encontrado no estado vizinho do Espírito Santo, além de casos no norte do estado de São Paulo.²

Diante de um número importante de casos da doença próximo a grandes centros urbanos e com estrutura hospitalar terciária avançada, pacientes com quadro clínico de insuficiência hepática aguda (IHA) por FA passaram a ser avaliados quanto a possibilidade de serem submetidos a transplante hepático (TH), procedimento inédito nesta doença até então. Após a realização dos primeiros casos, uma série de discussões emergiram, e serão foco deste trabalho.

1.2 – Epidemiologia da febre amarela

A FA é uma hepatonefrite hemorrágica aguda causada por um vírus de RNA fita-simples com aproximadamente 12.000 pares de bases pertencente à família *Flaviviridae*.³ É transmitido pela picada de um mosquito pertencente ao gênero *Aedes* (na África e nas Américas) ou ao gênero *Haemagogus* e *Sabethes* (nas Américas). As epidemias são mais frequentes e importantes na África do que nas Américas. O vírus da FA é nativo da África, onde deve ter surgido cerca de 3000 anos atrás. Provavelmente foi introduzido nas Américas durante o início do comércio de escravos, e se beneficiou de condições ecológicas favoráveis, incluindo a presença de vetores silvestres que, apesar de competentes, forçaram o vírus a adaptar-se modificando o seu genoma.³

A FA foi uma das doenças letais mais temidas antes do desenvolvimento de uma vacina eficaz. É transmitida em um ciclo envolvendo macacos e mosquitos, mas os seres humanos podem também atuar como hospedeiros virêmicos para a infecção do mosquito. O aumento recente na densidade e distribuição do mosquito vetor urbano, o *Aedes aegypti*, assim como o incremento das viagens aéreas, fizeram crescer o risco da introdução e disseminação da FA para as Américas do Norte e Central, o Caribe e a Ásia.⁴

Atualmente existem sete genótipos: cinco na África e dois nas Américas. Os genótipos africanos são caracterizados por sua afinidade aos seus vetores respectivos. Todos os estudos confirmaram a origem africana do vírus da FA. A cepa africana oriental é a mais antiga, e provavelmente divergiu de um ancestral flavivírus há cerca de 3500 anos atrás. Cepas africanas ocidentais se separaram das orientais cerca de três séculos antes da alegada introdução do vírus nas Américas. Cepas americanas estão mais próximas às da África ocidental.³

A FA foi responsável por milhares de mortes entre o século 18 e o começo do século 20, e por epidemias recorrentes em regiões endêmicas. A FA continua a ser uma ameaça à saúde pública, levando a taxas de morbimortalidade significativas em populações humanas da África e América do Sul. Uma taxa caso-fatalidade elevada é observada, especialmente na América do Sul, variando de 40 a 60%. A ocorrência de ciclos urbanos e rurais é frequentemente reportada no velho mundo, além dos ciclos silvestres. Grandes epidemias de FA ocorreram em Angola e na República Democrática do Congo em 2015-2016, que colocaram o vírus da FA no topo da lista de ameaças por arbovírus do *Center for Disease Control and Prevention (CDC) Global Disease Detection Operations Center*. De acordo com a Organização Panamericana de Saúde (OPAS), os países sulamericanos que relataram o maior número de casos de FA durante o período 1960-2019 foram Brasil (3829 casos), Peru (3189 casos), Bolívia (1546 casos) e Colômbia (701 casos).⁵

Os mecanismos da doença são pouco conhecidos e não foram objeto de pesquisa clínica moderna. Uma vez que não há tratamento específico, a condução dos pacientes com a doença é extremamente problemática, e a ênfase deve ser na vacinação preventiva. Como uma zoonose, a FA não pode ser

erradicada, mas a redução dos casos humanos pode ser atingida através de vacinação rotineira na infância em países endêmicos, com um baixo custo para os benefícios obtidos.⁵

1.3- Aspectos históricos da febre amarela

A primeira epidemia de FA no Brasil foi registrada em 1685, na região nordeste, especificamente em Recife, no estado de Pernambuco.⁵ Por volta de 1850, após quase um século sem notificações, o vírus da FA chegou ao Rio de Janeiro na região sudeste, causando mais de 4000 mortes. Apenas em 1900 Walter Reed e colaboradores provaram que a causa era um agente transmitido pelo vetor *Aedes aegypti*.⁵ Campanhas para controle do vetor reduziram a incidência da doença no início do século 20, e um relaxamento das medidas levaram a uma nova epidemia urbana grave no Rio de Janeiro em 1928-1929. Nos anos 1930 foi descrito o ciclo silvestre da doença, assim como o papel dos primatas não-humanos. Em 1937 iniciou-se a produção da vacina de vírus atenuado contra FA 17D no Instituto Oswaldo Cruz.⁵ A imunização em massa foi realizada nos anos 1940 associada a novas campanhas intensas para erradicação do vetor. Neste cenário, o último caso de transmissão urbana de FA registrado no Brasil ocorreu em 1942, na cidade de Sena Madureira, no Acre.⁶ O mapa da história natural da FA no Brasil está descrito abaixo, na figura 1.

No Brasil, a FA habitualmente restringe-se de forma endêmica a regiões da bacia do rio Amazonas. A ocorrência de epidemias é irregular e a transmissão pode variar de acordo com fatores como temperatura, índice de chuvas, alta densidade de vetores, amplificação de hospedeiros e baixa cobertura vacinal da população humana.⁵ Fora da bacia amazônica a FA reemerge com uma periodicidade anual irregular, mas com um padrão sazonal, sendo que a maioria dos casos ocorre entre dezembro e maio. Acredita-se que a disseminação do vírus da FA se dá para áreas fora da bacia amazônica através do deslocamento de pessoas infectadas e virêmicas ou pelo tráfico ilegal de primatas não-humanos.⁷

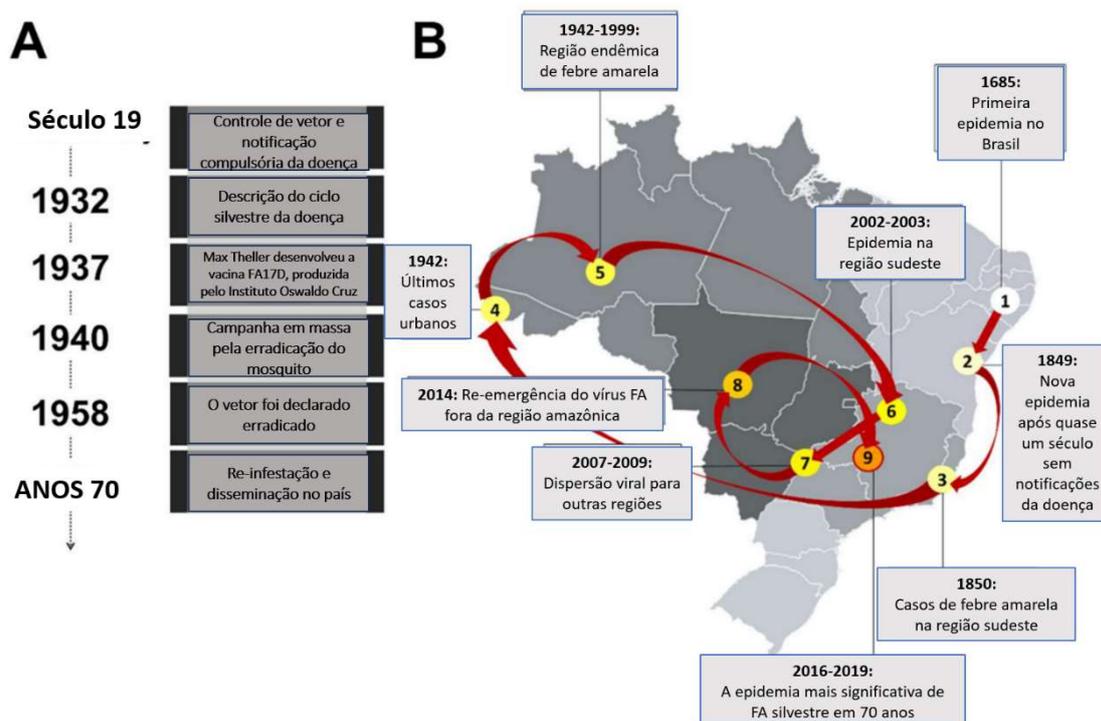


Figura 1 – Mapa da história natural da FA no Brasil. A – A linha do tempo destaca medidas sanitárias adotadas para lutar contra a FA no Brasil. B – Mapa do Brasil mostrando a detecção de distribuição do vírus da FA. As linhas vermelhas conectam os eventos de surgimento do vírus em diferentes regiões do país.⁵

Em 2000-2001, durante uma epidemia nos estados de Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP) um total de 98 casos humanos foram registrados, e epizootias foram também descritas nos estados da Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul. Outra epidemia ocorreu fora da bacia amazônica em 2008-2009, com 57 casos humanos relatados na região sudeste (MG e SP), nordeste (Bahia e Rio Grande do Norte) e sul (Rio Grande do Sul).⁷

No final de 2016, uma grande epidemia de FA iniciou-se no sudeste brasileiro. Até julho de 2017, 1412 epizotias, 777 casos humanos e 261 mortes foram registradas. Durante a estação interepidêmica, casos de FA foram reportados em primatas, mas não em humanos. Em dezembro de 2017, a epidemia de FA em humanos reemergiu no sudeste brasileiro. Um total de 1127 casos humanos e 331 óbitos foram confirmados (entre julho de 2017 e abril de 2018). A epidemia de FA silvestre iniciou-se em 2016 no estado de MG que apresentava naquele

momento baixa cobertura vacinal (57,26%). Apenas 32,7% dos municípios apresentavam cobertura vacinal igual ou superior a 95%. Em MG, entre julho de 2016 a junho de 2018, 1006 casos humanos e 340 óbitos foram confirmados.^{7; 8}

A figura 2 revela em um mapa do Brasil como no século XXI as epizootias e os casos de FA silvestre ocorreram de forma significativa na região sudeste do país – a mais povoada e com maior proximidade de hospitais de grande porte de nível terciário. Isto motivou grande debate na comunidade médica sobre a possibilidade de transplantar pacientes com IHA por FA, até então considerada uma contraindicação.

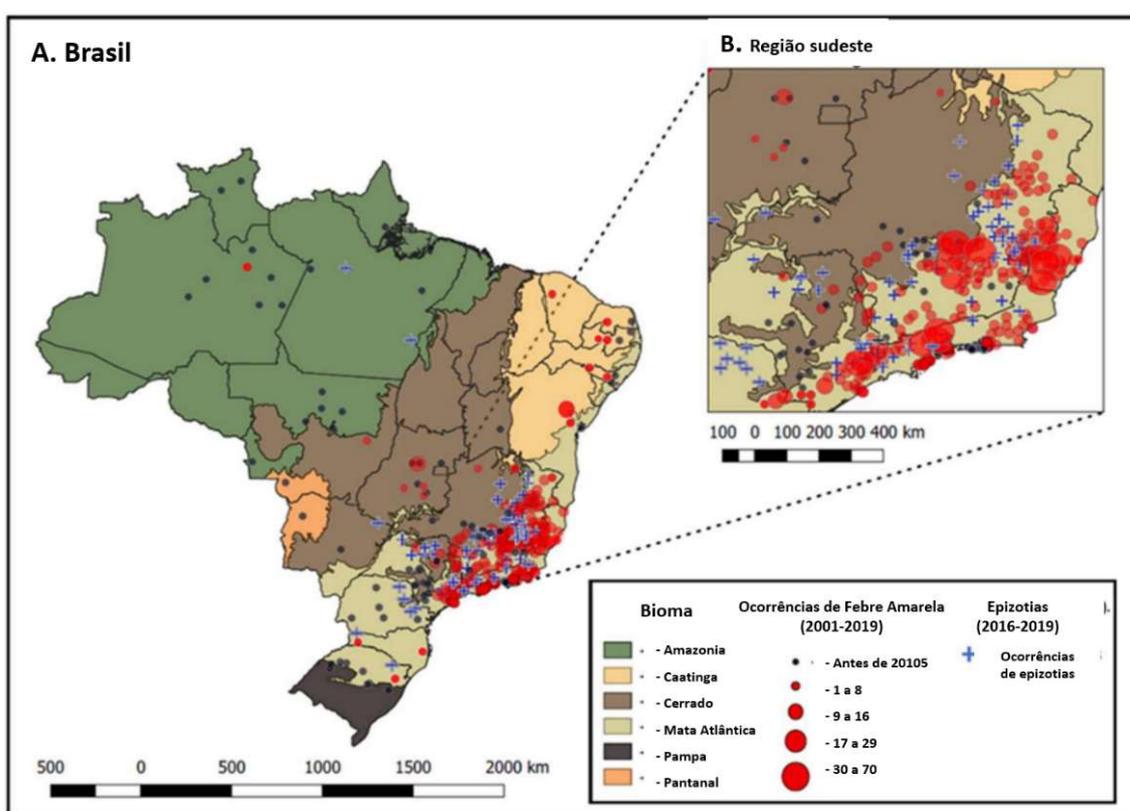
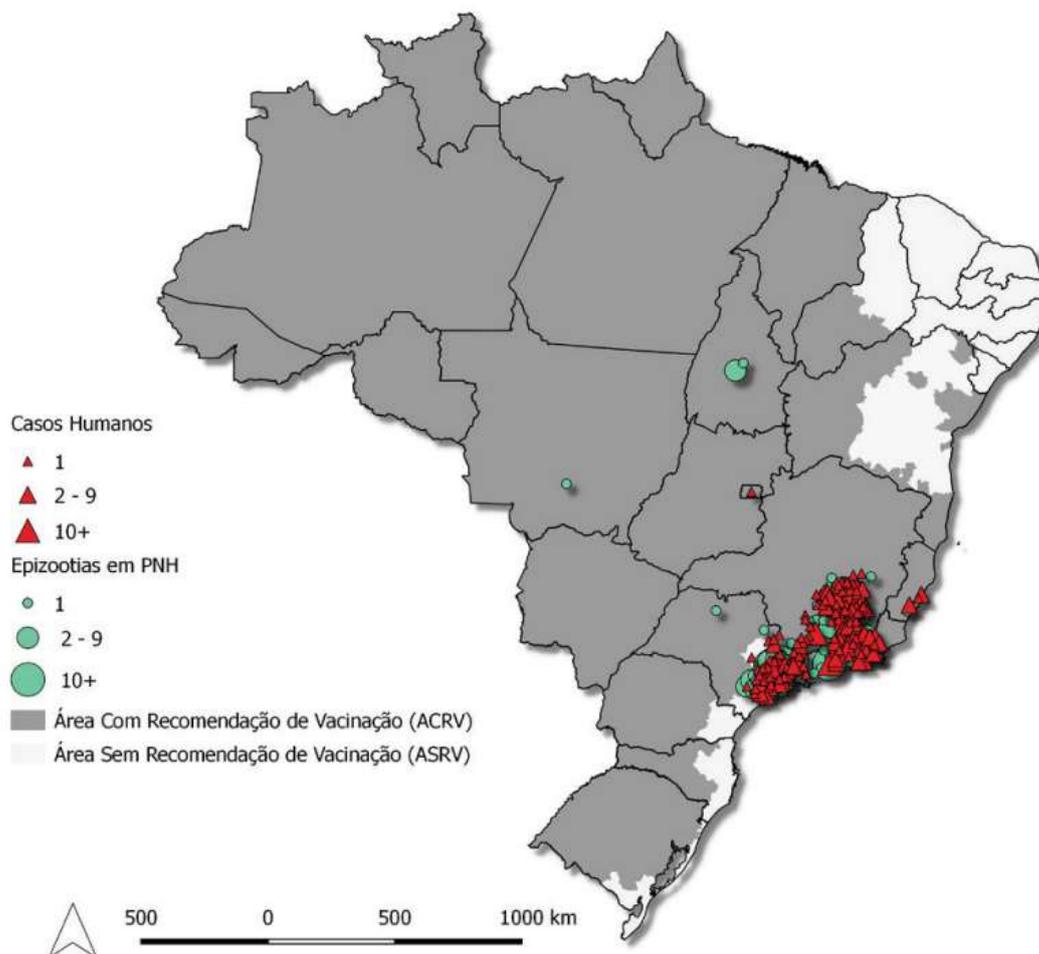


Figura 2 - Distribuição espacial dos casos de FA durante o período de 2001-2019. O mapa mostra a correlação entre casos humanos confirmados de FA e os biomas (A), e epizootias na região sudeste (B) durante a epidemia de 2016-2019.⁵

Na figura 3 o mapa refere-se às epizootias e casos humanos de FA especificamente do período de julho de 2017 a junho de 2018, objeto deste estudo – e o que observamos é uma concentração ainda mais importante no espaço geográfico que se refere ao triângulo formado pelas três maiores

metrópoles do país – São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte. A observação da figura 4 revela os dados de série histórica dos últimos 40 anos da incidência de FA no Brasil, e destaca a gravidade da recente epidemia em função do número de infectados e da alta letalidade – em média 39,7%, mas chegando a 78% em 2016-2017.



Fonte: CGDT/DEVIT/SVS/MS. Os pontos no mapa estão plotados no centroide do município e não georreferenciados no local de ocorrência do evento.

Figura 3 – Distribuição dos casos humanos e das epizootias confirmados para FA, por município do local provável de infecção – monitoramento de julho/2017 a junho/2018, Brasil⁸

Em dezembro de 2017 foi identificado caso de FA em São Paulo e realizado o primeiro TH no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (USP).⁹ No período de junho de 2017 a julho de 2018 foram confirmados em todo o Brasil 1376 casos, com 483 óbitos.⁸ Em Minas Gerais no período de 2016-2017 os

Entretanto, no período 2017-2018 os casos se concentraram na região metropolitana de Belo Horizonte e Zona da Mata – foram 531 casos confirmados, com 178 óbitos neste período – conforme observamos na tabela 1.¹⁰ Deste modo em 2018 vários casos de FA grave com IHA foram admitidos em hospitais especializados na região metropolitana de Belo Horizonte e Juiz de Fora em Minas Gerais, e a discussão sobre o manejo clínico e indicação de TH foi posta em nosso meio.

1.4 – Aspectos clínicos e laboratoriais da febre amarela

A doença clínica varia desde uma síndrome inespecífica até uma febre hemorrágica fatal. Após a picada pelo mosquito infectado, o período de incubação médio varia de três a seis dias, podendo chegar a 10-15 dias.⁶ Estima-se que metade dos pacientes infectados permaneça assintomática.⁶

A FA é tipicamente descrita como uma doença bifásica (figura 6). A primeira fase é chamada de “fase virêmica” – o surgimento dos sintomas é tipicamente abrupto, com febre, calafrios, astenia, cefaléia, dorsalgia, mialgia generalizada, náuseas e tontura. Ao exame físico o paciente está febril e aparenta estar agudamente enfermo, com congestão da face e conjuntivas, além de apresentar bradicardia relativa relacionada à intensidade da febre (*signal de Faget*). A viremia apresenta títulos elevados e, nesta fase, o paciente pode ser fonte de infecção para mosquitos. A temperatura média na febre é de 39° C.¹¹

Os exames laboratoriais revelam leucopenia (1500-2500 leucócitos) e neutropenia relativa. Entre 48-72 horas após o início dos sintomas e antes do surgimento da icterícia há início da elevação das aminotransferases.¹¹ Esta fase que persiste por dois a quatro dias nos os casos leves e moderados, e que correspondem a cerca de 20-30% dos pacientes infectados⁶ pode ser seguido de um “período de remissão”, com o desaparecimento da febre e dos sintomas durante cerca de 24 horas. Durante o período de remissão, a ativação da resposta imune celular e humoral resulta no clareamento viral.¹¹

A segunda fase, chamada “fase toxêmica”, acomete 15-25% das pessoas infectadas, e caracteriza-se pelo recrudescimento de febre alta associada a

vômitos, dor epigástrica, icterícia, disfunção renal e diátese hemorrágica.⁶ Há elevação dos níveis de aminotransferases e de bilirrubina direta, tornando mais

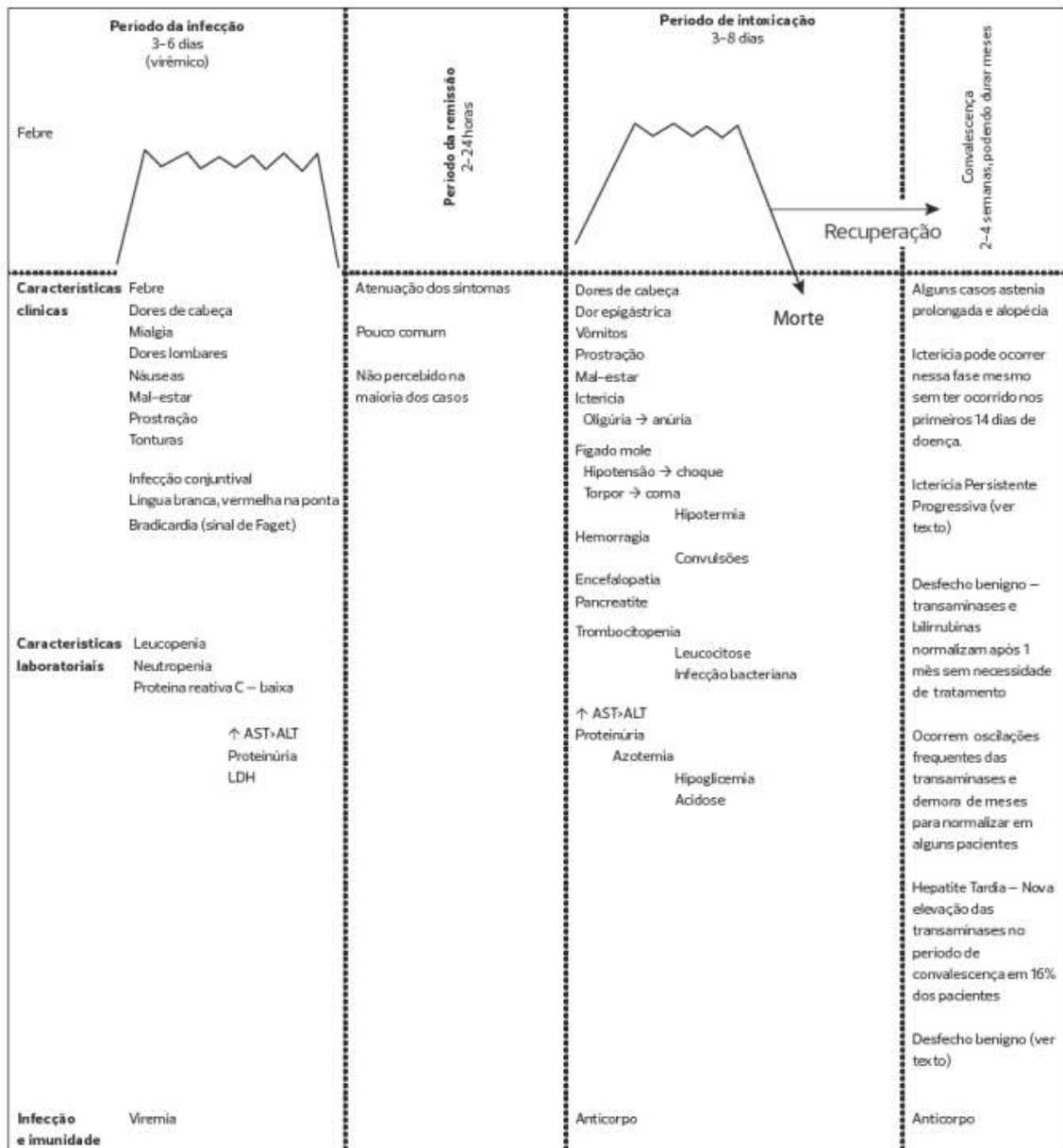


Figura 6 – Estágios da infecção pelo vírus da febre amarela, com descrição das principais características clínicas e laboratoriais da doença¹¹

evidente a icterícia. Caracteristicamente as concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) são maiores que as de alanina aminotransferase (ALT), presumivelmente em razão da lesão direta causada pelo vírus aos músculos esquelético e miocárdico.¹¹ Manifestações hemorrágicas incluem petéquias, equimoses, epistaxe e sangramento nos sítios de punção. Em vários casos há

sangramento importante, com hematêmese borrácea, melena e metrorragia. As alterações laboratoriais incluem trombocitopenia, prolongamento do tempo de protrombina e coagulação, redução de fibrinogênio e dos fatores II, V, VII, VIII, IX e X e presença de produtos de fibrinólise. Estas anormalidades sugerem uma desordem hemorrágica multifatorial causada pela redução da síntese de fatores de coagulação e por coagulopatia de consumo. Disfunção plaquetária foi demonstrada em modelo primata. A lesão miocárdica manifesta-se por anormalidades do segmento ST e da onda T ao eletrocardiograma e ocasionalmente por cardiomegalia aguda. Cerca de 20-50% dos pacientes com doença hepato-renal vão a óbito entre sete a dez dias do início dos sintomas. Os eventos que precedem o óbito incluem hipotensão (com dificuldade progressiva de resposta a fluidos e vasopressores), delírium hiperativo, estupor, coma, respiração de Cheyne-Stokes, acidose metabólica, hipercalemia, hipoglicemia e hipotermia.¹¹ As características clínicas e laboratoriais da FA estão descritas na figura 6.

1.5 – Insuficiência hepática aguda

A IHA é uma doença grave e de ocorrência rara.¹ Caracteriza-se por rápida deterioração da função hepática resultando em alteração do estado mental e coagulopatia em indivíduos sem doença hepática pré-existente. Estima-se que nos Estados Unidos da América ocorram cerca de 2000 casos por ano. Uma estimativa recente no Reino Unido identificou 1-8 casos por milhão de habitantes por ano. Não há estatísticas quanto a incidência no Brasil. Trata-se de uma condição que frequentemente acomete pessoas jovens resultando em alta morbidade e mortalidade. A maioria das séries sugere sobrevida inferior a 15% sem transplante. Atualmente a sobrevida em um ano dos pacientes submetidos a transplante de fígado é superior a 65%. Em função de sua raridade, há grande dificuldade em se estudar a IHA em profundidade e poucos ensaios terapêuticos controlados têm sido realizados.¹²

A elevação aguda de aminotransferases de cerca de duas a três vezes o valor de referência (marcador de dano hepático), associada à alteração da coagulação (Relação Normalizada Internacional – RNI – maior que 1,5) e/ou à elevação de bilirrubinas sem alteração do *status* mental denomina-se *lesão hepática aguda*.

O curso clínico da IHA inicia-se com a lesão hepática aguda grave evoluindo com alteração neurológica. Portanto, o desenvolvimento de encefalopatia é o *marcador* para o diagnóstico de IHA, pois denota que os mecanismos fisiopatológicos estão em curso, com implicação prognóstica.^{12; 13}

As diversas etiologias da IHA incluem as hepatites causadas pelos vírus hepatotrópicos A, B, D e E; os vírus de febres hemorrágicas; a hepatite autoimune, o linfoma, a disfunção pós-choque, a doença veno-oclusiva, a doença hepática induzida por drogas, metástases hepáticas, doença de Wilson, dentre outras.¹³

A insuficiência hepática de etiologia viral tem curso habitualmente hiperagudo, sendo as hepatites A e E arquétipos desta descrição. Os vírus causadores de febre hemorrágica são endêmicos, causam epidemias em zonas tropicais e ocasionam doença sistêmica podendo resultar em IHA, como os vírus da dengue, FA, Chikungunya, ebola, entre outros, e, nesses casos, há alta mortalidade.¹³

1.6 – Transplante hepático (TH)

O transplante hepático (TH) foi o avanço mais significativo no tratamento da IHA em 40 anos e revolucionou a sobrevida. A sobrevida em um ano após TH de emergência é discretamente inferior à dos transplantes de rotina, mas estabelece-se em impressionantes 80% em centros europeus e norte-americanos. A seleção para TH depende não apenas de uma predição acurada da sobrevida sem transplante, mas requer também avaliação do potencial de sobrevida pós-transplante, e ainda se o paciente já estaria doente demais para ser transplantado.

O reconhecimento precoce de pacientes que não sobreviverão apenas com suporte clínico é de grande importância prática. A progressão para falência de múltiplos órgãos ocorre às vezes de forma muito veloz e a identificação o quanto antes de quais são os candidatos a TH pode salvar vidas. Esta avaliação de prognóstico deve ocorrer tanto no centro transplantador como no local da apresentação inicial, e as decisões relacionadas à transferência e TH devem ser tomadas o mais rapidamente possível.

Em todo o mundo, diferentes sistemas de avaliação prognóstica para selecionar candidatos para o transplante estão em uso. São utilizados fatores associados a mau prognóstico derivados de análises com coortes históricas de pacientes conduzidos sem transplante. Apesar de haver detalhes diferentes, há várias características comuns. A presença de EH é o indicador chave, levando em conta posteriormente a idade do paciente e a gravidade da lesão hepática avaliada através da magnitude da icterícia e da coagulopatia. Em geral, a queda das aminotransferases, aumento de bilirrubina e RNI e redução do tamanho do fígado são sinais de mau prognóstico e devem indicar a transferência do paciente para um centro transplantador.

Apesar do uso clínico de rotina e do aparente sucesso, os dados publicados a respeito da performance dos critérios atuais de seleção de pacientes para TH são escassos, e não há um sistema adotado de forma universal. Os dois sistemas mais comumente utilizados na Europa são o do King's College e os critérios de Clichy-Villejuif (tabela 2), sendo que a performance dos critérios de King's college é mais estudada por metanálises, que confirmam sua especificidade clinicamente aceitável, mas sensibilidade limitada.^{12; 14} A utilização dos critérios de Clichy-Villejuif envolve a dosagem do fator V, o que é um limitador em diversos centros no mundo, especialmente no Brasil.

1.7 – Avaliação da coagulação na IHA e manejo transfusional no TH

A presença do RNI alargado associado ou não a encefalopatia hepática define as síndromes de IHA e lesão hepática aguda, respectivamente, quadros potencialmente dramáticos. Entretanto, o RNI alargado não se correlaciona com o risco de complicações hemorrágicas, embora seja um marcador de mau prognóstico em muitos índices preditivos. Em contraste, a trombocitopenia está associada a complicações hemorrágicas assim como a desfecho ruim (óbito ou transplante de fígado).¹⁵

Os dados disponíveis sugerem que há um estado de hemostasia reequilibrada em pacientes com IHA devido a deficiências concomitantes de fatores pró-

coagulantes e anticoagulantes derivados do fígado, bem como aumento de proteínas pró-coagulantes derivadas do endotélio, fator de von Willebrand e fator VIII da coagulação. Recentemente foi proposto que a hipercoagulabilidade local na micro vasculatura hepática resultante de um excesso do fator de von Willebrand e de deficiência de protease reguladora ADAMTS13 potencializam a lesão primária hepática na IHA.¹⁵ Sugere-se que a hipofibrinogenemia, consequência de diminuição da síntese hepática, também pode contribuir para distúrbios da hemostasia em pacientes com IHA¹⁵.

Apesar das abundantes evidências de hemostasia anormal, pacientes com IHA raramente sangram. Quando ocorre sangramento, o sítio mais frequentemente acometido é o trato gastrointestinal superior e caracteriza-se por ser leve, necessitando de transfusão de hemácias em apenas 15% dos casos¹⁶. Entretanto na FA as manifestações hemorrágicas são frequentes e incluem petéquias, equimoses, epistaxe e exsudação de sangue das gengivas e nos locais de punção. Em muitos casos há sangramento grave, hematêmese, melena ou metrorragia. As anormalidades laboratoriais incluem trombocitopenia, tempos prolongados de coagulação e protrombina, fibrinogênio e fatores II, V, VII, VIII, IX e X reduzidos e presença de produtos de divisão de fibrina¹¹. Essas anormalidades sugerem um distúrbio hemorrágico multifatorial causado pela síntese reduzida de fatores de coagulação e coagulopatia de consumo¹⁷.

Diante da incapacidade dos testes tradicionais avaliarem a coagulação nestas situações, desde os anos 80 têm sido usados testes baseados em tromboelastografia para o manejo clínico dos pacientes candidatos a transplante¹⁶. Há dois dispositivos comercialmente disponíveis, ambos baseados na invenção original de Hartert em 1948, o TEG (Haemonetics Corporation, Braintree, MA) e o ROTEM (Werfen Co., Barcelona Espanha). Tromboelastografia (TEG) e tromboelastometria (ROTEM) medem as propriedades viscoelásticas de um coágulo em desenvolvimento em uma amostra de sangue total, sob condições de baixo cisalhamento. Eles fornecem em tempo real informações sobre a qualidade do coágulo e a cinética de sua formação¹⁶. Vários trabalhos demonstraram uma redução no uso de hemoderivados no TH com o uso do ROTEM, mas a evolução da cirurgia tem feito com que cada vez menos transfusão seja necessária e há trabalhos

recentes sugerindo que o seu uso não faça diferença nos resultados. De todo modo, situações específicas em que sangramentos maiores ocorram podem se beneficiar especificamente do uso do método¹⁶.

1.8 – Plasmaférese na IHA

O racional do uso da plasmaferese na IHA é por sua capacidade de remover toxinas ligadas à albumina, bem como toxinas não ligadas, incluindo aminoácidos aromáticos, amônia, endotoxina, indóis, mercaptanos, fenóis e outros fatores chamados *padrões moleculares associados a danos* (DAMPs) responsáveis pela falência de órgãos, encefalopatia hepática e diminuição vascular sistêmica e da resistência de fluxo sanguíneo cerebral.¹⁸

Estudos indicam que a remoção de mediadores inflamatórios parece desempenhar um papel no tratamento da IHA e estes são removidos por algumas técnicas de aférese. Assim, vários estudos revelam melhora do fluxo sanguíneo cerebral, pressão arterial média, pressão de perfusão cerebral, taxa metabólica cerebral, aumento do fluxo sanguíneo hepático e melhorias em outros parâmetros laboratoriais, como atividade da colinesterase ou capacidade de eliminação de galactose através desta medida.¹⁹

A plasmaférese tem sido usada como terapia adjuvante ou autônoma para recuperação da IHA ou reduzir a necessidade de TH. Um ensaio controlado randomizado com 183 pacientes demonstrou maior sobrevida livre de transplante até a alta hospitalar – 59% no grupo plasmaferese de alto volume associado ao tratamento padrão versus 48% no grupo que recebeu apenas tratamento padrão ($p < 0,001$), quando três procedimentos com intervalo de 24 horas foram adicionados a terapia médica padrão em pacientes aguardando o TH²⁰. No entanto, a plasmaferese de alto volume antes do TH não melhorou a sobrevida global comparada à dos que receberam apenas terapia médica padrão. Outro ensaio controlado randomizado mostrou redução nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e DAMPs e melhora da síndrome de resposta inflamatória sistêmica com a plasmaferese convencional comparada ao tratamento médico padrão²¹ com melhora da microcirculação tecidual e a hemodinâmica sistêmica em pacientes com IHA, eliminando o lactato arterial.

Nesse estudo, a plasmaférese convencional também associou-se à maior sobrevida livre de transplante em 21 dias (75% vs. 45%; $p = 0,04$).²¹

A Associação Americana para as Aféreses (ASFA) publica periodicamente protocolo para indicações de aféreses terapêuticas. Na sua última publicação, em 2023, classificou a plasmaférese terapêutica convencional na IHA como categoria III – onde o papel ideal da plasmaferese ainda não está estabelecido e a decisão de realizá-la deve ser individualizado – e grau de recomendação 2B – fraca recomendação com qualidade de evidência moderada. Porém, quando realizada troca plasmática de grande volume, a categoria de evidência sobe para I – plasmaferese aceita como terapia de primeira linha – com grau de recomendação 1A – forte recomendação e alta qualidade de evidência¹⁹. Importante frisar que o procedimento de plasmaférese de grande volume é realizado por equipamentos específicos, como o sistema de filtros PrismaFlex® da Gambro®, não disponível no Brasil. Entretanto, pode-se realizar a plasmaférese convencional com troca de grande volume e reposição com plasma fresco congelado somente ou associado a albumina 4%.

1.9 – Terapias antivirais na febre amarela

Várias terapias experimentais antivirais contra a FA estão sendo pesquisadas há mais de uma década, tomando como base a estrutura do flavivírus e possíveis alvos terapêuticos desta família, contra os quais já foram obtidas moléculas com eficácia comprovada.²²

Em pesquisa publicada em 2012, os autores demonstraram que a ivermectina é uma molécula capaz de atuar como inibidora da helicase da proteína NS3 da membrana do vírus da FA, apresentando, portanto, importante atividade antiviral *in vitro*²³. Não existem estudos clínicos a respeito e as doses utilizadas *in vitro* seriam proporcionalmente muito elevadas. Entretanto, considerando o amplo uso com segurança desta molécula nos países tropicais para tratar parasitoses, seria importante comprovar o seu valor no tratamento da FA.²³

Outra molécula investigada é a do composto sofosbuvir, que se liga a aminoácidos residuais da polimerase RNA (NS5), inibindo a replicação viral do

flavivírus.²⁴ Desta maneira o sofosbuvir mostrou-se útil para o tratamento do vírus da hepatite C, sendo aprovado para este fim pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2013. Trata-se de molécula segura e utilizada com grande experiência mundial para esta indicação. Posteriormente ensaios mostraram sua ação *in vitro* e em modelos animais contra outros flavivírus, como os vírus da Zika e da dengue, além do próprio vírus da febre FA²⁵. Vários estudos confirmaram esta ação em células hepáticas humanas *in vitro*²⁵, e em modelos *in vivo* de ratos e camundongos^{24; 25}.

Diante da gravidade da evolução dos pacientes com FA e da ausência de tratamento específico estabelecido, passou-se a cogitar o uso compassivo destas moléculas ao longo da epidemia. Protocolos de pesquisa foram estabelecidos²⁶ mas os resultados destas pesquisas clínicas ainda não foram publicados até o momento.

1.10 – O primeiro Transplante Hepático (TH) em São Paulo

Em dezembro de 2017 foi identificado caso de FA em São Paulo e realizado o primeiro TH no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-USP). Uma mulher jovem de 27 anos sem doenças prévias apresentou quadro de hepatite grave com fator V de 18%, rebaixamento do nível de consciência associado a crises convulsivas e injúria renal aguda, preenchendo os critérios de Clichy-Villejuif tendo sido transplantada no 10º dia de sintomas. A paciente recebeu alta hospitalar no 41º dia pós-operatório com bom funcionamento do enxerto e apenas algum grau de seqüela neurológica, sendo descrita boa evolução oito meses pós procedimento.⁹

O sucesso inicial deste caso foi incentivo para que o debate sobre a realização de TH ocorresse nos demais centros transplantadores da região sudeste do Brasil que passaram a receber pacientes com quadros semelhantes nos meses seguintes.

2- OBJETIVOS

2.1 – Objetivo primário

Descrever uma série de casos de pacientes com FA confirmada admitidos no ano de 2018 no Hospital Felício Rocho, um hospital terciário de referência em hepatologia e transplante no estado de Minas Gerais, Brasil.

2.2 – Objetivos secundários

Descrever os aspectos evolutivos clínicos e laboratoriais e aspectos da histopatologia do fígado – microscopia óptica, eletrônica e imuno-histoquímica – de pacientes que evoluíram com IHA e, entre esses, de quatro pacientes submetidos a transplante hepático.

3- PACIENTES E MÉTODOS

3.1 – Revisão de prontuário e coleta de dados

Para este estudo foram revisados os prontuários de pacientes com diagnóstico confirmado de FA admitidos no Hospital Felício Rocho entre 20 de janeiro de 2018 e 20 de fevereiro de 2018.

Foram coletados os seguintes dados clínicos: sexo, data de nascimento, idade, local de provável exposição, intervalo entre exposição e aparecimento de sintomas, intervalo entre icterícia e EH, comorbidades, sintomas, exame neurológico evolutivo, data de intubação orotraqueal (IOT), intervalo IOT e óbito, uso de aminas, infecções, óbito, data do TH. Foram ainda coletados os seguintes dados laboratoriais de forma evolutiva: hemograma, creatinina, transaminases oxalacética e pirúvica, gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina, bilirrubinas, RNI, fator V, lactato, amilase, culturas.

3.2 – Normatização de critérios brasileiros para o TH na febre amarela

O Sistema Nacional de Transplantes (SNT) do Brasil teve o seu arcabouço legal criado pelo decreto 2268 de 1997 e desde então a evolução científica vem modificando as indicações para transplante de fígado, motivando atualizações que ocorreram através de portarias ministeriais. A Portaria 2600 de 21 de outubro de 2009 descreve o regulamento técnico do SNT e as indicações para transplante de fígado aprovadas no Brasil²⁹. O ressarcimento pelo Sistema Único de Saúde (SUS) dos custos ligados aos transplantes ocorre apenas nas indicações definidas nestas portarias.

No artigo 78 §1º item IV desta mesma portaria, a hepatite fulminante é descrita como uma das indicações de transplante de fígado previstas, e a definição dos critérios de urgência estão colocados no artigo 90, que menciona especificamente os critérios de King's College e de Clichy-Villejuif.²⁹

Deste modo, para obedecer à legislação brasileira, os casos de FA foram inicialmente avaliados, inscritos e transplantados seguindo estes critérios tradicionais. Entretanto, o aprendizado sobre quais seriam os parâmetros adequados para se indicar o transplante na FA ocorreu a partir da experiência

das equipes e de seminários interinstitucionais realizados após os primeiros casos. A clara incapacidade destes critérios em predizer os desfechos em tempo hábil para a realização do transplante levou à criação de um critério modificado, que passou a ser utilizado durante a epidemia.

Este critério, chamado de “Clichy modificado” é mostrado na tabela 3. Ele recebeu o aval do Sistema Nacional de Transplantes para sua utilização ainda durante a epidemia, mas apenas em 11 de julho de 2018 foi publicada a portaria 2117 que oficializou esta estratégia de abordagem da IHA na FA no Brasil e estabeleceu o adequado financiamento no âmbito do SUS para estes casos.³⁰

Tabela 3 – Critérios modificados para transplante hepático na FA segundo Portaria 2117 (11/07/2018) do Ministério da Saúde do Brasil³⁰

Art. 3º Estão aptos a serem inscritos em lista de espera por transplante de fígado por IHHFA os pacientes que, concomitantemente:

I - estejam criticamente enfermos, com confirmação ou forte suspeita clínica e epidemiológica de infecção pelo vírus da Febre Amarela;

II - se enquadrem no “Critério de Clichy modificado”; e

III - apresentem as seguintes alterações laboratoriais: a) alanina-amino-transferase (ALT/TGP) ou aspartato-amino-transferase (AST/TGO) maior do que 3.000 U/L; e b) creatinina maior do que 2.0 mg/dL.

Parágrafo único. O “Critério de Clichy modificado” é definido como:

I - a presença de fator da coagulação V menor que 50% (cinquenta por cento) para qualquer idade; e

II - encefalopatia (critérios de West Haven) de qualquer grau.

Art. 4º É vedado o transplante na presença de qualquer das seguintes contraindicações:

I – pancreatite necro-hemorrágica;

II - choque refratário ao uso de drogas vasoativas em altas doses

III - hemorragia digestiva maciça; ou

IV - hemorragia no sistema nervoso central.

Parágrafo único. A aferição das condições clínicas que apoiarão a decisão sobre a contraindicação de que trata o caput, deve observar, para fins de inscrição e de auditoria a qualquer tempo, os seguintes critérios:

I - para os pacientes com lipase acima de 3.000U/L, proceder à tomografia computadorizada de abdome; e

II - para os pacientes com convulsão ou encefalopatia III e IV (critérios de West Haven), proceder à tomografia computadorizada ou ressonância magnética de cérebro.

ALT: alanina aminotransferase ou TGP: transaminase glutâmica pirúvica; AST: aspartato aminotransferase ou TGO: transaminase glutâmica oxalacética; U/L: unidade por litro; mg/dL: miligrama por decilitro

O Ministério da Saúde nomeou o Grupo Técnico de Febre Amarela (GT FA) que seria responsável por analisar os casos a serem inscritos na fila. Foi estabelecido fluxo para esta avaliação, descrito na portaria e mostrado na tabela 4.³⁰ Por fim,

foram habilitados 9 hospitais de referência para a realização do TH na IHA na FA nas regiões afetadas, sendo o Hospital Felício Rocho um deles no estado de Minas Gerais.³⁰

3.3 – Organização estadual em Minas Gerais e fluxograma de encaminhamento
Segundo o IBGE, Minas Gerais tem uma população estimada de 21.411.923 habitantes em 2021, com uma extensão de 586.513,983km². Trata-se, portanto, de um território de grande extensão, maior, por exemplo, do que a França.

Estas características impactaram na organização do enfrentamento à FA, sendo necessária a definição de hospitais regionais para atendimento dos casos suspeitos e de centros de referência para os casos mais graves.

Foi publicado o Fluxograma de Atendimento da Febre Amarela pela Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (SES-MG) em 30 de janeiro de 2018, que definiu os casos suspeitos³¹. Estes casos deveriam ser comunicados aos CIEVS – Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde, unidades que compõem a Rede Nacional de Alerta e Resposta às Emergências em Saúde Pública, que conta com 54 centros ativos em todo o território brasileiro. Este fluxograma está mostrado na figura 7.

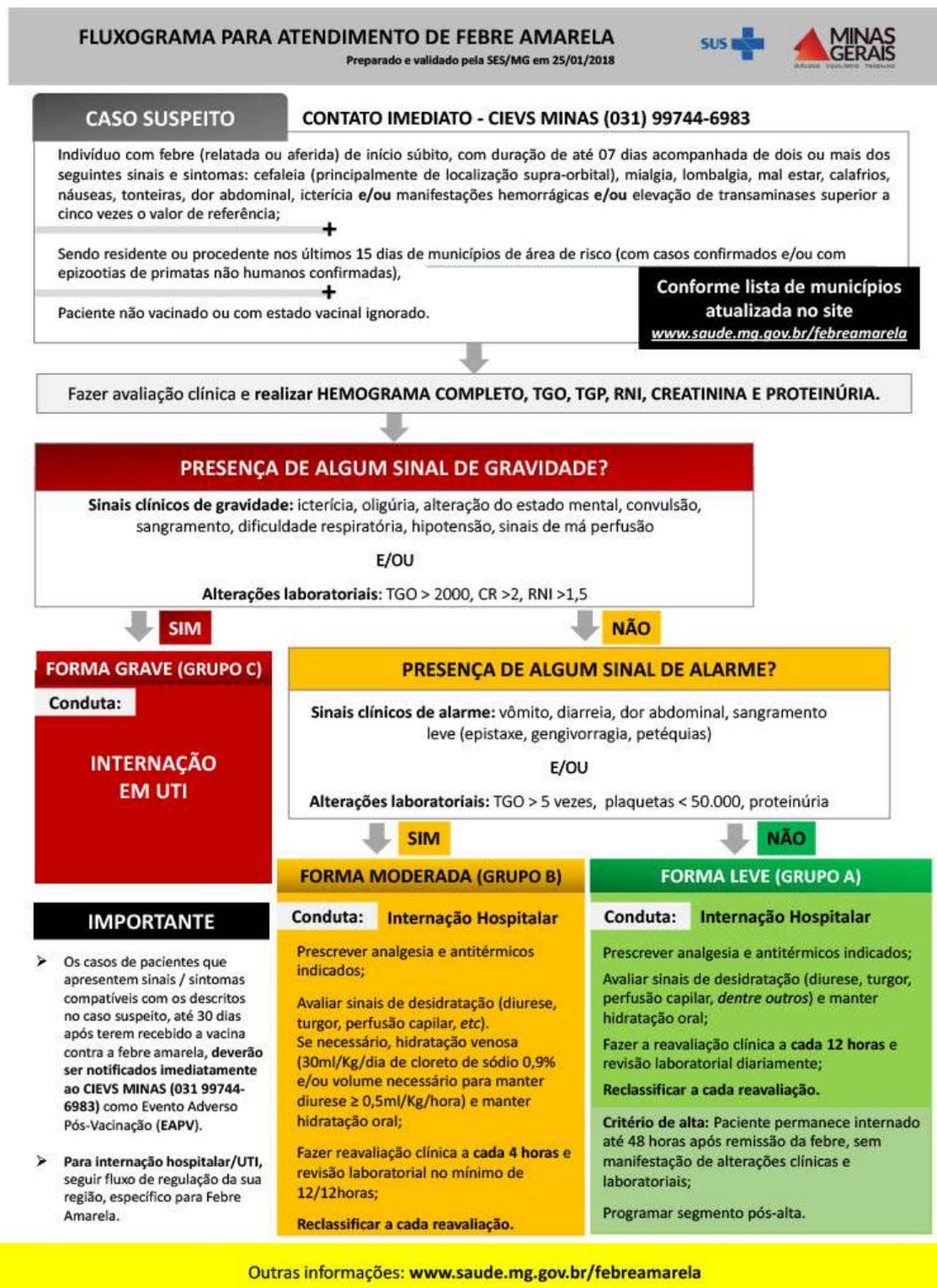


Figura 7 – Fluxograma para atendimento de febre amarela da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (25/01/2018)³¹

A forma leve (GRUPO A) deveria ser internada em hospital local, recebendo alta após 48 horas sem febre e com normalização das alterações clínicas e laboratoriais; as formas moderada (GRUPO B) e grave (GRUPO C) deveriam ser internadas em hospitais de referência, cuja lista foi publicada em 22 de fevereiro de 2018 pela SES-MG, mostrada na figura 8³¹. No GRUPO C a internação deveria ocorrer em centro de terapia intensiva e o caso deveria ser discutido com um dos centros transplantadores credenciados pelo Ministério da Saúde – em Minas Gerais estes centros eram o Hospital Felício Rocho e a Santa Casa de Belo Horizonte.

O Hospital Eduardo de Menezes (HEM) foi o principal centro de referência da região metropolitana de Belo Horizonte e também recebeu boa parte dos pacientes procedentes de outras regiões do estado de MG.

3.3 – Protocolo de abordagem clínica do portador de FA no Hospital Felício Rocho

O Hospital Felício Rocho (HFR) é um hospital terciário localizado em Belo Horizonte – MG. É mantido pela Fundação Felice Rosso e atende a pacientes da saúde suplementar e particulares, além de realizar transplantes pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Durante a epidemia, o HFR recebeu pacientes com FA grave transferidos de outros centros para avaliação de TH seguindo o fluxograma da SES/MG descrito (figura 7). Recebeu também pacientes com suspeita da doença que não seguiram este fluxo, seja através de transferência inter-hospitalar, seja procura direta ao seu pronto-atendimento.

O protocolo hospitalar de abordagem da FA no HFR seguiu a definição da SES-MG para caso suspeito (figura 7). Todos os pacientes com suspeita de FA foram internados e submetidos a exame de imagem (ultrassom de abdome) e exames laboratoriais que incluíram hemograma, RNI, provas de função hepática, dosagem de fator V, provas de função renal, amilase, lipase, glicemia, testes sorológicos para hepatite B (HbsAg, anti-HBs, anti-HBc IgG e IgM), hepatite C

(anti-HCV), hepatite A (anti-HAV IgG e IgM), sorologia para FA e dengue, pesquisa do RNA do vírus da FA no soro por técnica de PCR.

A dosagem de Fator V inicialmente indisponível no HFR, tornou-se disponível a partir do caso 4 e sua realização passou a ser protocolar.

A definição de caso/diagnóstico para inclusão neste estudo foi o teste sorológico positivo para FA com confirmação diagnóstica da infecção através da técnica de PCR.

Seguindo a Nota Técnica SVR Nº 001/2017 e atualizações, os exames para diagnóstico de FA foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, Instituto Octávio Magalhães/Fundação Ezequiel Dias (IOM/FUNED) através de sorologia pelo método de Mac Elisa e o isolamento viral. As amostras para RT-PCR (real time PCR) e a análise histopatológica/imunohistoquímica foram encaminhadas pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) ao Instituto Evandro Chagas (IEC), laboratório de referência nacional para FA, localizado no município de Ananindeua, região metropolitana de Belém/PA.²⁸

Para o diagnóstico laboratorial de FA, foram seguidas as orientações quanto à coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas de acordo com a tabela 5. De acordo com o protocolo, o material para sorologia foi colhido em tubo estéril à vácuo sem anticoagulante. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado (1.500 rpm por 10 minutos), o soro aspirado e transferido para outro tubo estéril.²⁸

Para a realização do exame de biologia molecular RT-PCR, o material coletado foi coletado em tubo estéril a vácuo sem anticoagulante, centrifugado a 1.500 rpm por 10 minutos, o soro aspirado e transferido para um criotubo resistente a baixas temperaturas, estéril e com tampa de rosca. A amostra refrigerada era transferida para a FUNED no período máximo de duas horas após a coleta para armazenamento a - 80°C até o seu processamento.²⁸

No HFR os pacientes classificados como GRUPO C seguiram o fluxograma da SES-MG (figura 7) e foram internados no centro de terapia intensiva (CTI) para monitorização contínua. Os critérios para alta do CTI e alta hospitalar seguiram o mesmo fluxograma. Todos os casos foram notificados ao Ministério da Saúde.

3.4 - Protocolo de preparação pré-operatória, técnica cirúrgica, imunossupressão

Todos os pacientes com indicação de TH apresentavam FA grave (GRUPO C) e estavam, portanto, internados em CTI. Eles foram submetidos a avaliação neurológica e tomografia de crânio para diagnóstico quando apresentaram alteração do status mental.

À admissão no CTI eram colhidas hemoculturas e culturas de swab nasal, perianal e axilar. O esquema antibiótico padrão utilizado na profilaxia do TH foi a associação de ampicilina e cefotaxima, sendo modificado de acordo com o resultado das culturas de admissão ou com germes identificados em infecções prévias. A profilaxia era introduzida logo antes da incisão e mantida por sete dias.

Quando ocorria a doação de órgãos era realizada a tromboelastografia (ROTEM, Werfen Co., Barcelona, Espanha) para avaliação da coagulopatia, com correções orientadas pelo resultado (transfusão de hemoderivados, complexo protrombínico e/ou fibrinogênio sintético), sendo realizado novo exame ao final da transfusão. A cirurgia era iniciada após tromboelastografia revelando coagulação adequadamente corrigida.

A técnica cirúrgica utilizada nos TH's foi a de piggy-back, com anastomose biliar colédoco-coledociana. Os pacientes foram monitorizados no período per- e pós-operatório com cateter de Swan-Ganz. A imunossupressão realizada foi indução com metilprednisolona 125 mg na fase anepática, seguida de nova dose de 125 mg ao término da cirurgia, repetidas após 24h e 48h; no 3º dia pós-operatório (DPO) era introduzida prednisona 20 mg ao dia por via enteral, enquanto o tacrolimo na dose de 0,1 mg/kg em duas tomadas (12/12 horas) era introduzido no 2º DPO.

3.5 – Protocolo de plasmaférese

A plasmaferese é um recurso indisponível em situações de urgência no HFR. Isto inviabiliza o seu uso rotineiro na IHA. Não há cobertura prevista pelo SUS nesta situação clínica, o que traz dificuldades por tratar-se de procedimento de custo elevado e que envolve o uso de grande quantidade de hemocomponentes.

Deste modo, este recurso só passou a estar disponível a partir do caso 13, após organização do serviço para sua realização. Para seu uso foi realizado o protocolo descrito na tabela 6.

Quando ocorria a internação de paciente com IHA o médico assistente entrava em contato com o hemoterapeuta responsável pela plasmaferese. Para cada procedimento era preenchida uma requisição de transfusão. Os pacientes deveriam ter acesso venoso por cateter de duplo lúmen não colabante, de preferência Shilley, já implantado quando da solicitação dos procedimentos.

3.6 – Uso compassivo de terapias antivirais contra a febre amarela

Considerando os efeitos da ivermectina in vitro descritos na inibição do vírus da FA, a gravidade destes pacientes que evoluíam com alta mortalidade em curto espaço de tempo e a sua segurança bastante conhecida pelo amplo uso no tratamento de diversas parasitoses, optou-se por oferecê-la de modo compassivo aos pacientes com FA.

De forma protocolar, todos os pacientes com diagnóstico confirmado de FA foram informados sobre a ausência de ensaios clínicos desta molécula na sua condição assim como sobre a ausência de informações quanto a efetividade da droga e o desconhecimento de potenciais riscos envolvidos. O paciente era convidado a assinar termo de consentimento após este esclarecimento. A dose de ivermectina administrada era de 200 mcg/kg por via enteral durante 05 dias a partir da admissão do paciente, não importando o seu tempo de evolução.

O sofosbuvir é um medicamento de alto custo e pouco disponível. Por esta razão poucos pacientes tiveram acesso a ele, apenas através de doações e, nesta condição, o tratamento foi realizado após esclarecimento prévio quanto à ausência ensaios clínicos e, portanto, a falta de informações concretas quanto a potenciais benefícios e riscos de seu uso e com a assinatura de termo de consentimento para uso compassivo da medicação. A dose administrada foi 400 mg ao dia por via enteral a partir da admissão, sendo mantida por até sete dias após o transplante.

3.8 – Aspectos éticos

Os pacientes ou seus familiares responsáveis assinaram termo de consentimento concordando com a participação neste estudo.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-HFR) do Hospital Felício Rocho (CAAE número 2.851.504 – ANEXO C).

4 - RESULTADOS

4.1 – Características dos pacientes

No período entre 20 de janeiro de 2018 a 20 de fevereiro de 2018 foram admitidos 14 pacientes no HFR com FA confirmada por sorologia e PCR. As características clínicas, demográficas e laboratoriais dos pacientes estão descritas na tabela 7.

Tabela 7 – Características clínicas, demográficas e laboratoriais à admissão no Hospital Felício Rocho de pacientes com quadro confirmado de febre amarela entre 20/01/2018 e 20/02/2018

Características clínicas		Exames laboratoriais	
Idade (anos); mediana (min-Max)	53 (23-69)	Hemoglobina (g/dl); mediana (min-max)	13,9 (9,1-18,0)
sexo masculino, n (%)	13 (92,8)	global de leucócitos (cel/mm ³), mediana (min-max)	3100 (900-6900)
Vacinação há mais de 10 dias para FA, n (%)	3 (21,4)	leucopenia n (%)	9 (64,3)
Sinais e sintomas, n (%)		contagem de plaquetas (cel/mm ³), mediana (min-max)	58000 (18000- 114000)
Mialgia	12 (85,7)	RNI, mediana (min-max)	2,0 (1,1- >9,0)
Febre	11 (78,6)	AST (U/L), mediana (min/max)	7900 (157-27392)
Icterícia	11 (78,6)	ALT (U/L), mediana (min/max)	3854 (288-9680)
Vômitos	7 (50)	Bilirrubina total (Mg/dl), mediana (min/max)	4,69 (0,51-12,50)
Cefaleia	6 (42,9)		
Dor abdominal	4 (28,6)		
Diarreia	2 (14,3)		
Comorbidades, n (%)			
Hipertensão arterial	3 (21,4)	Tempo de sintomas até admissão HFR (dias), mediana (min-max)	4 (1-8)
imunossuprimido (tx renal prévio)	1 (7,1)	Distância entre o local de exposição e HFR (km), média (min-max)	148,7 (30-291)
Tabagismo	3 (21,4)		

FA: febre amarela; tx: transplante; g/dl: gramas por decilitro; min: valor mínimo; max: valor máximo; km: quilômetro;
AST aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; HFR: Hospital Felício Rocho

Todos os pacientes estiveram no meio rural nos dez dias que antecederam o início dos sintomas. Dentre os 14 pacientes, 6 eram trabalhadores rurais e 8 eram moradores da zona urbana. Todos os pacientes atendidos no HFR eram

procedentes na Região Metropolitana de Belo Horizonte ou da Zona da Mata de MG.

Distribuímos os 14 pacientes admitidos no HFR com FA confirmada em dois grupos: o primeiro grupo incluiu 6 pacientes que evoluíram de forma favorável, com melhora clínica (MC) sem serem submetidos a qualquer intervenção; o segundo grupo incluiu 8 pacientes que evoluíram de forma desfavorável, tendo como desfecho a perda do fígado – sendo necessária a realização de transplante hepático (TH) – ou óbito (PFO). Neste segundo grupo (PFO) todos os pacientes que não foram submetidos a TH faleceram (4); dentre os que foram submetidos a TH, 2 apresentaram melhora clínica pós-TH e 2 também foram a óbito. Este fluxograma está descrito na figura 9.

4.2 – Manifestações neurológicas

Entre os 14 pacientes admitidos com FA confirmada, 10 apresentaram manifestações neurológicas. A figura 9 descreve a relação entre o desenvolvimento de quadro neurológico e o desfecho para os grupos MC ou PFO. As alterações do estado mental se caracterizaram por serem progressivas e relacionadas a mau prognóstico, tendo em vista que 8/10 pacientes evoluíram para perda do fígado ou óbito (PFO).

Em todos os pacientes os sintomas neurológicos surgiram entre o D4-D10 de início do quadro clínico. Trata-se cronologicamente da fase toxêmica, em que há pico da viremia e momento das manifestações clínicas mais graves. Eles apresentaram rebaixamento sensorial com necessidade de intubação orotraqueal para proteção de vias aéreas em média 20 horas após o início dos sintomas neurológicos, o que sugere uma evolução muito rápida e grave. Três deles não puderam ser transportados até o setor de imagem para exame do crânio em função do seu estado crítico; os demais foram submetidos a tomografia computadorizada e não foi identificada qualquer alteração aguda.

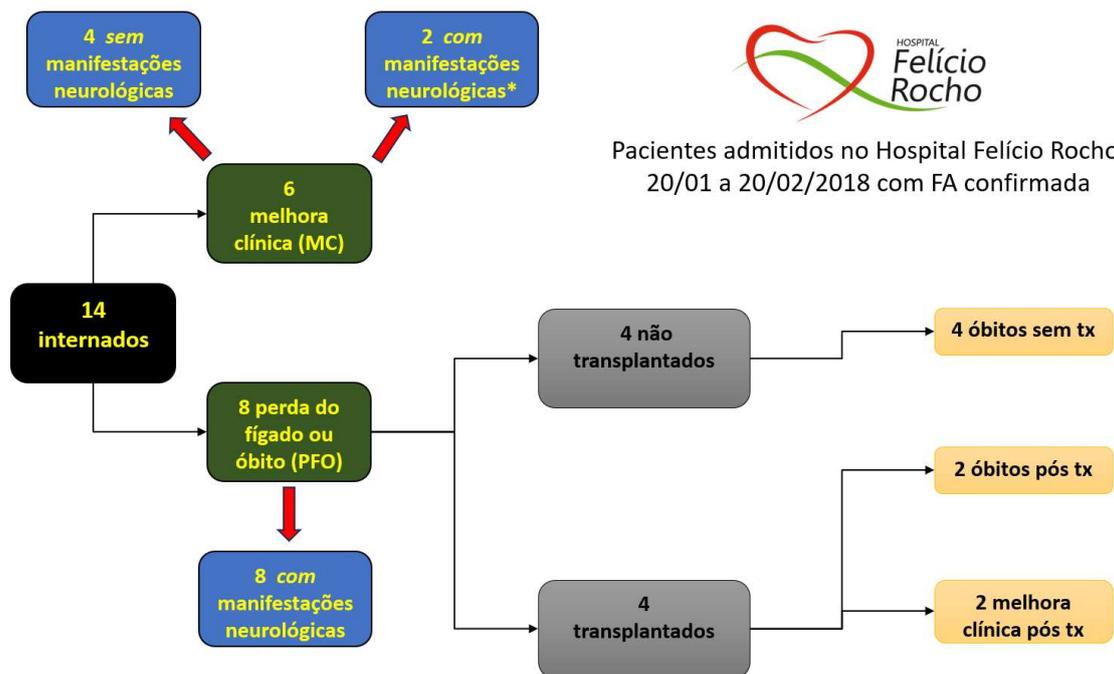


Figura 9 – Fluxograma de acompanhamento dos pacientes internados no Hospital Felício Rocho com febre amarela confirmada considerando dois grupos a partir do seu desfecho: o grupo que evoluiu com **melhora clínica (MC)** e o grupo que evoluiu com **perda do fígado ou óbito (PFO)** e a sua relação com o desenvolvimento de manifestações neurológicas.

*Estes dois pacientes tiveram quadro neurológico atribuído a septicemia.

Apenas dois pacientes que desenvolveram sintomas neurológicos não evoluíram para perda do fígado ou óbito (casos 5 e 7). Em ambos o quadro foi marcado por sonolência e desorientação têmporo-espacial e não foi progressivo como nos demais; ambos apresentaram sinais de resposta inflamatória sistêmica com leucocitose e elevação de marcadores (proteína C reativa), e posteriormente tiveram a confirmação do diagnóstico de sepse com a positivação de hemoculturas. Deste modo, o quadro neurológico foi atribuído à infecção sistêmica e não a EH. No entanto, o diagnóstico diferencial não é simples considerando a gravidade da FA e um dos pacientes foi inscrito na fila de transplante como IHA, sendo posteriormente excluído quando apresentou melhora clínica. Ambos apresentaram TC de crânio sem alterações agudas. A tabela 8 descreve o quadro neurológico destes pacientes e detalha a sua evolução.

Tabela 8 – Descrição das manifestações neurológicas em pacientes com febre amarela confirmada internados no Hospital Felício Rocho

	Dia de Início dos sintomas neurológicos	Intervalo entre início dos SN e TOT (horas)	Intervalo entre início dos SN e óbito (horas)	Exame de imagem	Características	Desfecho
PFO						
Caso 1	D10	12	65	Não fez	Lentificação inicial com rápida progressão para torpor e coma	óbito
Caso 4	D6	2	-	Não fez	Agitação; foi intubado por insuficiência respiratória	transplantado
Caso 8	D5	TOT eletivo para tx	-	TC e RNM normais	Lentificação e desorientação leve	transplantado
caso 9	D5	9	10	TC normal	Sonolência e flapping com rápida evolução para coma	óbito
Caso 11	D4	36	-	TC normal	Sonolência, desorientação, evolução para torpor e coma	transplantado
Caso 12	D5	20	67	Não fez	Sonolência, desorientação, evolução para torpor e coma	óbito
Caso 13	D5	1	40	Não fez	Crises convulsivas reentrantes	óbito
caso 14	D9	60	-	TC edema cerebral	Lentificação, flapping, evolução para torpor e coma	transplantado
MC						
caso 5	D10	Não foi intubado	-	TC normal	Confusão mental e desorientação, recuperação completa. Sepse fúngica	Melhora clínica
Caso 7	D9	Não foi intubado	-	TC normal	Confusão mental e desorientação, recuperação completa. Sepse bacteriana.	Melhora clínica

PFO: Perda do fígado ou óbito; MC: melhora clínica; TC: tomografia computadorizada; TOT: intubação orotraqueal; SN: sintomas neurológicos

4.3 – Análise da evolução dos níveis séricos de bilirrubina e intervalo icterícia-encefalopatia

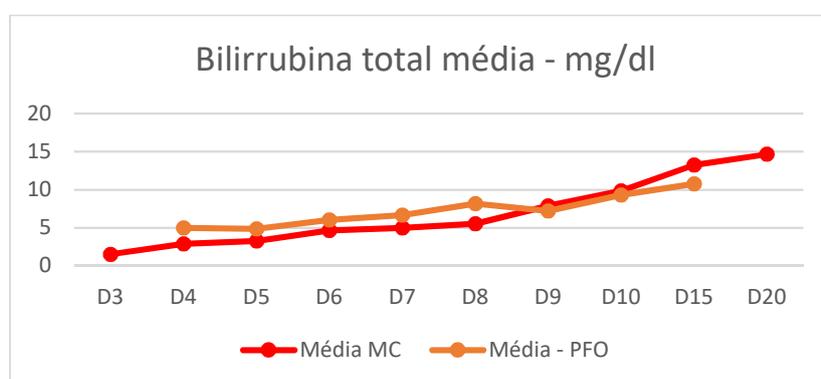
Os níveis de bilirrubina total (BT) apresentaram uma cinética de elevação progressiva entre todos os portadores de FA, sendo que os níveis mais altos foram atingidos após o 14º dia de sintoma. Entre os pacientes do grupo MC, os níveis médios de BT foram inicialmente mais baixos do que do grupo PFO. Entretanto, entre eles também ocorreu aumento progressivo, atingindo níveis ainda mais elevados do que os do outro grupo, que teve sua curva de ascensão interrompida por óbito ou transplante.

No período crítico de discussão sobre indicação de TH que ocorreu entre o 4º e o 10º dia de sintoma – quando surgiram as manifestações neurológicas que definiram o quadro de IHA – os níveis de bilirrubinas totais estavam, em todos os casos, em níveis inferiores a 7 mg/dl, muito abaixo do valor de corte de 17,5 mg/dl usado pelo critério de King's College.

Os pacientes que atingiram os níveis mais elevados de BT foram os casos 5 e 7 que apresentaram sepse bacteriana e fúngica no curso de sua evolução.

Em todos os 8 pacientes do grupo PFO a icterícia clínica foi notada entre o D3 e D4 de evolução. Considerando que os sintomas neurológicos surgiram entre D5-D10, podemos afirmar que todos os pacientes do grupo apresentaram um intervalo icterícia-encefalopatia inferior ou igual a 07 dias. O gráfico 1 descreve a evolução dos níveis de BT dos dois grupos, MC e PFO.

Gráfico 1 – Evolução da média dos níveis de bilirrubina total entre pacientes com febre amarela confirmada internados no Hospital Felício Rocho.



Eixo vertical em miligramas por decilitro; eixo horizontal em dias após início dos sintomas.

4.4 – Análise dos níveis de Tempo de Protrombina e RNI

A tabela 9 descreve a evolução do RNI entre os pacientes com diagnóstico de FA dos grupos MC e PFO.

Todos os pacientes do grupo PFO receberam precocemente transfusão de plasma fresco para correção da coagulopatia e realização de procedimentos invasivos, como punção de cateter central ou de cateter de duplo-lúmen para realização de hemodiálise ou de plasmaférese. Ainda assim neste grupo houve elevação do RNI acima de 1,5 desde a admissão em todos os casos. Os pacientes do grupo MC não receberam plasma fresco ou outros hemoderivados e apresentaram RNI abaixo de 1,5 à admissão, à exceção do caso 5.

No período crítico de discussão sobre indicação de TH que ocorreu entre o 4º e o 10º dia de sintoma – quando surgiram as manifestações neurológicas que definiram o quadro de IHA – 4 pacientes do grupo PFO apresentaram $RNI \geq 3,5$ (critério menor de acordo com os critérios prognósticos do King's College utilizados para indicação de transplante), sendo que em 3 deles o RNI foi maior que 6,5 (critério maior). Estes pacientes foram inscritos em fila de transplante com base neste critério, dois deles foram efetivamente transplantados e nenhum sobreviveu. Nota-se, assim, que a elevação do RNI acima de 3,5 correlaciona-se com um desfecho desfavorável e está ligada à gravidade da doença.

Entretanto, os demais 4 pacientes do grupo PFO não tiveram elevação do RNI acima de 3,5 e mesmo assim apresentaram evolução desfavorável. É possível que a transfusão de plasma fresco tenha inicialmente mascarado os níveis de RNI, mas eles se mantiveram abaixo deste parâmetro nos dias subsequentes mesmo sem novas transfusões. No caso destes pacientes, os critérios de King's College não foram capazes de prever a gravidade e portanto não foi possível utilizá-los para inscrição em fila de transplante. A figura 10 descreve a evolução dos pacientes de acordo com os níveis de RNI.

Tabela 9 – Evolução do RNI em pacientes com diagnóstico confirmado de febre amarela internados no Hospital Felício Rocho

EVOLUÇÃO DO RNI ENTRE PORTADORES DE FA QUE EVOLUÍRAM COM PFO									
	PFC	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D14
Caso 1	Sim	-	-	-	-	1,7	-	1,2	2,9
Caso 4	Sim	4,1	6,6	7,9	>9	-	-	-	-
Caso 8	Não	-	2,3	2,0	-	-	-	-	-
Caso 9	Sim	>7	5,5	-	-	-	-	-	-
Caso 11	Sim	-	>9	>10	-	-	-	-	-
Caso 12	Sim	-	-	4,4	2,3	-	-	-	-
Caso 13	Sim	2,0	2,2	3,0	2,7	-	-	-	-
Caso 14	Sim	-	2,6	2,7	2,0	2,4	2,9	2,1	-

EVOLUÇÃO DO RNI ENTRE PORTADORES DE FA QUE EVOLUÍRAM COM MC									
	PFC	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D14
Caso 2	Não	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	-	-	-
Caso 3	Não	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	-	-
Caso 5	Não	1,6	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3	1,3	1,2
Caso 6	Não	-	-	1,7	1,7	1,5	-	-	1,1
Caso 7	Não	1,4	1,5	1,6	1,7	1,6	1,4	1,4	1,2
Caso 10	Não	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1	-

PFC: plasma fresco concentrado; RNI: razão normalizada internacional; PFO: perda do fígado ou óbito; MC: melhora clínica

4.5 – Análise dos níveis de Fator V

Entre os 8 pacientes do grupo PFO, 4 pacientes apresentaram $RNI \geq 3,5$ e nestes casos o transplante foi indicado pelos critérios de King's College. A dosagem rotineira do fator V tornou-se disponível após o caso 4, e podemos observar a descrição evolutiva nos pacientes na tabela 10. Dois destes dosaram o Fator V e ele mostrou-se abaixo de 20%, preenchendo os critérios de Clichy-Villejuif de indicação de TH e corroborando a gravidade já identificada.

A dosagem de fator V foi especialmente útil entre os demais 4 pacientes do grupo PFO, pois o seu desfecho negativo não foi previsto pelos critérios de King's College uma vez que apresentaram $RNI < 3,5$. Dentre eles foi realizada a dosagem do fator V em três, que mostrou-se abaixo de 20%. Dois destes pacientes foram submetidos a transplante de fígado e evoluíram de forma favorável pós-transplante. O transplante foi indicado nestes casos pelos critérios de Clichy modificado.

Entre os pacientes do grupo MC o fator V esteve sempre acima de 40%, o que foi compatível com o desfecho positivo de todos os pacientes.

Tabela 10 – Evolução dos níveis de fator V entre portadores de febre amarela internados no Hospital Felício Rocho

	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D12
PFO							
Caso 4	-	-	15,6	-	-	-	-
Caso 8	15,8	21,5	-	-	-	-	-
Caso 9	-	8,8	-	-	-	-	-
Caso 13	16,6	22,4	-	-	-	-	-
Caso 14	-	-	21,0	21,7	21,5	12,8	-
MC							
Caso 2	-	-	-	-	161,0	-	-
Caso 5	-	-	-	-	-	-	158
Caso 6	81,6	-	-	-	-	-	-
Caso 7	44,4	-	-	-	-	-	-

PFO: Perda do fígado ou óbito; MC: melhora clínica; D: dia de sintoma.

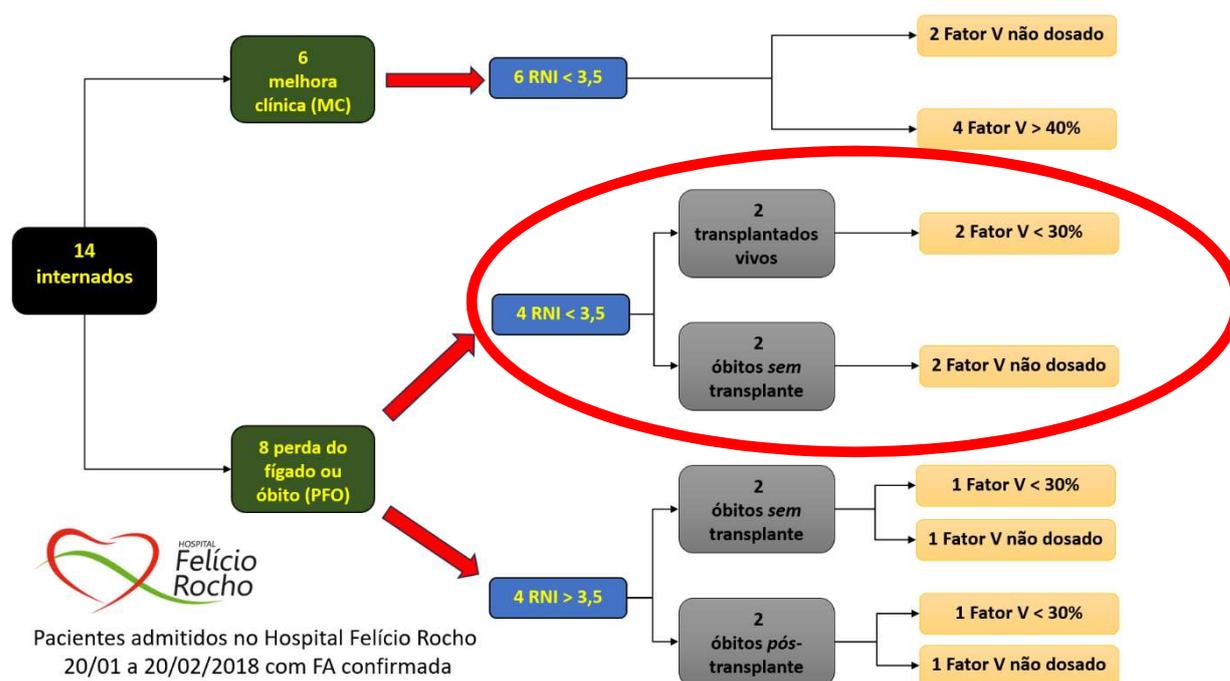


Figura 10 – Fluxograma acompanha os pacientes internados no Hospital Felício Rocho com febre amarela confirmada considerando dois grupos a partir do seu desfecho: o grupo que evoluiu com **melhora clínica (MC)** e o grupo que evoluiu com **perda do fígado ou óbito (PFO)** e a sua relação com os níveis de RNI e Fator V. Em destaque os pacientes do grupo PFO cujos níveis de RNI não se elevaram acima de 3,5; a dosagem de fator V encontrava-se abaixo de 30% naqueles em que ela foi dosada, e isto permitiu a inscrição mais precoce na fila de transplante hepático nestes pacientes.

4.6 – Abordagem pré-transplante e indicação de TH

Todos os pacientes foram admitidos com quadro de icterícia febril e importante repercussão no estado geral – deste modo receberam doxíciclina e ceftriaxona como tratamento empírico de rickettsiose e leptospirose, respectivamente, até que ocorresse a confirmação do diagnóstico.

Todos os pacientes receberam ivermectina em tratamento compassivo em função de potencial efeito antiviral na dose de 200 mcg/kg/dia durante 05 dias após confirmado o diagnóstico de FA.

O tratamento compassivo com sofosbuvir foi administrado a três pacientes que receberam doação do medicamento. A dose utilizada foi de 400 mg/dia iniciada ao diagnóstico de FA e mantida por 07 dias após o TH. Entre os três pacientes que receberam sofosbuvir encontram-se os dois que foram submetidos a TH e sobreviveram.

Plasmaferese foi realizada apenas nos casos 13 e 14. O aparelho utilizado foi MCSp (Haemonetics, Braintree, MA), que é um sistema de aférese convencional de fluxo intermitente. No caso 13 o paciente apresentou crise convulsiva e rebaixamento súbito do nível de consciência, sendo submetido a intubação orotraqueal e necessitando de aminas vasoativas; neste momento, apesar de sua gravidade, foi submetido a sessão única de plasmaferese com duração 151 min e retirada de 3.765 ml, sem piora hemodinâmica durante o procedimento. Entretanto, o paciente evoluiu para óbito antes que fosse possível prosseguir com esta terapêutica ou transplantá-lo.

Quanto ao caso 14, foi possível submetê-lo a três sessões de plasmaferese ainda antes do desenvolvimento de sinais neurológicos. Com o objetivo de processar maior volume, o intervalo entre as sessões foi menor do que 24 horas (sessão 1 – 3,0 litros 146 min; sessão 2 – 16h após – 3,0 litros 138 min; sessão 3 – 24 horas após – 4,0 litros 167 min). Não houve instabilidade e as sessões foram interrompidas pela realização do transplante.

A injúria renal aguda grave com necessidade de terapia substitutiva renal foi regra em todos os pacientes do grupo PFO; todos eles foram submetidos a hemodiálise; o caso 4 foi submetido a dialise peritoneal iniciada no hospital de

origem, posteriormente modificada para HD. Os pacientes do grupo MC não necessitaram diálise, a exceção do paciente caso 5, que apresentou infecção bacteriana e choque séptico.

Todos os pacientes que apresentaram alterações neurológicas foram inscritos em fila de transplante, a exceção do caso 5, paciente imunossuprimido por transplante renal prévio que claramente encontrava-se séptico. Foram, portanto, nove pacientes em lista.

Houve uma evolução na maneira de indicar o transplante hepático ao longo do tempo: os três primeiros casos foram avaliados utilizando-se os critérios de King's college clássicos, considerando que a dosagem de fator V não estava disponível; do caso 4 até o caso 7 tanto os critérios de King's college como os de Clichy-Villejuif foram utilizados para avaliação.

No caso 1 não havia elevação significativa nem de bilirrubina e nem de RNI – ele evoluiu com quadro neurológico típico de encefalopatia rapidamente progressiva e foi a óbito sem preencher os critérios para transplante. O caso 4 preenchia estes critérios já à admissão mas não estava com encefalopatia até ser intubado por quadro de agitação e insuficiência respiratória com acidose, sendo então sedado. Optou-se pela inscrição em fila e foi transplantado no mesmo dia, evoluindo para óbito no pós-operatório imediato. Os casos 2, 3, 5, 6 não foram inscritos na fila e pertencem ao grupo MC. O caso 7 não apresentava coagulopatia importante e nem preenchia os critérios de Clichy-Villejuif, mas preenchia King's College com critérios menores; assim, foi inscrito quando apresentou sinais neurológicos. Ao mesmo tempo apresentava leucocitose e foram introduzidos antibióticos, que levaram a uma melhora clínica e remissão da encefalopatia; posteriormente ocorreu positividade da hemocultura, confirmando que ele estava séptico, sendo retirado da fila de transplante.

A troca de experiências com as demais equipes de transplante do país que enfrentavam a epidemia geraram impressões iniciais que impactaram na maneira de indicar o transplante: o fator V parecia alterar-se mais precocemente em relação ao RNI, o que poderia fazer dos critérios de Clichy mais sensíveis para indicar o transplante; entretanto, os pacientes inscritos com encefalopatia graus III/IV evoluíam para óbito muito rapidamente, impossibilitando a realização

do procedimento em tempo hábil; deste modo, a indicação do transplante deveria ocorrer com um grau mais leve de EH, I ou II. Deste modo surgiram os critérios de Clichy modificados na epidemia da FA. Posteriormente oficializados em portaria do Ministério da Saúde / SNT.

O caso 8 foi o primeiro avaliado com estes critérios e chama atenção o fato de não preencher os critérios de King's College em momento algum, entretanto, o fator V encontrava-se abaixo de 20% desde a admissão. O transplante foi indicado quando apresentou alterações cognitivas leves, interpretadas como EH grau I. Ele apresentou ótima evolução pós-operatória, sendo um dos dois pacientes com bom desfecho pós-TH. O caso 9 preencheu todos os critérios tanto do King's College quanto de Clichy, entretanto entre a primeira manifestação neurológica e o óbito transcorreram apenas 9h, tornando o transplante impossível. O caso 10 não foi inscrito na fila de transplante e pertence ao grupo MC.

Os casos 11 e 12 foram admitidos no hospital já com encefalopatia grau III e critérios de King's College preenchidos; o primeiro foi submetido a TH e faleceu no pós-operatório; o segundo evoluiu com choque refratário e perdeu a condição clínica de ser transplantado, evoluindo para óbito.

O caso 13 não preencheu os critérios de King's College mas apresentou fator V abaixo de 20%, inicialmente sem EH; sua manifestação neurológica inicial foram crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas motivando intubação orotraqueal; foi inscrito em fila mas apresentou status epilepticus e faleceu menos de dois dias depois, não sendo possível o transplante.

O caso 14 também em momento algum preencheu os critérios de King's college mas apresentou de um fator V muito reduzido, chegando a estar abaixo de 20%. Foi inscrito na fila quando apresentou sinais de EH grau I. No seu caso a evolução da encefalopatia ocorreu mais lentamente, sendo intubado dois dias depois com EH grau IV quase no momento do TH. Apresentou boa evolução pós-operatória e evoluiu de modo favorável.

4.7 – Transplante hepático: per e pós-operatório

Um total de quatro pacientes foram submetidos a transplante de fígado. O primeiro (caso 4) ocorreu em condições adversas, sendo o doador marginal com fígado volumoso e muito esteatótico à avaliação macroscópica. Optou-se por aceitar o enxerto tendo em vista a gravidade do receptor, que naquele momento encontrava-se já intubado, em ventilação mecânica e em uso de aminas vasoativas. A reperfusão do enxerto foi inadequada e ele comportou-se de modo disfuncional, apresentando grave discrasia e motivando polihemotransfusão maciça per-operatória. O paciente faleceu três horas após o término do transplante.

Para os demais três casos os doadores apresentavam características mais favoráveis, descritas na tabela 11. Como estratégia para reduzir o sangramento per-operatório para os casos subsequentes optou-se por corrigir a discrasia sanguínea de forma agressiva previamente ao início da cirurgia e não apenas avaliar a coagulação já na situação de sangramento vigente, utilizando-se da tromboelastografia como parâmetro de orientação.

Tabela 11 – Dados relativos ao doador e eventos per-operatórios dos pacientes submetidos a transplante hepático por febre amarela

Caso	Tempo de espera na fila (horas)	Antibiótico profilático per-operatório	Transfusão hemácias (ml)	Transfusão PFC (ml)	Tempo de isquemia fria	Doador idade / IMC	Doador sódio, nora	Observações sobre o transplante
Caso 4	15	Vancomicina / Piperacilina tazobactam / fluconazol	3600	2200	7 horas	59 / 25,5	153 / 0,01 mcg/kg/min	Fígado marginal, esteatose grave, discrasia sanguínea, choque grave, perfusão ruim do enxerto, laparostomia
Caso 8	30	Cefotaxima / ampicilina / fluconazol	300	não	3 horas	33 / 24,7	145 / não	Boa reperfusão, sem intercorrências
Caso 11	30	Cefotaxima / ampicilina / fluconazol	2700	800	7 horas	32 / 28,6	157 / 0,1 mcg/kg/min	Fígado grande, boa reperfusão, fechado pele.
Caso 14	72	Piperacilina / tazobactam / fluconazol	900	1400	4 horas	44 / 20,5	145 / não	Enxerto com bom aspecto e boa reperfusão, sem intercorrências

ml: mililitros; PFC: plasma fresco concentrado; IMC: índice de massa corporal; nora: noradrenalina; mcg/kg/min: microgramas por quilograma por minuto; IGL: *Institut George Lopez*

Houve uma redução expressiva da necessidade de transfusão de hemácias nestes transplantes em relação ao primeiro; entretanto a discrasia persistiu nos

dias subsequentes ao transplante. Em função desta discrasia dois pacientes retornaram ao bloco para re-abordagem abdominal por sangramento. Foi constatado que não havia vaso sanguíneo específico sangrando e realizada lavagem da cavidade abdominal. A tromboelastografia continuou a ser utilizada como ferramenta no pós-operatório e ela demonstrou fibrinólise persistente e prolongada em todos os pacientes transplantados, mesmo naqueles em que havia bom funcionamento do enxerto hepático, achado muito marcante. A descrição das necessidades transfusionais no pós-transplante está na tabela 12.

A técnica cirúrgica utilizada em todos os casos foi a de piggy-back; a solução de conservação utilizada foi IGL.

A evolução das transaminases no pós-operatório dos pacientes foi habitual, com pico nas primeiras 48 horas, entretanto com níveis muito elevados e desproporcionais ao esperado pelo tempo de isquemia e demais fatores per-operatórios (Caso 8: TGO: 5731 mg/dl – TGP 2655 mg/dl; Caso 11: TGO 7760 mg/dl – TGP 3372 mg/dl; Caso 14: TGO 3683 mg/dl TGP 1426 mg/dl); houve queda progressiva subsequente. Quanto à evolução das enzimas canaliculares, também foi habitual com pico nos primeiros 12 dias e posterior queda progressiva (Caso 8, 8º DPO: FA 209 mg/dl – GGT 366 mg/dl; Caso 11, 3º DPO: FA 69 mg/dl – GGT 250 mg/dl; Caso 14, 8º DPO: FA: 275 mg/dl GGT 528 mg/dl).

Nenhum paciente apresentou outras complicações descritas na FA, como arritmias ou pancreatite aguda no curso de sua evolução. Os pacientes transplantados que sobreviveram não apresentaram sequelas neurológicas ou motoras. Entretanto, todos os pacientes necessitaram hemodiálise no período pós-operatório. Entre os sobreviventes houve recuperação da função renal e suspensão da terapia dialítica ainda durante a internação do TH.

Infecções foram complicações comuns no período pós-transplante entre os pacientes que sobreviveram, sendo que ambos apresentaram pneumonia nosocomial; um dos pacientes recebeu tratamento preemptivo para citomegalovírus.

Tabela 12 – Dados relativos ao período pós-operatório dos pacientes submetidos a transplante hepático por febre amarela

Caso	antibióticos pós-TH	Choque	Transfusão	Infecções	Re-abordagem cirúrgica	Alta CTI/ hospitalar (DPO)	Desfecho
Caso 4	-	Sim	-	-	-	-	Óbito 1º DPO
Caso 8	Ganciclovir Teicoplanina meropenem Anidulafungina	não	18u de plaquetas 1500 ml CH 1000 ml PFC 30u crioprecipitado	Pneumonia nosocomial / Preemptivo CMV	Hemorragia por discrasia, re-abordagem D2	25º/42º	Alta pós-TH
Caso 11	não	Sim	34u de plaquetas 4400 ml PFC 49u crioprecipitado Fibrinogênio sintético Complexo protrombínico	não	- Fechamento parede D1 - Hemorragia, re-abordagem D2	-	Óbito 4º DPO
Caso 14	Teicoplanina Meropenem	Não	48u de plaquetas 3600 ml CH 2600 ml PFC Fibrinogênio sintético Complexo protrombínico	Pneumonia nosocomial	não	12º/22º	Alta pós-TH

HD: hemodiálise; CMV: citomegalovírus; CH: concentrado de hemácias; PFC: plasma fresco concentrado; DPO: dia pós-operatório

4.8 – Anatomia patológica

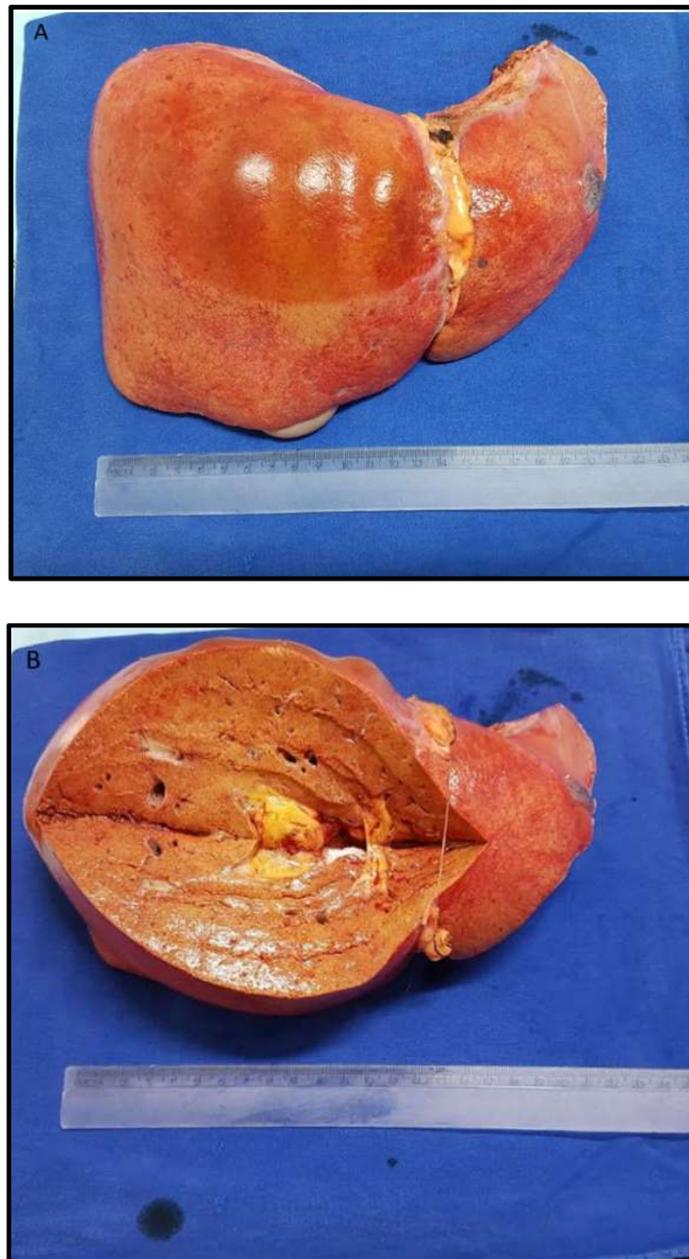


Figura 11 – Aspecto macroscópico do fígado explantado de paciente submetido a TH por FA (caso 04). (A) Superfície externa e (B) superfície de corte. Observa-se cápsula lisa, brilhante e transparente, permitindo a observação de parênquima com tonalidade amarelada.



Figura 12 – (A) Aspecto macroscópico de superfície de corte de fígado explantado fixado de paciente submetido a TH por FA (caso 04). (B) Detalhe da macroscopia, notando-se lesões petequiais distribuídas por toda a superfície

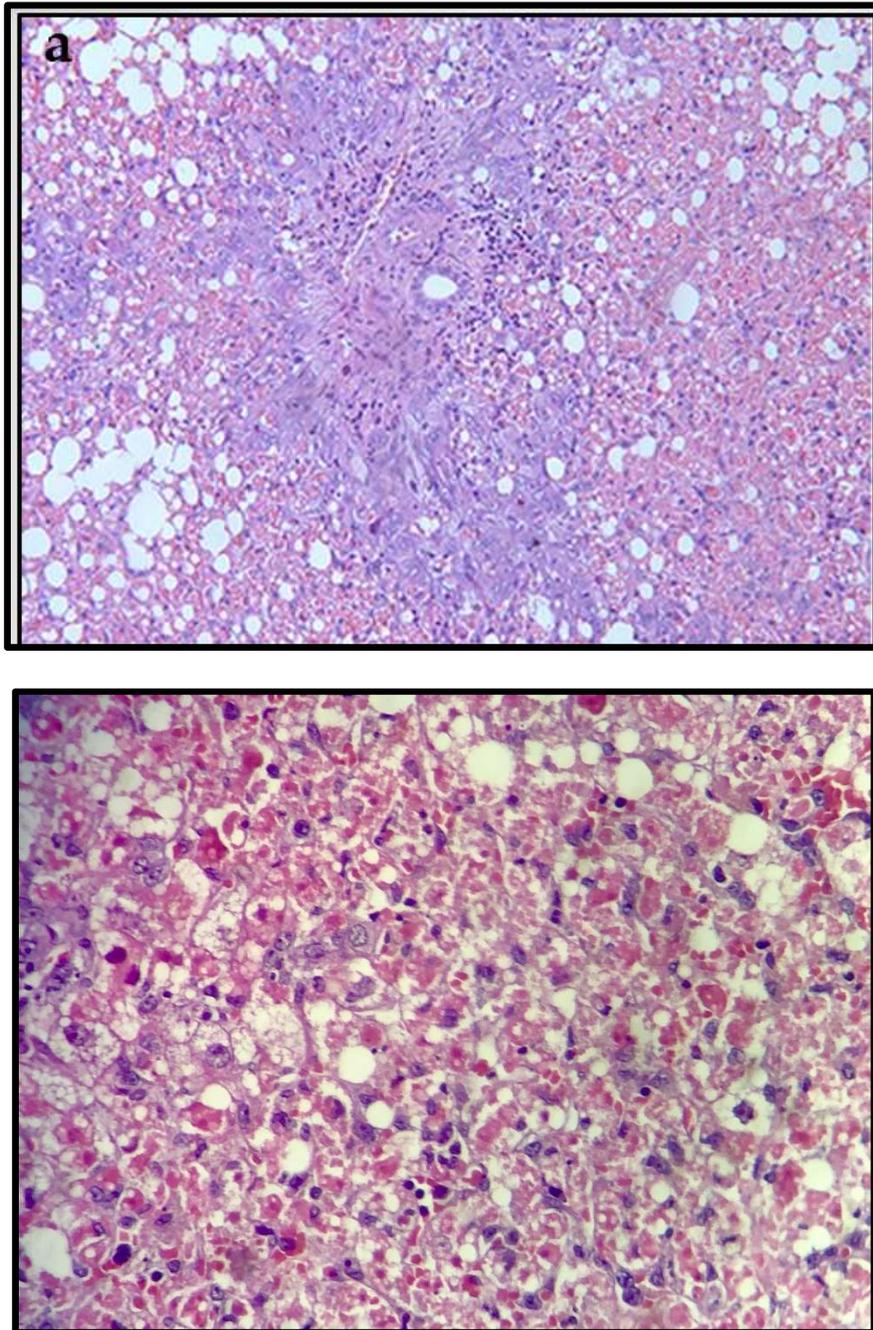


Figura 13 – Cortes histológicos de fígado explantado de portador de FA submetido a TH por IHA (caso 11) em coloração por HE com necrose hepatocitária associada a infiltrado inflamatório mononuclear discreto (especialmente em zona 2) além de frequentes hepatócitos exibindo degeneração acidófila – corpos de Councilman-Rocha-Lima; esteatose macro e microvesicular e áreas de hemorragia.

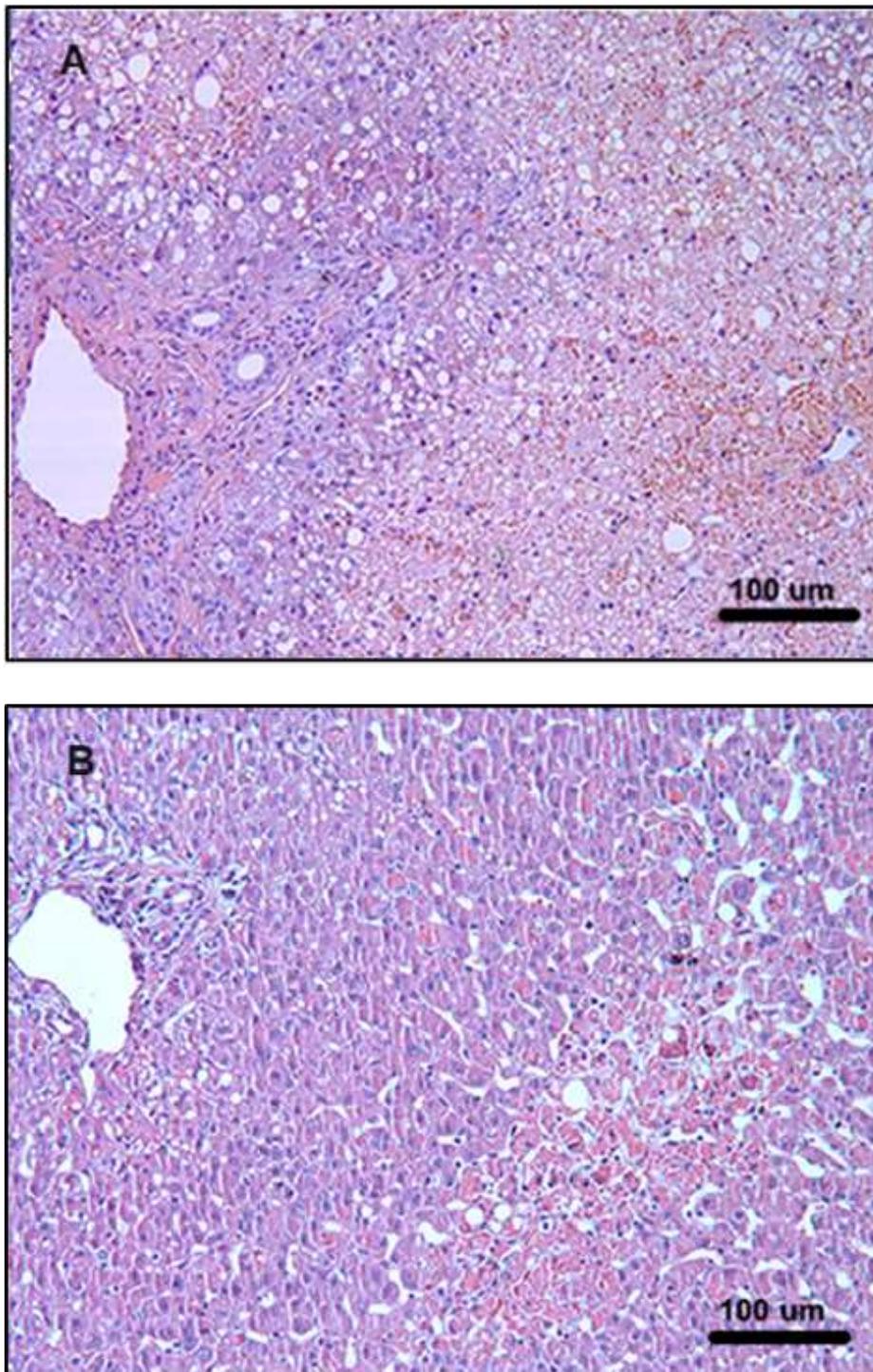


Figura 14 – Cortes histológicas em coloração por HE de biópsias de enxertos hepáticos, realizadas ambas no 2º DPO durante reabordagem cirúrgica de dois pacientes distintos. (A) (Caso 11) necrose hepatocitária acentuada associada a infiltrado inflamatório mononuclear discreto além de frequentes corpos apoptóticos; esteatose e áreas de hemorragia. (B) (Caso 8) Presença de corpos apoptóticos e discreta necrose hepatocitária localizados em zona 2.

Os quatro pacientes submetidos a transplante de fígado tiveram seus fígados explantados submetidos a avaliação anátomo-patológica. O peso dos explantes variou de 1007 a 1263 gramas. Todos os fígados explantados apresentavam as mesmas características macroscópicas como descrito na *figura 11*. Não havia sinais de trombo arterial ou venoso ou lesões focais nos explantes.

A microscopia dos fígados explantados mostrou achados típicos de FA como descrito na *figura 13*. As células de Kupffer estavam hiperplasiadas e hipertróficas, algumas delas com citofagocitose. Os sinusoides estavam dilatados e congestionados com focos de hemorragia, especialmente ao redor da veia centrolobular. Depósitos de pigmento férrico eram raros, principalmente presentes adjacentes a áreas hemorrágicas. Havia uma clara dissociação entre a gravidade da lesão celular hepatocitária e o infiltrado inflamatório, que era leve, principalmente localizado em tratos portais e composto por linfócitos, alguns macrófagos e raros neutrófilos. Em nenhum dos casos havia arterite, lesão ao ducto biliar ou deposição de colágeno intersticial.

Entre os pacientes submetidos a TH, dois deles (caso 8 e caso 11) necessitaram reabordagem cirúrgica por hemorragia em sítio cirúrgico e em ambos os casos esta aconteceu no 2º dia pós-operatório. Neste momento foram obtidas amostras do enxerto, com imagens mostradas na *Figura 14*. Há dois aspectos que chamam atenção: a presença tão precoce de alterações sugestivas de FA; e a diferença de intensidade e de gravidade dos achados comparando-se os dois pacientes, com uma lesão muito mais extensa e grave no caso 11 – que evoluiu no 4º dia pós-operatório para óbito, enquanto o outro paciente sobreviveu.

A análise da microscopia eletrônica de transmissão demonstrou esteatose microvesicular nos hepatócitos infectados por vírus da FA, com um aumento de três vezes no número de gotículas lipídicas em relação ao que se observa em hepatócitos normais³² (*Figura 15*). Tanto a esteatose quanto certos tipos de morte celular foram relacionadas a alterações do sinal de cálcio mitocondrial em hepatócitos, e estes achados foram motivo para novos estudos aprofundados³².

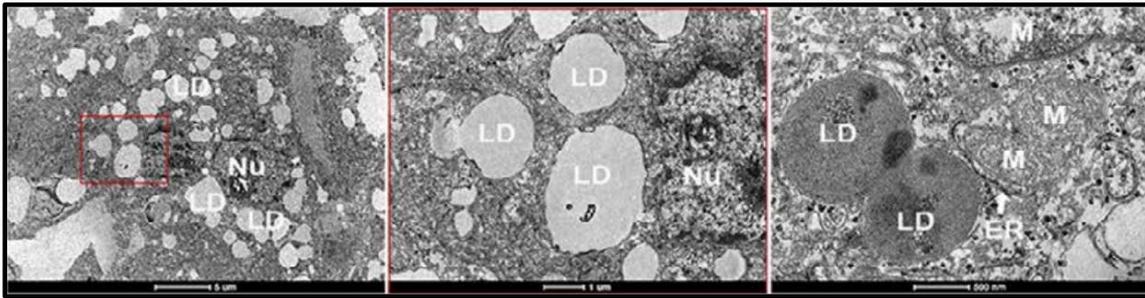


Figura 15 – Visão em microscopia eletrônica de cortes histológicos do fígado explantado de paciente submetido a TH por FA (caso 11) em aumentos progressivos. Os hepatócitos apresentam mitocôndrias com cristas desorganizadas ou ausentes, gotículas lipídicas frequentes e retículo endoplasmático liso de aspecto vesicular.

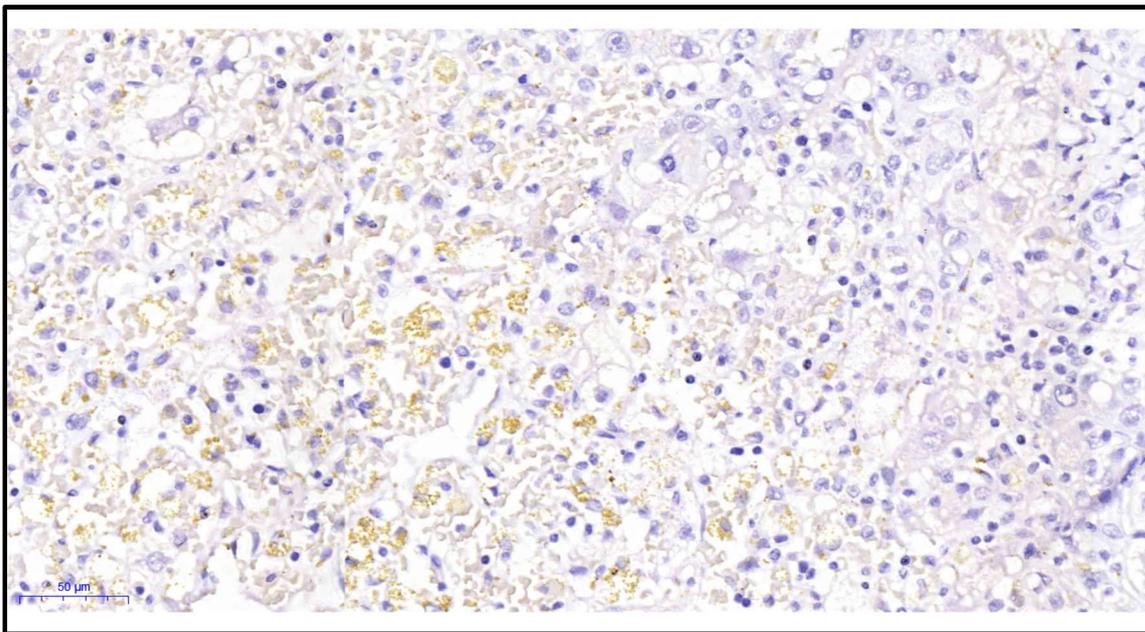


Figura 16 - Imunohistoquímica realizada com anticorpo contra proteína do envelope de flavivírus 4G2 realizada em amostra de fígado explantado de paciente submetido a TH por FA (caso 11). A marcação exuberante mostra a presença de partículas virais no citoplasma dos hepatócitos distribuídos por todo o corte histológico.

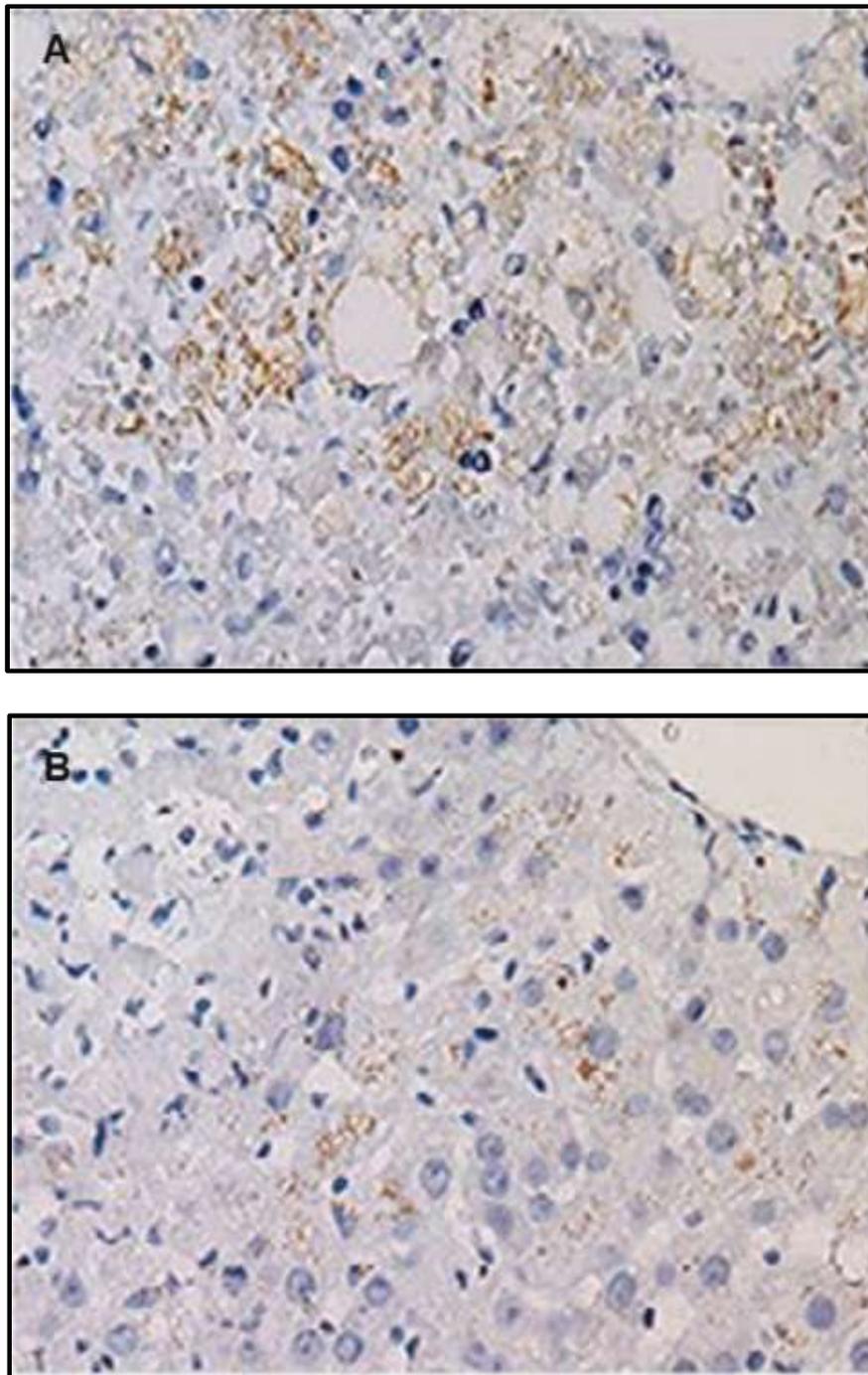


Figura 17 - Imunohistoquímica com anticorpo contra proteína 4G2 do envelope de flavivírus em biópsias de enxertos hepáticos, realizadas no 2º DPO durante reabordagem cirúrgica de dois pacientes distintos. (A) Presença de partículas virais em grande intensidade no citoplasma de hepatócitos distribuídos por todo o corte (caso 11); (B) partículas virais presentes em pequeno número de hepatócitos localizados em zona 2 (caso 8).

Foi realizada imunohistoquímica com anticorpo contra proteína 4G2 do envelope de flavivírus em amostras dos fígados explantados dos quatro pacientes submetidos a transplante e em todos os casos houve marcação exuberante em marrom claro como observado na figura 16, confirmando a associação entre a lesão hepática e a infecção pelo vírus da FA nestes pacientes.

A imunohistoquímica foi realizada posteriormente nas amostras de biópsias dos enxertos coletadas de dois pacientes (casos 8 e 11) que foram reabordados no 2º DPO (figura 17). Ambos apresentaram marcação em marrom confirmando a reinfecção do vírus da FA no enxerto, ratificando a relação entre os achados histológicos e a presença do vírus. O caso 11, que evoluiu a óbito no 4º DPO e cujas lesões histológicas mostraram-se muito exuberantes, apresentou marcação intensa e difusa, demonstrando grande quantidade de partículas virais nos hepatócitos. O caso 8, que sobreviveu, e cujas lesões histológicas foram leves, apresentou, ao contrário, marcação demonstrando pequena quantidade de partículas virais.

Além da análise histológica dos enxertos dos casos 8 e 11, foi ainda realizada avaliação de biópsia *post-mortem* do enxerto do caso 4. Os achados foram típicos de grave infecção pelo vírus da FA já descrita nos demais casos e também aqui a imunohistoquímica confirmou a re-infecção viral sobre o enxerto. Dentre os pacientes transplantados, apenas o caso 14 não teve o seu enxerto biopsiado.

4.9 – Acompanhamento a longo prazo

Entre os seis paciente de evolução favorável acompanhados neste estudo, todos foram seguidos por pelo menos seis meses pós alta hospitalar e não apresentaram complicações relacionadas a FA. Nenhum deles apresentou forma tardia ou persistente de lesão hepática.

Com relação aos dois pacientes submetidos a TH e que sobreviveram (casos 8 e 14), ambos seguem em acompanhamento médico mais de 5 anos pós TH. Ambos mantêm bom funcionamento do enxerto e boa qualidade de vida, sem sequelas físicas ou neurológicas. Um deles (caso 8) apresentou episódios de

rejeição celular aguda motivando pulsoterapia com corticoides 3 anos pós TH; apresenta disfunção renal crônica relacionada ao uso de inibidores de calcineurina, que foi substituída tardiamente por everolimo. O caso 14 não apresentou complicações tardias pós TH até o momento e está em uso de tacrolimo em dose baixa.

5 – DISCUSSÃO

Historicamente até 2018 as epidemias de FA ocorreram em áreas desprovidas de assistência médica terciária ou quaternária e a sua evolução dramática com alta mortalidade em curto prazo foi um obstáculo para que esses pacientes fossem avaliados e tratados em centros médicos com maiores recursos³. Epidemias em centros urbanos ocorreram em um passado já distante, e nas últimas décadas tornou-se uma doença de áreas silvestres afastadas em países tropicais, como é o caso da bacia amazônica e de regiões africanas. Isso explica nosso conhecimento tão limitado acerca de uma doença tão grave que já ceifou tantas vidas na história. E também faz crescer em importância todos os dados que foram armazenados referentes à epidemia de 2018 por seu caráter peculiar, acometendo áreas próximas de regiões com infraestrutura hospitalar avançada. Este trabalho vem somar-se a outros no sentido de consolidar o aprendizado que o árduo enfrentamento à epidemia trouxe.

A FA é uma doença sistêmica e sua gravidade e mortalidade estão relacionadas ao acometimento de vários órgãos. Na epidemia de 2018 no Brasil foram publicadas séries de casos de pacientes com FA grave acompanhados em terapia intensiva que descreveram uma elevada frequência de pancreatite aguda grave, insuficiência renal aguda e arritmias cardíacas^{2; 33; 34}. Apesar disso, a análise estatística de fatores preditores de mortalidade nos diferentes estudos indicou RNI, AST e encefalopatia hepática grau IV como fatores de risco independentes, todos eles relacionados à gravidade da doença hepática, além da idade e carga viral. Isso demonstra um papel central do acometimento do fígado na evolução para o óbito. Observa-se que frequentemente este desfecho final está relacionado à falência de múltiplos órgãos, com falência cardiocirculatória, renal, respiratória, neurológica, hemorragias e sepse. Ainda cabe esclarecer qual é a contribuição da falência hepática para a disfunção de cada sistema orgânico na FA, assim como qual é a contribuição da agressão viral a cada órgão / tecido e de suas consequências. Esta compreensão está no cerne da decisão sobre quem pode ou não se beneficiar de um TH – ou seja, trocar o fígado doente por outro saudável será suficiente para interromper todo o grave processo fisiopatológico em curso ou ele prosseguirá pela ação direta do vírus e suas consequências?

O sistema de saúde brasileiro, que engloba o sistema público (SUS) e a saúde suplementar e privada, mostrou toda a sua plasticidade e capacidade de reação diante da epidemia de uma doença com alta letalidade a curto prazo. Na abordagem da IHA, a mortalidade ou o sucesso têm relação direta com a celeridade de todo o processo: o encaminhamento, a avaliação precoce, a definição da indicação de TH, a inscrição em fila e finalmente a realização do procedimento.^{12 14} O Brasil é um país continental, e a área acometida pela epidemia é comparável a dos maiores países da Europa. Em Minas Gerais os centros transplantadores com maior experiência estão concentrados na sua capital, Belo Horizonte, o que obrigou todos os pacientes a um grande deslocamento. Não existe no estado de MG um sistema de encaminhamento estadual para o transplante de fígado, nem para consultas ambulatoriais eletivas (que são reguladas pelas secretarias municipais de saúde, e não por órgão estadual) e ainda menos para urgências como a IHA. Isto significa que não há fluxo estabelecido para que cada município faça este encaminhamento, dependendo de que cada médico local contacte diretamente os centros transplantadores. A consequência da falta de um protocolo estabelecido é o atraso na discussão e de encaminhamento destes casos. A realidade de MG não é única no Brasil e as publicações sobre resultados de TH na IHA no país mostram uma grande distância para os países mais desenvolvidos do hemisfério norte. Podemos citar a publicação da série de casos da UNICAMP³⁵ que mostrou uma sobrevida em 30 dias pós TH de 41,02%, enquanto recente coorte multicêntrico americano revelou uma sobrevida de 91% em um ano¹⁴. Estudo francês mostrou tempo médio de espera em fila até a chegada de um órgão de 7,5 horas naquele país para urgências³⁶, muito diferente da realidade brasileira, o que explica, pelo menos inicialmente, um resultado geral ruim nesta situação. Entre os quatro pacientes deste estudo transplantados por FA o tempo médio de espera em fila até a chegada do órgão foi de 37,5 horas; os outros quatro pacientes com IHA inscritos em fila perderam a condição de transplante antes que o órgão estivesse disponível.

Durante a epidemia a secretaria estadual de saúde de MG utilizou a capilaridade dos CIEVS para estabelecer o fluxo de abordagem diagnóstica e terapêutica dos pacientes com suspeita de FA. Há um grande “*know-how*” do sistema público de

saúde brasileiro em abordar doenças infecciosas, e isto ficou mais uma vez comprovado em 2018, quando foi colocado em prática protocolo com a identificação de suspeitos, encaminhamento a centros secundários e terciários baseado em critérios pré-definidos, a disponibilização de testes diagnósticos ao mesmo tempo em que foi realizada vacinação para o público-alvo das mesmas regiões. Dentro deste contexto, os pacientes que apresentaram IHA no início da epidemia sofreram duplamente – com a falta habitual de fluxo para esta condição e com ineditismo de se discutir a indicação de TH na FA. Mais uma vez podemos dizer que era esperado, portanto, um resultado inicial ruim. Com o andamento da epidemia e a ativação da organização estadual, os pacientes com IHA passaram a chegar aos centros transplantadores mais precocemente o que certamente impactou para alguns resultados mais positivos.

O próprio diagnóstico da IHA e a definição de quais seriam os pacientes que se beneficiariam de um TH são enormes desafios na FA. O surgimento de EH clínica é crucial para o diagnóstico de IHA, segundo o Guideline da Associação Européia para Estudo do Fígado (EASL) ¹². No caso da FA com hepatite aguda grave, como diferenciar as manifestações neurológicas da EH de outras causas?

Nesta série de casos, claramente o desenvolvimento de manifestações neurológicas esteve relacionada a mau prognóstico, tendo em vista que 8/10 pacientes com este quadro clínico evoluíram para perda do fígado ou óbito. Na série de casos de FA publicada pelo Hospital Eduardo de Menezes (HEM), referência secundária da epidemia em MG, a encefalopatia grau IV foi um dos fatores de risco independentes preditores de mortalidade na FA ³³. Quando avaliamos as características clínicas em nossa série, chama atenção a velocidade de evolução desde as primeiras manifestações neurológicas de lentificação, sonolência ou flapping até as formas graves com agitação e coma motivando intubação orotraqueal, com uma média de 20 horas (variando de 2-60 horas, mediana de 12h). Houve um paciente cuja primeira manifestação neurológica foi crise convulsiva tônico-clônico generalizada, que tornou-se reentrante motivando intubação e sedação (caso 13); outro que iniciou agitação e insuficiência respiratória, sendo intubado no prazo de 2 horas (caso 4). Apesar de convulsões serem uma exceção como manifestação inicial na EH, a não ser quando existe edema cerebral significativo, na FA elas foram frequentes,

acometendo mais de 25% dos pacientes internados nas séries da USP e do HEM 2; 33; isto motivou inclusive a introdução de anticonvulsivantes de forma profilática em todos os pacientes com EH em ambos os centros. Por outro lado, apenas 2 pacientes na série da USP foram identificados como portadores de edema cerebral (após avaliação por tomografia computadorizada – TC – e exame do nervo óptico); já entre nossos pacientes, apenas um único caso foi documentado. É importante considerar que alguns pacientes se apresentaram graves demais para serem transportados e submetidos a TC; mesmo assim, a disparidade entre a frequência do edema cerebral e a gravidade e velocidade do acometimento neurológico é marcante.

Que outros diagnósticos poderiam ser levantados para explicar o quadro neurológico? Os trabalhos descrevem uma alta incidência de insuficiência renal aguda (IRA) entre os portadores de FA (84% na série da USP) com mais da metade dos pacientes com doença grave necessitando método dialítico (52% na série HEM). Em nossa série todos os pacientes do grupo PFO, de maior gravidade, apresentaram IRA e em algum momento necessitaram diálise. Níveis elevados de ureia podem causar manifestações neurológicas, contribuir para elevação da amônia sérica e predispor crises convulsivas. Entretanto, o trabalho da USP não conseguiu correlacionar os níveis de ureia ou amônia ao desenvolvimento de hipertensão intra-craniana ou crises convulsivas ².

Outra condição frequente entre os pacientes com FA e relacionada a alteração do status mental é a sepse. É conhecida a condição de imunossupressão na IHA ao mesmo tempo em que uma tempestade de citocinas ocorre ¹². Dois pacientes em nossa série apresentaram confusão mental e sonolência e tiveram melhora do quadro após uso de antibióticos; houve positividade de hemoculturas confirmando o diagnóstico de sepse. Um deles chegou a ser inscrito na fila de transplante e removido 48 horas depois com a constatação do diagnóstico de infecção e sua melhora clínica.

Alterações metabólicas como hipoglicemia, hipotensão, acidose e alterações do sódio e do potássio também são condições que podem causar ou contribuir para o quadro neurológico. Merece ainda menção o quadro de *delirium*, síndrome

neuropsiquiátrica comum em pacientes gravemente enfermos internados em terapia intensiva.

Uma última hipótese a ser explorada seria considerar que os sintomas neurológicos possam ser devidos a uma agressão primária ao sistema nervoso central pelo vírus da FA. A infecção em humanos por diferentes flavivírus pode causar síndromes neurológicas graves, através de mecanismos patogênicos que ainda são bastante desconhecidos. O vírus da encefalite japonesa, vírus do oeste do Nilo, vírus da Zika, da dengue e da encefalite transmitida por carrapatos – todos são flavivírus da mesma família do vírus da FA e sabidamente atingem o sistema nervoso central (SNC) por via hematogênica, cruzando a barreira hemato-encefálica³⁷. A ação direta do vírus da FA no cérebro sempre foi considerada insignificante, uma vez que as informações na literatura até então descreviam que o vírus muito raramente penetra o SNC. Esta ausência de neurotropismo do vírus da FA foi notada por Jakob, quando ele descreveu os achados anátomo-patológicos no SNC em 14 pacientes com FA – infiltrado inflamatório linfomononuclear perivascular e meníngeo, reatividade microglial, gliose e perda neuronal³⁸. Stevenson descreveu 34 casos, relatando hemorragia perivascular, infiltrado linfocítico e alterações reacionais na micróglia e astrócitos. Descrições como essas, entretanto, são exceções. A grande maioria dos estudos em neuropatologia da FA estão restritos a raros casos de pessoas vacinadas (cujos achados podem não corresponder exatamente às alterações presentes na infecção pelo vírus da FA selvagem) e a modelos animais.³⁹

Os casos desta série que evoluíram para óbito não foram submetidos a autópsia e isto é uma limitação do estudo para discutir as causas dos sintomas neurológicos nestes pacientes. Em um importante estudo neuropatológico de Frassetto e Rosemberg foi realizada autópsia do encéfalo em coorte caso-controle que incluiu 38 pacientes que foram a óbito por FA na epidemia de 2018 em São Paulo. RT-PCR para o vírus da FA foi positivo no tecido cerebral em 32/38 pacientes, deixando inquestionável a sua presença no SNC. Achados como edema cerebral, hemorragia perivascular, inflamação e/ou hemorragia meníngea estavam presentes em todos os pacientes, tanto nos casos como nos controles. Comparando os achados histopatológicos cerebrais de forma sistematizada com controles selecionados que foram a óbito também por choque

e sepse, poucos achados apresentaram diferença estatística, chamando atenção infiltrado inflamatório perivascular nos pacientes com FA. A ausência de encefalite reforça a impressão de que mecanismos vasculares são os principais responsáveis pelas alterações no SNC, talvez associadas a estimulação do sistema imune pelo vírus da FA.³⁹

Determinar quem pode sobreviver com cuidados de suporte e quem sucumbirá sem transplante de fígado permanece uma zona cinzenta. Sistemas de pontuação prognóstica tentam equilibrar a sensibilidade de identificar pacientes que morrerão sem TH com a especificidade almejada de se evitar um transplante desnecessário. Até o momento as indicações precisas do TH no contexto da FA são desconhecidas, e os critérios clássicos de Clichy-Villejuif e do King's College não foram desenhados para avaliar doenças sistêmicas como essa.

Quando examinamos o intervalo entre o surgimento da icterícia e o desenvolvimento de encefalopatia entre os pacientes do grupo PFO neste trabalho, notamos que em todos os casos ele foi inferior a 07 dias, categorizando a IHA na FA como hiperaguda. A IHA hiperaguda está associada a uma grande agressão hepática em curto prazo, mas onde o potencial de regeneração hepática é maior¹². Apesar de a FA encaixar-se neste grupo, não observamos o mesmo bom prognóstico. Aqui começam os problemas dos critérios do King's College na FA.

No estudo original de O'Grady e colaboradores em 1989 que avaliou fatores prognósticos em pacientes com IHA, o nível sérico de bilirrubina total acima de 17,5 mg/dl apresentava 93% de valor preditivo positivo para identificar os pacientes com risco de óbito, e por esta razão tornou-se ponto de corte entre os critérios menores de King's college⁴⁰. Em nossa série, os portadores de FA atingiram níveis de bilirrubina total inferiores a 7 mg/dl entre os pacientes do grupo PFO no período de surgimento da EH. Níveis mais elevados de bilirrubina foram atingidos pelo grupo MC, ou seja, aqueles que sobreviveram à fase toxêmica, no 20º dia de sintoma (14,66 mg/dl em média). Podemos afirmar que na FA os níveis de bilirrubinas não se correlacionam com o prognóstico e, portanto, não são úteis para a decisão de indicar o TH. Corroborando para esta

impressão, na série da USP, entre 41 pacientes com FA que evoluíram para óbito, a média dos níveis de bilirrubinas foi de 5,85 (4,16 - 8,09 mg/dl)³⁴.

Outra questão muito relevante a ser debatida na análise crítica dos critérios de King's College na FA refere-se à coagulopatia. Os eventos hemorrágicos na FA foram frequentes, inclusive como causa de óbito. Entretanto, aqui mais uma vez, há uma disparidade entre as alterações encontradas nos exames de coagulação e a gravidade do paciente. No trabalho já citado de O'Grady, o TP > 50 s ou RNI \geq 3,5 apresentou alto valor preditivo positivo (97%) de desfecho para óbito, mas com baixa sensibilidade (75%), sendo optado por associar este dado a outros fatores prognósticos de modo a melhorar a performance – três fatores associados têm valor preditivo positivo de 96% e sensibilidade 93%⁴⁰. Quando o TP > 100 s ou RNI \geq 6,5 o valor preditivo positivo e a especificidade foram iguais a 100% no mesmo estudo – deste modo, este critério pôde ser usado sozinho para identificar pacientes de prognóstico muito ruim sem transplante⁴⁰. Em uma metanálise de estudos usando os critérios de King's College, a sensibilidade e especificidade variaram de 68 a 69% e 82 a 92% respectivamente.¹³

Em nossa série, os quatro pacientes que apresentaram RNI > 3,5 evoluíram para óbito, sendo que dois deles chegaram a ser transplantados, o que vai ao encontro desta avaliação de gravidade e mau prognóstico. Chama atenção os demais 4 casos do grupo PFO que mesmo evoluindo de forma desfavorável não apresentaram alteração significativa do RNI e este também não foi um parâmetro útil para indicar transplante. Neste ponto, duas observações críticas devem ser feitas. A primeira diz respeito ao RNI e a segunda à coagulopatia na FA.

É sabido que o RNI foi desenvolvido para monitorar a terapia com warfarina, e não para uma avaliação global da coagulação. Deste modo, ele não é capaz de demonstrar a real magnitude da diátese hemorrágica presente. A síntese de fatores de coagulação na IHA está universalmente reduzida, enquanto o consumo de fatores de coagulação e plaquetas também pode ocorrer. Há estudos demonstrando que mesmo com RNI bastante alterado vários mecanismos compensatórios podem levar a uma coagulação normal que pode

ser confirmada em tromboelastograma. Por outro lado, pacientes podem apresentar sangramentos graves mesmo com RNI's pouco alterados¹².

O segundo ponto refere-se a peculiaridade da coagulopatia na FA. Mesmo em pacientes com RNI baixo as séries de casos na USP e HEM notaram episódios hemorrágicos importantes; notou-se ainda altos níveis de D-dímero, um produto da quebra da fibrina, sugerindo um processo concorrente de consumo. Um estudo experimental com modelo primata e murino demonstrou que na FA a coagulopatia é predominantemente de consumo podendo ocorrer independentemente do grau de agressão hepática.¹⁷

Nossa experiência sugeriu que os pacientes que apresentaram alargamento expressivo do RNI eram de fato muito graves, e para eles a janela terapêutica entre surgir a encefalopatia e conseguir o transplante tornava-se muito estreita. Por outro lado, entre os pacientes com RNI pouco alterado seria necessária outra abordagem para avaliar a gravidade e discutir a indicação de transplante. Neste contexto notou-se a importância da dosagem de fator V.

A dosagem de fator V é utilizada nos critérios de Clichy-Villejuif. Por tratar-se de uma proteína produzida exclusivamente no fígado, há menos fatores envolvidos na sua avaliação⁴¹. Reproduzindo a experiência relatada em outros centros, passamos a sistematicamente utilizar o fator V como parâmetro para indicar transplante e notamos que todos os pacientes do grupo PFO apresentaram severa redução dos níveis de fator V, abaixo de 25%, mesmo aqueles que não apresentaram elevação significativa do RNI.⁴¹ Isto nos permitiu decidir pelo transplante mais precocemente – a única questão passou a ser a exigência de inscrição apenas quando EH estivesse em graus III e IV.

Conforme já discutimos previamente, enquanto aguardávamos uma possível evolução para a encefalopatia grave de modo a preencher os critérios de Clichy-Villejuif, muitos pacientes rapidamente desenvolveram quadros neurológicos graves e faleceram. Acompanhando esta situação estressante, participamos da criação de um critério mais permissivo em conjunto com outros centros credenciados pelo Ministério da Saúde do Brasil, chamado de "*Clichy modificado*", que indicava o procedimento já com níveis iniciais de EH.

Em análise realizada em 2015 pelas equipes de transplante de fígado francesas que reavaliou o desempenho dos critérios de Clichy-Villejuif em 808 pacientes, notou-se sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivos e negativos respectivamente em 69%, 50%, 64% e 55% para IHA não relacionada ao paracetamol. Outros estudos já sugeriram superioridade dos critérios de King's college sobre os de Clichy-Villejuif, mas este trabalho conclui que a performance dos critérios é insatisfatória e precisa ser melhorada. ³⁶.

Se para os critérios tradicionais há críticas, os critérios de “Clichy-Villejuif modificado” não foram sequer validados. Eles são fruto da vivência estressante da epidemia, em que pacientes eram admitidos e morriam diariamente nos vários centros transplantadores envolvidos, que buscavam tomar decisões baseadas na própria experiência e na literatura publicada com outras doenças somadas à vivência do momento, visto que aquele enfrentamento era, de fato, totalmente inédito. Não é possível analisar estatisticamente o desempenho dos critérios utilizados em função do pequeno número de pacientes. Não foi publicado um compilado nacional com os casos de transplante em FA – apenas publicações isoladas com as experiências de alguns centros. Este estudo apresenta a segunda maior casuística de pacientes transplantados por FA, com 4 pacientes, atrás apenas da USP, que realizou 9 transplantes em 7 pacientes (2 re-transplantes)⁴². Entretanto, apresentamos a melhor sobrevida já descrita, com 50% dos pacientes transplantados permanecendo vivos e com boas condições 5 anos pós-TH. Baseado em informações coletadas junto aos demais centros transplantadores, 30 TH por FA foram realizados no Brasil e apenas 6 pacientes sobreviveram – 3 deles na USP, 1 no Rio de Janeiro (segundo publicação do Hospital Quinta D´Or)⁴³, além dos 2 pacientes deste trabalho.

Este resultado desanimador da experiência brasileira se repete a nível estadual em MG: 07 pacientes transplantados em 04 hospitais diferentes, sobrevivendo apenas os 02 do HFR, único entre eles que realizou mais de um transplante no contexto da FA. Também neste caso não houve publicação oficial destes dados compilados.

Entre as estratégias que podem impactar em melhoria destes resultados cabe inicialmente discutir a organização do fluxo dos pacientes até sua avaliação

pelas equipes transplantadoras. Durante a epidemia a estrutura dos CIEVS funcionou bem para identificar suspeitos de FA e encaminhar aos vários centros de referência, e neste sentido ajudou a identificar nos pontos distantes pacientes que poderiam precisar de TH. Entretanto, esta estrutura não foi criada nem calibrada para este objetivo, além de ter sido totalmente desmobilizada ao final da epidemia. Atualmente voltou-se à “estaca zero” quanto à organização estadual de encaminhamento destes pacientes com potencial muito grave. Seria necessário que o governo estadual se responsabilizasse em estabelecer de forma definitiva um fluxograma. Ele deveria orientar para que em qualquer ponto do estado de MG as equipes médicas soubessem contactar centros transplantadores para discutir e encaminhar com agilidade os pacientes que potencialmente necessitarão de transplante de emergência, inclusive disponibilizando meios de transporte equipados para este fim.

O outro ponto importante, após a inscrição em fila, é conseguir um órgão. Ao contrário dos países mais desenvolvidos, a espera na fila, mesmo na emergência, segue mais de seis vezes maior no Brasil. Para isso é preciso um trabalho a longo prazo de conscientização da população, redução dos índices de recusa de doação, estruturação dos hospitais para diagnóstico de morte encefálica e manutenção dos doadores.

Sendo assim, para os pacientes graves inscritos em fila em um local onde a espera será longa, todos os procedimentos que sejam capazes de retardar a evolução da doença podem ser úteis. Os sistemas de “diálise hepática”, como *MARS* ou *Prometheus®*, não estão disponíveis em nossa realidade. A plasmaférese, que possui evidências científicas robustas, foi utilizada em vários hospitais nesta epidemia, trazendo uma impressão de resposta clínica. Em nossa série apenas dois pacientes foram tratados, sendo que um deles já encontrava-se com quadro clínico dramático no momento da aférese, evoluindo para óbito precoce, o que não nos permite avaliar qualquer impacto do procedimento. Deste modo, apenas um paciente desta série (caso 14) submetido a plasmaférese pode ter seu desfecho clínico avaliado. Além de se tratar de apenas um caso, temos ainda outras limitações de análise: ele foi submetido a plasmaférese convencional e não a de alto volume, ainda que o intervalo entre as sessões tenha sido propositalmente encurtado para permitir uma troca de

maior volume em curto prazo. De todo modo, há evidências científicas de impacto sobre a sobrevida mesmo nesta modalidade de aférese¹⁹. Este paciente evoluiu de forma diferente em relação a todos os outros: maior intervalo de tempo até desenvolver encefalopatia (D9 de sintomas, quando foi inscrito na fila) e maior intervalo de tempo entre a primeira manifestação neurológica até EH grau IV, quando foi intubado (60 horas). Isto foi determinante para que ele recebesse um órgão em tempo hábil, e evoluísse de forma favorável.

O outro elemento terapêutico utilizado por este paciente (caso 14) que também pode ter impactado nesta evolução é o sofosbuvir. Ele foi utilizado extensamente durante a epidemia em vários serviços como a USP e o HEM, e um estudo controlado foi também conduzido, mas seus resultados ainda não foram publicados²⁶. Em nossa série, apenas três pacientes foram tratados com este medicamento – e dois deles foram submetidos a transplante e sobreviveram (caso 8 e caso 14); o terceiro faleceu precocemente (caso 13).

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a documentar a recidiva do vírus da FA sobre o enxerto hepático após o TH em pacientes que sobreviveram ao transplante. Na série de casos de autópsia da USP, os quatro pacientes que evoluíram para óbito pós-TH foram examinados e foram identificadas lesões típicas de agressão pelo vírus da FA nos enxertos em todos os casos, com imuno-histoquímica (IHQ) confirmando antígenos virais em 3/4 deles, além de PCR RNA positivo em todos⁴². Em nosso estudo também tivemos estes achados típicos nas biopsias *post-mortem* dos enxertos dos dois pacientes que faleceram; entretanto, pudemos biopsiar dois dos quatro pacientes no 2º dia pós-operatório por ocasião de uma re-abordagem cirúrgica, o que permitiu descrições inéditas.

Nosso estudo sugere que a infecção do enxerto pelo vírus da FA é possivelmente universal, como já é conhecido a respeito do vírus C, que também é um flavivírus. A intensidade das lesões pode estar relacionada à mortalidade pós-TH. A carga viral foi reconhecida como fator preditor de mortalidade³⁴ e ela não foi quantificada em nossos pacientes; entretanto, considerando uma avaliação semiquantitativa da IHQ que marcou as partículas virais e comparando os dois casos biopsiados *in vivo*, identificamos uma lesão histológica muito mais grave no enxerto do paciente que apresenta uma grande quantidade de vírus no fígado

– e o desfecho deste paciente foi a evolução para óbito. Enquanto isso, o outro paciente que apresentou pequena quantidade de vírus identificada à IHQ tem lesões discretas no fígado, ainda que típicas da FA, e ele sobreviveu.

Que fatores poderiam ter levado a esta diferença tão impactante revelada pela análise das lâminas? Não temos elementos para responder e não podemos extrapolar o que vimos nestes dois casos como uma realidade universal, mas várias questões são levantadas e merecem atenção em novos estudos: o fator determinante seria a carga viral prévia ao TH? Considerando que ambos receberam a mesma imunossupressão, haveria uma diferença individual na resposta imune ao vírus? Há um elemento marcante que diferencia os dois casos: o uso do sofosbuvir pelo paciente que sobreviveu. Seria o sofosbuvir algo determinante para reduzir a carga viral e assim impactar sobre a agressão na recidiva ao enxerto?

A análise da microscopia eletrônica de transmissão também trouxe achados inéditos, com destaque para a grande quantidade de gotículas lipídicas e as alterações mitocondriais. Sabidamente o infiltrado inflamatório presente na agressão pela FA é discreto e o principal mecanismo de morte celular induzido pelo vírus é a apoptose⁴⁴. Estas alterações identificadas na microscopia eletrônica já haviam sido previamente relacionadas a alterações do sinal de cálcio mitocondrial nos hepatócitos⁴⁵, e por esta, razão foram realizados estudos aprofundados no material destes mesmos pacientes para pesquisar a expressão dos receptores específicos de cálcio. Foram também realizados ensaios em modelo experimental murino³². É sabido que o hepatócito normalmente apresenta expressão das isoformas ITPR1 e ITPR2 de receptores de sinal de cálcio; de forma inesperada, durante a infecção pela FA identificou-se uma expressão muito aumentada da isoforma ITPR3 nos hepatócitos, tanto nos explantes quanto nos enxertos. Esta nova expressão foi associada a aumento nuclear da sinalização de cálcio e proliferação hepatocitária, culminando em redução da esteatose e da morte celular induzida pelo vírus da FA³². Deste modo, o estudo derivado dos achados descritivos deste trabalho identificou um mecanismo protetivo endógeno que pode sugerir uma abordagem para tratar indivíduos infectados antes que eles evoluam para falência hepática (ANEXO D).

A casuística descrita nos parágrafos acima refere-se aos primeiros transplantes de fígado realizados no contexto da IHA por FA no mundo e grande foi o debate durante e após a epidemia se o TH era de fato uma opção terapêutica adequada para estes pacientes. Este debate permeou infectologistas que já estudam a FA há muito tempo e chegou aos hepatologistas e cirurgiões transplantadores. Trata-se de uma discussão difícil em função dos dados científicos insuficientes, mas que precisa ser travada considerando que a FA é um problema crônico e recidivante. Temos nesta série elementos novos e relevantes que permitem mais levantar questões do que definir respostas.

Os resultados da casuística do TH na FA acendem um sinal vermelho – apenas 21% dos pacientes sobreviveram. Entretanto, podemos observar que à medida em que os dias da epidemia foram transcorrendo, a experiência acumulada das equipes, a coordenação do sistema de saúde e a comunicação entre estes atores foi capaz de produzir efeitos que de fato impactaram no cuidado destes doentes: critérios mais precoces e homogêneos de indicação de transplante baseados no fator V, associados a fluxos melhor estabelecidos de encaminhamento aos centros transplantadores, a associação de outros elementos com potencial impacto na evolução da doença, como o sofosbuvir e a plasmaférese, a melhoria no manejo perioperatório com correção agressiva da coagulopatia, ajustes na antibioticoprofilaxia e suportes intensivo adequados. Todos estes fatores contribuíram para melhoria de resultados, e temos a clara impressão de que os últimos casos colheram os frutos desta evolução.

Algumas afirmações podem ser feitas: os critérios de King's College e de Clichy-Villejuif não se prestam à indicação de transplante na FA. Os critérios de Clichy-Villejuif modificados estão na direção certa e precisam ser validados. A impressão gerada por esta série de casos é de que a coagulopatia é um preditor de mortalidade precoce diretamente relacionado à insuficiência hepática; nossos pacientes do grupo PFO apresentaram todos fator V menor que 25%, o que nos faz imaginar que talvez o corte de 50% escolhido aleatoriamente para o critério modificado seja excessivamente permissivo.

A avaliação retrospectiva de 3300 pacientes com IHA revelou que as apresentações hiperagudas consistem em coagulopatia grave, aumento muito

expressivo de transaminases e inicialmente uma alteração apenas moderada, se ocorrer, dos níveis de bilirrubinas⁴⁶. Este é exatamente o quadro típico da FA que encontramos e aparentemente ele não é tão diferente do que é encontrado em outras etiologias. O que parece especialmente diferente na FA é a velocidade com que o paciente perde condições de tratamento após ter desenvolvido quadro neurológico e o prognóstico muito ruim, ao contrário do esperado em um quadro hiperagudo. Por esta razão, parece especialmente lógico e necessário a adaptação dos critérios para a indicação do transplante: utilizar a coagulopatia como marco de gravidade, sendo o fator V claramente mais sensível com alteração mais precoce, e relativizar a importância da encefalopatia.

A encefalopatia hepática faz parte do diagnóstico de IHA desde as definições originais, nos anos 1970, por Trey e Davidson¹³. A maioria das definições mais modernas de IHA buscam quantificar o intervalo entre o surgimento de sintomas e o desenvolvimento de encefalopatia e a gravidade da lesão hepática pelo grau da coagulopatia¹². Entretanto, não existe consenso sobre qual seria o grau de coagulopatia ou encefalopatia que marca a transição de lesão hepática para falência franca.

Propostas recentes sugerem que um contexto clínico apropriado permitiria a inscrição como super urgência mesmo sem a presença de encefalopatia clinicamente manifesta¹². Estas propostas têm sido levantadas especialmente para IHA subaguda, mas a experiência na epidemia de FA nos compele a travar também neste contexto o mesmo debate. Por um lado, a encefalopatia está claramente associada a mau prognóstico em todas as séries que descrevem a FA, mas por outro o seu desenvolvimento está associado a uma janela terapêutica muito curta e ela apresenta características peculiares que nos fazem suspeitar de que nem sempre esteja associada à insuficiência hepática. Sendo assim foi, em nossa impressão, um grande acerto o critério modificado ter tolerado graus mais precoces de encefalopatia. Talvez o prognóstico quanto à recuperação hepática na FA seja definido por critérios virológicos como a carga viral e de agressão hepática como o pico de transaminases e níveis de fator V, antes mesmo que surjam as manifestações neurológicas. No coorte observacional da USP/Instituto Emílio Ribas o valor de corte de carga viral de 5.1 log₁₀ cópias/ml foi preditor de mortalidade³⁴. Obviamente estas respostas

estarão em estudos futuros, que devem ser desenhados com base nas experiências colhidas em estudos como este.

A decisão de incorporar uma doença ao *rol* de indicações de transplante deve considerar a sobrevida pós transplante, a sobrevida sem transplante, a ausência de outras terapêuticas e, é claro, a disponibilidade de órgãos e a situação da fila. Considerando esta soma de fatores, é difícil defender a indicação da IHA na FA para TH. Além do resultado de sobrevida muito ruim, a fila de espera no Brasil é muito grande, e aumentou ainda mais no contexto da pandemia de COVID-19.

Por outro lado, a mortalidade sem transplante dos pacientes na IHA por FA é próxima de 100% e não há outra terapêutica disponível. E nitidamente as equipes transplantadoras foram capazes de aprender com a epidemia e podem, sim, melhorar seus resultados. Não nos parece aleatório o fato de que os melhores resultados do transplante na FA ocorreram nos centros que realizaram um maior número de procedimentos – houve, de fato, aprendizado durante o processo. Os dados que possuímos sugerem que os pacientes que sobreviveram provavelmente não estariam vivos sem o transplante.

Nesta publicação de 2013 em que John G. O’Grady reavaliou a experiência do King’s College na IHA, ele escreveu que *“nossa interpretação destes dados é de que medidas de saúde pública, encaminhamento mais precoce dos pacientes, maior sofisticação dos cuidados em terapia intensiva e a maturação do transplante de fígado como intervenção terapêutica provavelmente contribuíram para mudanças no prognóstico da IHA”*.⁴⁶ Este trabalho aqui descrito, que coletou dados dramáticos em um curto período de tempo – os dias da epidemia de 2018 – nos sugere estas mesmas impressões, o que talvez signifique que possamos conseguir melhores resultados futuramente.

O processo de tomada de decisão na prática clínica é a mecânica aplicada pelo médico de modo a resolver um problema com base no seu conhecimento prático e teórico⁴⁷. Na medicina atual, é rotineiro desprezar as habilidades intelectuais do médico em detrimento aos grandes estudos randomizados, às diretrizes e à medicina baseada em evidências (MBE)⁴⁷. E quando não existem evidências científicas publicadas para o tratamento da condição clínica que está sendo enfrentada, como se comporta o médico?

Nunca houve na história tamanha abundância de informação científica, assim como jamais ela esteve tão disponível a todos os profissionais. Estes fatos vêm naturalmente associados à supervalorização do dado científico e com isso à exigência extrema da atualização a cada minuto. Mas quando o dado científico específico ainda não existe, o médico segue sendo obrigado a tomar decisões, como é da natureza de sua profissão – e neste momento se o médico desconhece como são tomadas as decisões clínicas, aparentemente a ignorância iguala a todos – bons e maus médicos, ou até mesmo leigos. Afinal de contas, todos eles têm “opinião” a dar e as plataformas digitais são palcos potentes que amplificam todos os tipos de vozes.

O enfrentamento a esta epidemia de FA, assim como foi o da pandemia de COVID-19 – neste caso em proporções mundiais – exacerbam estes fenômenos e colocam o médico em um dilema extremo de angústia que desafia a sua formação e seus valores.

O processo de tomada de decisão na prática clínica e o pensamento médico têm sido pouco discutidos e valorizados no ensino da medicina nas universidades. A tomada de decisão é vista como intuitiva; fato que obviamente simplifica uma prática tão complexa e nobre como a medicina. É de extrema importância para a classe médica adquirir uma autoconsciência de sua prática a fim de detectar os erros que a leva ser alvo de processos pelos pacientes e para que se ofereça um melhor serviço à sociedade⁴⁷. O médico deverá ser um estrategista baseado na teoria e na experiência, levando-se em conta que não há paciente igual ao outro⁴⁷. Mas é essencial que não se perca a visão de que o objeto principal do médico em todo este processo sempre foi e sempre será o mesmo ao longo dos tempos: ajudar o seu paciente.

Este estudo descreve a experiência clínico-cirúrgica no enfrentamento da epidemia, com um nível de evidência científica segundo a MBE baixo⁴⁸. Diante da ausência de estudos de maior força metodológica, este estudo busca cumprir com a sua obrigação de registrar a experiência vivida com a FA sob a ótica da hepatologia e do transplante e somar-se aos outros trabalhos já publicados neste contexto.

6 – CONCLUSÕES

Os resultados da experiência relatada nesse estudo apresentam informações inéditas que serão destacadas, assim como aquelas que corroboram as de outras experiências relatadas em estudos realizados durante a epidemia de FA no Brasil:

- os critérios tradicionais de indicação de TH – King’s College e Clichy-Villejuif – não se aplicam à IHA na FA por dois motivos principais: o RNI, os níveis de bilirrubinas e o intervalo icterícia-EH não foram capazes de prognosticar a gravidade da doença hepática em muitos casos; e quando os critérios foram preenchidos para inscrição em fila, a janela terapêutica para a realização do TH era muito curta tornando o procedimento inviável;
- a dosagem de fator V foi capaz de identificar pacientes com IHA com mais precocidade e foi determinante para permitir a realização do TH na FA;
- as manifestações neurológicas na IHA por FA foram preditoras de mortalidade mas apresentaram características peculiares, levantando a questão sobre outros mecanismos fisiopatológicos além da disfunção hepática e, também, quanto à sua real utilidade para a indicação de TH;
- os critérios desenvolvidos durante a epidemia – “Clichy modificado” – não foram validados, mas acertaram ao valorizar a coagulopatia através do fator V e relativizar a encefalopatia aceitando quadros iniciais;
- a coagulopatia na FA é multifatorial, independe da IHA e não é adequadamente avaliada por exames laboratoriais convencionais, sendo essencial o uso da tromboelastografia para guiar sua correção, o que teve impacto para um melhor resultado no TH;
- a reinfecção do enxerto hepático pelos vírus da FA é aparentemente universal, e em nossos achados uma maior quantidade de vírus no enxerto estava relacionada a uma lesão hepática mais grave e ao desfecho para óbito;
- a plasmaférese é uma terapêutica validada na IHA e pode ter impactado a evolução de um paciente, retardando complicações e permitindo a realização do TH em tempo hábil;

- o sofosbuvir possui ação farmacológica conhecida sobre o vírus da FA, boa tolerância, e foi utilizado pelos dois pacientes que sobreviveram ao TH nesta série, o que pode estar relacionado com sua capacidade em reduzir a carga viral e impactar sobre o prognóstico;
- visando melhorar os resultados do TH na IHA é necessária uma organização do sistema de saúde estadual para encaminhamento precoce dos casos para os centros transplantadores de modo a permitir a avaliação especializada e inscrição em lista em tempo hábil.

Finalmente, a conclusão mais clara quando se vive a experiência de lidar com pacientes graves em uma epidemia de uma doença infecciosa de alta letalidade e com arsenal terapêutico limitado para seu enfrentamento é de que devemos preveni-la com o desenvolvimento de uma vacina. Quando a doença já possui vacina eficaz e segura desenvolvida há décadas, cabe discutir as falhas de vacinação junto ao poder público e à população que levaram ao surgimento desta epidemia. Não há estratégia de enfrentamento à FA mais eficaz e custo-efetiva que a vacinação. A ignorância e a desinformação a seu respeito são capazes de ceifar vidas. Como escreveu o autor Nicolau Sevcenko em seu livro sobre a Revolta da Vacina, ocorrida no Rio de Janeiro em 1904, *“nunca se contaram os mortos da Revolta da Vacina e nem seria possível, pois muitos foram morrer bem longe do palco dos acontecimentos”*⁴⁹.

Lista de FIGURAS e TABELAS

Tabela 1 – Número de casos e óbitos por FA silvestre no estado de Minas Gerais nos anos de 1989 a 2021 – período de monitoramento de julho a junho. ¹⁰

Período	Evolução		Total
	<i>Cura</i>	<i>Óbito</i>	
1989	5	2	7
1994	2	1	3
2000	0	2	2
2001	16	16	32
2002	4	2	6
2003	37	21	58
2008	1	0	1
2009	1	0	1
2016/2017	313	162	475
2017/2018	353	178	531
2019	0	0	0
2020	0	0	0
2021	0	0	0
Total	732	384	1116

Tabela 2 – Critérios para indicação do transplante hepático na insuficiência hepática aguda de acordo com a Portaria 2600 de 21/10/2009²⁹

Clichy-Villejuif	Encefalopatia III ou IV e:	
	Fator V <30%, se > 30 anos ou Fator V <20%, se < 30 anos	
King's College	Paracetamol	Não - Paracetamol
	Ph < 7,3 (independente do grau de encefalopatia) ou; TP>100 s ou INR >6,5 + creat >3,4 mg/dl + encefalopatia grau III ou IV	TP maior que 100 segundos ou INR >6,5 (independente do grau de encefalopatia) ou Três das seguintes variáveis: I - idade menor que 10 ou maior que 40 anos. II - causas: halotano, hepatite de outra etiologia que os vírus A ou B, reações farmacológicas idiossincrásicas. III - duração da icterícia maior que 7 dias antes do início da encefalopatia. IV - PT maior que 50 segundos, INR >3,5; e V - concentração sérica de bilirrubina >17,5 mg/dL

Ph: potencial hidrogeniônico; TP: tempo de protrombina; INR: *International normalized ratio*; mg/dL: miligrama por decilitro

Tabela 4 – Fluxo de comunicação entre a CENTRAL NACIONAL DE TRANSPLANTES - CNT e as Centrais Estaduais de Transplantes - CET para a submissão de casos para avaliação do Ministério da Saúde³⁰

Os pedidos de avaliação de inscrição em lista de espera e priorização para transplante de fígado, relativos a casos de Insuficiência Hepática Hiperaguda relacionada à Febre Amarela (IHHFA) deverão obedecer ao fluxo abaixo descrito, para análise pelo Ministério da Saúde:

1. As equipes médicas enviarão o formulário de submissão de casos (anexo I) preenchido com o máximo possível das informações, para a respectiva Central de Transplantes (CET demandante). Além do formulário, o pedido deve conter relatório médico detalhado com o histórico da doença e outras informações relevantes, além de resultados de exames disponíveis;

2. A CET demandante verificará se constam todos os requisitos do item 1, e enviará o pedido de avaliação para a Central Nacional de Transplantes (CNT), por meio dos seguintes endereços eletrônicos (a qualquer hora do dia, em qualquer dia da semana):

Campo para: cnncco@saude.gov.br

Campo com cópia: snt@saude.gov.br

3. A CET demandante comunicará à CNT por telefone o envio do e-mail;

4. A CNT confirmará, também por e-mail, para a CET demandante o recebimento do e-mail com o pedido;

5. A CNT enviará o pedido de avaliação, juntamente com os anexos, para os componentes do GT – FA, por meio de seus endereços eletrônicos (e-mail);

6. Os componentes do GT – FA terão um prazo máximo de DUAS HORAS para responder por e-mail de forma compartilhada ("responder a todos") para a CNT deixando claro o seu parecer FAVORÁVEL ou DESFAVORÁVEL à solicitação;

7. Cumprido o prazo, a CNT fará a consolidação das respostas imediatamente após a chegada do último parecer (respeitando o critério da maioria simples), enviará a resposta com o DEFERIMENTO ou o INDEFERIMENTO por e-mail para a CET demandante, e em seguida formalizará o teor do e-mail em ofício à CET demandante, que homologará a inscrição e tomará as providências para sua inserção nos sistemas de informação do MS (SIG SNT ou SIG SP)

8. Após enviar a resposta por e-mail à CET demandante, o plantonista da CNT fará a confirmação do recebimento da resposta por telefone. A CET demandante deve confirmar, também por e-mail, o recebimento do parecer, para o devido registro;

9. As CET e a CNT manterão registros de todos os casos enviados/recebidos e respondidos de acordo com seus processos de trabalho, bem como coletarão e consolidarão informações diárias sobre a evolução dos pacientes listados e dos pacientes transplantados.

ANEXO III - HOSPITAIS DE REFERÊNCIA PARA ATENDIMENTO DA FEBRE AMARELA NA FORMA MODERADA (GRUPO B) E FORMA GRAVE (GRUPO C)

REGIÃO AMPLIADA DE SAÚDE	UNIDADE REGIONAL DE SAÚDE	PRESEÇA SAMU REGIONAL		HOSPITAIS DE REFERÊNCIA PARA PACIENTES DOS GRUPOS B e C	HOSPITAIS DE REFERÊNCIA PARA PACIENTES GESTANTES
		SIM	NÃO		
TRIANGULO NORTE	UBERLANDIA E ITUIUTABA		X	UFTM	HOSPITAL DAS CLÍNICAS DE UBERLÂNDIA (UFUB)
TRIANGULO SUL	UBERABA		X	UFTM	UFTM
NOROESTE	PATOS DE MINAS, UNAI		X	UFTM (UBERABA)	HOSPITAL REGIONAL ANTÔNIO DIAS
SUL	POUSO ALEGRE, VARGINHA	X		SAMUEL LIBÂNIO, HOSPITAL SANTA LÚCIA (POÇOS DE CALDAS)	HOSPITAL SAMUEL LIBÂNIO
	ALFENAS	X		ALZIRA VELANO	SANTA CASA DE PASSOS
	PASSOS	X		SANTA CASA DE PASSOS	
CENTRO	BH, ITABIRA E SETE LAGOAS		X	HOSP EDUARDO DE MENEZES, HOSP M DR CÉLIO DE CASTRO	1ª) MATERNIDADE ODETE VALADARES 2ª) HOSPITAL JÚLIA KUBITSCHKE
CENTRO SUL	BARBACENA, SÃO JOÃO DEL REY	X		HOSP. REGIONAL DE BARBACENA	SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE BARBACENA
LESTE DO SUL	MANHUMIRIM		X	CÉSAR LEITE	HOSPITAL SÃO SEBASTIÃO HOSPITAL CÉSAR LEITE
LESTE DO SUL	PONTE NOVA		X	ARNALDO GAVAZZA	HOSPITAL SÃO SEBASTIÃO
SUDESTE	JUIZ DE FORA, LEOPOLDINA	X		JOÃO PENIDO HUJF	JOÃO PENIDO
	UBÁ	X		HOSPITAL SÃO VICENTE DE PAULO	
LESTE	CORONEL FABRICIANO E GOVAL		X	MÁRCIO CUNHA	HOSPITAL MUNICIPAL DE GOVERNADOR VALADARES
NORDESTE	TEOFILO OTONI, PEDRA AZUL			SANTA ROSÁLIA	SANTA ROSÁLIA
NORTE	MONTES CLAROS, JANUARIA E PIRAPORA	X		HU CLEMENTE DE FARIA	HU CLEMENTE DE FARIA
OESTE	DIVINÓPOLIS	X		HOSP EDUARDO DE MENEZES, HOSP M DR CÉLIO DE CASTRO	HOSPITAL SÃO JOÃO DE DEUS
JEQUITINHONHA	DIAMANTINA			SANTA CASA DE DIAMANTINA	HOSPITAL NOSSA SENHORA DA SAÚDE

Figura 8 – Hospitais de Referência para atendimento da febre amarela na forma moderada (GRUPO B) e forma grave (GRUPO C) no estado de MG segundo a Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (09/02/2018)⁵⁰

Tabela 5 – Orientações para coleta e transporte de material para diagnóstico laboratorial de FA segundo o Manual de Manejo Clínico da Febre Amarela da SES-MG (27/01/2017)²⁸

Exame	Tipo de Amostra	Volume/Quantidade	Período de coleta	Acondicionamento	Transporte
Sorologia	Soro	3 ml	A partir do 6º dia de sinto-mas	Refrigerado (2 a 8 °C)	Caixa térmica com gelo reciclável ou gelo seco
Isolamento viral e RT-PCR	Soro	3 ml	Do 1º ao 5º dia após o início dos sintomas	Congelado a -20 °C no período por até 48 horas após a coleta. Após 48 horas da coleta é obrigatória a conservação em freezer - 80°C ou botijão de nitrogênio.	Caixa térmica com gelo reciclável ou gelo seco no dia da coleta. Acondicionado em botijão de nitrogênio para envio posterior.
Isolamento viral e RT-PCR	Vísceras in natura (fígado e baço)	Fragmento de 1cm ³	Deverá ser realizada o mais rápido possível (no máximo 24 horas após o óbito)	Congelado a -20 °C por até 48 horas após a coleta. Após este período é obrigatória a conservação em freezer - 80°C ou botijão de nitrogênio.	Caixa térmica com gelo reciclável ou gelo seco no dia da coleta. Acondicionado em botijão de nitrogênio para envio posterior.
Histopatológico – Imuno-histoquímica (coleta pós-mortem)	Vísceras Em formalina tamponada 10% (Fígado, baço)	Fragmentos de 1cm ³	Deverá ser realizada o mais rápido possível (no máximo 24 horas após o óbito)	Colocar os fragmentos de vísceras separadamente em frasco estéril identificado com o nome do paciente e o tipo de fragmento com tampa de rosca contendo formalina tamponada. Conservar em temperatura ambiente.	Colocar os frascos em caixa térmica sem gelo (temperatura ambiente)

Tabela 6 – Protocolo para realização de plasmaferese em pacientes com IHA no Hospital Felício Rocho

Equipamentos:

Serão empregados separadores celulares de fluxo contínuo ou descontínuo disponíveis no Serviço de Hemoterapia.

Exames laboratoriais:

Antes de se iniciar a sequência dos procedimentos, deve ser coletado hemograma com contagem de plaquetas, cálcio sérico, albumina, coagulograma, fibrinogênio, TGO, TGP, Bilirrubinas. Estes mesmos exames deverão ser realizados novamente entre 12 e 24 h após o término para controle pós.

Plasmaférese Terapêutica:

Volume a ser retirado e volume a ser processado:

Será processada, em cada sessão, a quantidade de volume sanguíneo necessária para a troca de plasma correspondente a 10% do peso ideal do paciente.

Soluções de substituição:

O fluido de reposição será composto por Plasma Fresco Congelado (PFC) no mesmo volume de plasma retirado simultaneamente.

Anticoagulação:

Em virtude da reposição com PFC, que já é citratado, a proporção de citrato ácido dextrose (ACD) : sangue total deverá ser iniciado com 1/16 e diminuindo gradativamente, chegando a 1/20 na metade do procedimento, mantendo essa proporção até o seu final.

Deverá ser realizada de rotina a reposição de cálcio durante o procedimento, da seguinte maneira: SF 0,9% - 100 ml com 1 ampola de Gluconato de Cálcio 10% (10 ml) OU Cloreto de Cálcio 10% (3,3 ml), infusão contínua pela via de reinfusão, a cada litro de plasma infundido. Por exemplo, quando trocamos 7 litros em um paciente de 70 Kg, faremos 700 ml da solução.

Número e periodicidade:

Serão realizadas até 3 (três) sessões em dias consecutivos. As sessões serão suspensas se houver reversão do quadro de insuficiência hepática ou com a indicação premente do transplante hepático.

Resposta clínica:

A resposta ao procedimento deverá ser avaliada clínica e laboratorialmente, quando será caracterizada a efetividade ou a refratariedade.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BENCHIMOL, J. Febre Amarela: a doença e a vacina, uma história inacabada. ISBN 85-85676-98-1, Rio de Janeiro, 2001. Disponível em: < <https://static.scielo.org/scielobooks/4nktq/pdf/benchimol-9788575413951.pdf> >.
- 2 YL, H. et al. Severe yellow fever in Brazil: clinical characteristics and management. **Journal of travel medicine**, v. 26, n. 5, 06/11/2019 2019. ISSN 1708-8305. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31150098> >.
- 3 JP, C.; A, C. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. **The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 24, 08/25/2018 2018. ISSN 1678-9199. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30158957> >.
- 4 MS, F. Yellow Fever. **Annals of hepatology**, v. 18, n. 6, 2019 Nov-Dec 2019. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31735348> >.
- 5 P, D. O. F. et al. Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016-2019: Challenges, Lessons Learned, and Perspectives. **Viruses**, v. 12, n. 11, 10/30/2020 2020. ISSN 1999-4915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33143114> >.
- 6 MN, L.; CTG, N.; MIBF, L. Yellow fever. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 64, n. 2, 2018 Feb 2018. ISSN 1806-9282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29641667> >.
- 7 M, G. et al. Yellow Fever Virus Reemergence and Spread in Southeast Brazil, 2016-2019. **Journal of virology**, v. 94, n. 1, 12/12/2019 2019. ISSN 1098-5514. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31597773> >.
- 8 SAÚDE, M. D. Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela. 2018. Disponível em: < <https://sbim.org.br/images/files/informe-fa-21-11abr18-c.pdf> >.
- 9 ATW, S. et al. Liver Transplantation for Fulminant Hepatitis Attributed to Yellow Fever. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 69, n. 3, 2019 Mar 2019. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30218577> >.
- 10 SAÚDE, S. D. E. D. S. D. M. G.-S. D. V. E. P. À. Boletim Epidemiológico Especial - Febre Amarela em MG. 2018.
- 11 TP, M. Yellow fever: an update. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 1, 2001 Aug 2001. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11871403> >.

- 12 WENDON, J. et al. EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. **Journal of hepatology**, v. 66, n. 5, 2017 May 2017. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28417882> >.
- 13 WILLIAM M. LEE, A. M. E. A. AASLD Position Paper: The Management of Acute Liver Failure: Update 2011. 2011.
- 14 CJ, K. et al. Outcomes of patients with acute liver failure listed for liver transplantation: A multicenter prospective cohort analysis. **Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society**, v. 29, n. 3, 03/01/2023 2023. ISSN 1527-6473. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35980605> >.
- 15 RT, S. et al. Coagulopathy, Bleeding Events, and Outcome According to Rotational Thromboelastometry in Patients With Acute Liver Injury/Failure. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 74, n. 2, 2021 Aug 2021. ISSN 1527-3350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33636020> >.
- 16 SV, M. Clinical Utility of Viscoelastic Tests of Coagulation (TEG/ROTEM) in Patients with Liver Disease and during Liver Transplantation. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 41, n. 5, 2015 Jul 2015. ISSN 1098-9064. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26049072> >.
- 17 AL, B. et al. Consumptive coagulopathy of severe yellow fever occurs independently of hepatocellular tropism and massive hepatic injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 51, 12/22/2020 2020. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33268494> >.
- 18 J, S. et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice-Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Seventh Special Issue. **Journal of clinical apheresis**, v. 31, n. 3, 2016 Jun 2016. ISSN 1098-1101. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27322218> >.
- 19 L, C.-S. et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice - Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Ninth Special Issue. **Journal of clinical apheresis**, v. 38, n. 2, 2023 Apr 2023. ISSN 1098-1101. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37017433> >.
- 20 FS, L. et al. High-volume plasma exchange in patients with acute liver failure: An open randomised controlled trial. **Journal of hepatology**, v. 64, n. 1, 2016 Jan 2016. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26325537> >.
- 21 R, M. et al. Standard-Volume Plasma Exchange Improves Outcomes in Patients With Acute Liver Failure: A Randomized Controlled Trial. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological**

- Association**, v. 20, n. 4, 2022 Apr 2022. ISSN 1542-7714. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33524593> >.
- ²² JG, J. Experimental therapies for yellow fever. **Antiviral research**, v. 97, n. 2, 2013 Feb 2013. ISSN 1872-9096. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237991> >.
- ²³ E, M. et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 8, 2012 Aug 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22535622> >.
- ²⁴ CS, D. F. et al. Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 1, 01/30/2019 2019. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30699122> >.
- ²⁵ ÉA, M. et al. Sofosbuvir inhibits yellow fever virus in vitro and in patients with acute liver failure. **Annals of hepatology**, v. 18, n. 6, 2019 Nov-Dec 2019. ISSN 1665-2681. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31594756> >.
- ²⁶ C, F.-M. et al. Efficacy of sofosbuvir as treatment for yellow fever: protocol for a randomised controlled trial in Brazil (SOFFA study). **BMJ open**, v. 9, n. 11, 11/25/2019 2019. ISSN 2044-6055. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31772079> >.
- ²⁷ IM, R. et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 6, 06/04/2018 2018. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29864115> >.
- ²⁸ TRANSMISSIVEIS, M. D. S.-S. D. V. E. S.-D. D. I. E. D. Manual de Manejo Clínico da Febre Amarela. 2020.
- ²⁹ SAÚDE, M. D. Portaria No 2600 de 21 de outubro de 2009. 2009. Disponível em: < https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt2600_21_10_2009.html >.
- ³⁰ _____. Portaria No 2.117 de 11 de Julho de 2018. Diário Oficial da União, 2018. Disponível em: < https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2018/prt2117_16_07_2018.html >.
- ³¹ SAÚDE, S. D. E. D. S. D. M. G.-S. D. V. E. P. À. Fluxograma para Atendimento de Febre Amarela em MG. 2018.

- 32 FO, L. et al. Molecular Mechanism for Protection Against Liver Failure in Human Yellow Fever Infection. **Hepatology communications**, v. 4, n. 5, 03/16/2020 2020. ISSN 2471-254X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32363317> >.
- 33 RE, D. Á. et al. Clinical profiles and factors associated with mortality in adults with yellow fever admitted to an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 93, 2020 Apr 2020. ISSN 1878-3511. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32004691> >.
- 34 EG, K. et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 19, n. 7, 2019 Jul 2019. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31104909> >.
- 35 EC, D. A. et al. Acute Liver Failure-25 Years at a Single Center: Role of Liver Transplantation in the Survival of Adult Patients. **Transplantation proceedings**, v. 50, n. 2, 2018 Mar 2018. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29579830> >.
- 36 P, I. et al. Patients with acute liver failure listed for superurgent liver transplantation in France: reevaluation of the Clichy-Villejuif criteria. **Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society**, v. 21, n. 4, 2015 Apr 2015. ISSN 1527-6473. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25675946> >.
- 37 YM, M. et al. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 03/28/2019 2019. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30984122> >.
- 38 JAKOB, A. Über die Veränderungen im Zentralnervensystem bei Gelbfieber. **Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde**, v. 111, n. 1, p. 111-116, 2023. ISSN 1432-1459. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01680492> >.
- 39 FRASSETTO, F. Neuropathology of Yellow Fever Autopsy Cases. 2022. Disponível em: < <https://assets.researchsquare.com/files/rs-1191931/v1/e35a3c42-074f-42c9-948e-623c45b6000d.pdf?c=1651069320> >.
- 40 JG, O. G. et al. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. **Gastroenterology**, v. 97, n. 2, 1989 Aug 1989. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2490426> >.
- 41 LVB, C. et al. Lipase and factor V (but not viral load) are prognostic factors for the evolution of severe yellow fever cases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, 2019 2019. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31116245> >.

- 42 AN, D.-N. et al. Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. **Histopathology**, v. 75, n. 5, 2019 Nov 2019. ISSN 1365-2559. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31087672> >.
- 43 V, V. et al. Liver Transplantation for Acute Liver Failure due to Yellow Fever: A Case Report. **Transplantation proceedings**, v. 51, n. 5, 2019 Jun 2019. ISSN 1873-2623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31155206> >.
- 44 TP, M.; PF, V. Yellow fever. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 64, 2015 Mar 2015. ISSN 1873-5967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25453327> >.
- 45 A, M.; CH, G.; T, A. Mitochondrial Dysfunction and Signaling in Chronic Liver Diseases. **Gastroenterology**, v. 155, n. 3, 2018 Sep 2018. ISSN 1528-0012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30012333> >.
- 46 W, B. et al. Lessons from look-back in acute liver failure? A single centre experience of 3300 patients. **Journal of hepatology**, v. 59, n. 1, 2013 Jul 2013. ISSN 1600-0641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439263> >.
- 47 SILVA, G. A. R. D. O processo de tomada de decisão na prática clínica: a medicina como estado da arte. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 11, n. jan-mar, p. 75-79, 2013.
- 48 MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. I. E.-D. D. C. E. T. Diretrizes Metodológicas - Sistema GRADE - Manual de graduação da qualidade da evidência e força de recomendação para tomada de decisão em saúde. Brasília, 2014. Disponível em: < https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_metodologicas_sistema_grade.pdf >.
- 49 UNESP, Ed. **A revolta da Vacina: mentes insanas em corpos rebeldes**. 2018.
- 50 SAÚDE, S. D. E. D. S. D. M. G.-S. D. V. E. P. À. Hospitais de Referência para atendimento de FA em MG. 2018.

8 - ANEXOS

ANEXO A – Descrição dos casos

Caso 1

Masculino, 53 anos, trabalhador rural, histórico de HAS. Não vacinado para FA. Início de sintomas em 14/01/2018; admitido no CTI do HEM em 22/01/2018, com quadro de icterícia, mialgia, acidose e injúria renal aguda, motivando início de hemodiálise nesta data. Devido a gravidade da disfunção hepática, foi transferido sem alterações neurológicas para HFR em 25/01/2018 pela manhã; no final do mesmo dia evoluiu com rebaixamento sensorial, hipotensão com necessidade de aminas, sendo intubado. Choque progressivo associado a insuficiência hepática; mantido sedado; hemoculturas negativas. Óbito em 28/01/2018 às 11h com falência orgânica múltipla.

Caso 2

Masculino, 45 anos, engenheiro, visita à região rural em 16/01/2018; iniciou quadro de febre, mialgia, cefaléia e icterícia em 23/01/2018 e procurou o pronto-atendimento do HFR em 26/01/2018. Histórico de vacinação para FA em 1992. Boa evolução clínica, sem intercorrências, alta hospitalar em 01/02/2018.

Caso 3

Masculino, 39 anos, comerciante, história prévia de cirurgia bariátrica; não vacinado para FA. Visita à zona rural em 20/01/2018; iniciou em 24/01/2018 quadro de febre, mialgia, dor abdominal e náuseas, sendo internado em hospital geral de Belo Horizonte. Diante do quadro de disfunção hepática foi transferido ao HFR em 27/01/2018. Evoluiu sem intercorrências e com melhora clínica, alta hospitalar em 01/02/2018.

Caso 4

Masculino, 36 anos, paisagista, morador dos EUA há 20 anos, não vacinado para FA, sem co-morbidades. Chegou no Brasil em 12/01/2018 e visitou a área rural em 21/01/2018; iniciou sintomas em 25/01/2018, procurando atendimento em hospital regional no dia seguinte; diante de transaminases muito elevadas, acidose e IRA foi iniciada diálise peritoneal; transferido ao HFR em 29/01/2018, admitido às 23h sem sinais de EH. No dia 31/01/2018 às 3h evoluiu com dispnéia, piora do padrão respiratório, sem alteração neurológica, sendo intubado. Após intubação necessitou uso de aminas; mantido sedado por acidose grave. Diante dos critérios de King's college preenchidos e da impossibilidade de avaliação neurológica, foi inscrito em fila e submetido a TH na mesma noite. Sangramento per-operatório muito aumentado, discrasia sanguínea grave, enxerto de grande tamanho, a parede abdominal não foi fechada, deixadas compressas na cavidade. Óbito 3 horas após o término da cirurgia; culturas negativas.

Caso 5

Masculino, 49 anos, desempregado, visitou a zona rural em 23/01/2018. Histórico de transplante renal em 2014, nefropatia de etiologia indeterminada, usuário de imunossupressores; portador de hepatite C sem sinais de cirrose ou hipertensão portal, submetido a tratamento anti-viral em 2017 com resposta virológica sustentada; APRI e FIB-4 prévios ao tratamento baixos; não vacinado para FA. Iniciou sintomas em 28/01/2018 e procurou o PA HFR em 30/01/2018; evoluiu com icterícia, disfunção hepática e renal, requerendo hemodiálise; hemoculturas positivas para staphylo aureus, tratadas com teicoplanina, recebeu alta do CTI; retornou ao CTI no dia 07/02/2018 quando apresentou confusão mental sem piora da função hepática. Crescimento de cândida em hemocultura, tratada com anidulafungina. Boa evolução clínica, alta hospitalar em 08/03/2018. Faleceu em 21/08/2021 por consequências de um processo expansivo no SNC.

Caso 6

Masculino, 22 anos, estudante, ciclista, fazia trilha nas matas da região da Zona da Mata de MG diariamente. Iniciou quadro clínico em 24/01/2018, sendo hospitalizado em hospital regional no dia 27/01/2018. Sem co-morbidades, vacinado para FA. Em função das alterações da função hepática foi transferido ao HFR em 30/01/2018. Evoluiu sem intercorrências, alta hospitalar em 07/02/2018.

Caso 7

Masculino, 58 anos, comerciante, visita a zona rural em 25/01/2018. Sem co-morbidades; submetido a vacinação para FA no dia 02/02/2018, não havia sido vacinado antes. Iniciou em 03/02/2018 com mialgia, artralgia, febre, cefaléia e náuseas, sendo internado no hospital local. Diante de disfunção hepática, transferido ao HFR no dia 06/02/2018. Não apresentou coagulopatia significativa mas evoluiu com hiperbilirrubinemia importante; no dia 12/02/2018 apresentou alteração do status mental com TC de crânio normal, sendo optado por inscrição na fila de transplante pois preenchia os critérios de King's college; simultaneamente apresentou hipotensão com necessidade de aminas em dose baixa, sendo iniciados antibióticos. Após 48 horas de antibióticos as hemoculturas foram positivas para *escherichia coli* e o paciente apresentou melhora neurológica, clínica e laboratorial, sendo retirado da fila. Boa evolução clínica, recebendo alta hospitalar em 07/03/2018.

Caso 8

Masculino, 63 anos, trabalhador rural. Tabagista, sem outras co-morbidades conhecidas. Iniciou em 03/02/2018 com quadro clínico; encaminhado do hospital local para o HEM em 05/02/2018. Não vacinado para FA. Evoluiu com alteração cognitiva leve e Fator V = 15%, sendo transferido para HFR em 08/02/2018; TC e RM de crânio sem alterações agudas. Decisão de inscrevê-lo na fila considerando encefalopatia grau I e critérios de Clichy modificado. Submetido a TH em 09/02/2018, sangramento aumentado que persistiu no pós-operatório motivando reabordagem em 11/02/2018. Apresentou neste momento disfunção renal e necessidade de hemodiálise. Como complicações pós-operatórias apresentou ainda pneumonia nosocomial e infecção pelo citomegalovírus, necessitando tratamento preemptivo com ganciclovir. Alta hospitalar em 23/03/2018 com bom estado geral.

Caso 9

Feminino, 56 anos, frequentou a zona rural de sua cidade, sem co-morbidades conhecidas, não era vacinada para FA. Iniciou sintomas em 04/02/2018, sendo hospitalizada no mesmo dia no H João Penido. No dia 07/02/2018 evoluiu com injúria renal aguda, motivando hemodiálise. Diante da gravidade da disfunção hepática, transferida ao HFR em 09/02/2018, sendo admitida as 5h lúcida, em ECG=15. Iniciou as 9h sonolência e *flapping*, sendo interpretada como EH grau II; as 12h ficou hipotensa, apresentava acidose, iniciada noradrenalina; TC de crânio sem alterações agudas. Ao longo da tarde evoluiu com choque progressivo, hiperlactatemia, acidose, não tolerou sessão de diálise. Submetida a intubação orotraqueal, apresentou PCR e evoluiu a óbito as 18:20 do mesmo dia.

Caso 10

Masculino, 62 anos, desempregado, história pregressa de hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, distúrbio cognitivo leve perinatal. Visita à zona rural de em 29/01/2018; em 01/02/2018 foi submetido a vacinação para FA, nunca tinha sido vacinado antes; iniciou sintomas em 05/02/2018 – mialgia, cefaléia, vômitos e febre, sendo atendido em hospital geral de Belo Horizonte no mesmo dia. Encaminhado ao CTI em 08/02/2018 onde permaneceu estável e foi transferido ao HFR em 10/02/2018. Não apresentou intercorrências e recebeu alta hospitalar em 16/02/2018.

Caso 11

Masculino, 68 anos, aposentado, histórico de hipertensão arterial sistêmica, acidente vascular cerebral isquêmico em 2015 sem déficits, não era vacinado para FA. Visitou zona rural em 04/02/2018; início de sintomas em 08/02/2018; procurou atendimento em hospital regional em 11/02/2018, e à admissão apresentava disfunção hepática grave, acidose, injúria renal aguda, sendo submetido a hemodiálise. Alteração neurológica no dia 13/02/2018, sendo transferido ao HFR; à admissão EH grau II. Inscrito na fila de transplante por critérios de Clichy modificado; no dia 14/02 evoluiu com EH grau IV e foi intubado; TC de crânio sem alterações agudas. Submetido a TH na noite deste dia. Procedimento com sangramento muito aumentado; enxerto grande, fechada apenas pele. No dia seguinte foi abordado para fechamento da aponeurose. Manteve discrasia sanguínea nos dias subsequentes apesar de correção agressiva com hemoderivados, choque e acidose, sendo novamente abordado com lavagem da cavidade em 16/02/2018. Em 18/02/2018 evoluiu com crises convulsivas e piora do choque, apresentando falência orgânica múltipla e óbito

Caso 12

Masculino, 57 anos, trabalhador rural, sem co-morbidades conhecidas. Foi submetido a vacinação contra FA em 10/02/2018; no dia seguinte apresentou cefaléia, dor abdominal e náuseas, evoluindo posteriormente com vômitos e diarreia. Transferido da unidade de saúde local para o H. João Penido em 14/02/2018, sendo admitido com acidose, IRA e submetido a hemodiálise. No dia 16/02/2018 evoluiu com confusão mental e sinais de EH grau II; transferido neste dia ao HFR. Admitido sonolento, progrediu para EH grau IV sendo intubado dia 17/02/2018 as 7h. Inscrito na fila de transplante pelos critérios de Clichy, evoluiu nos dias subsequentes com choque progressivo e disfunção orgânica múltipla sendo retirado da fila por falta de condição clínica. Óbito em 19/02/2018.

Caso 13

Masculino, 38 anos, sem co-morbidades conhecidas e não vacinado contra FA. Histórico de pescaria em 09/02/2018 na zona rural. Início de sintomas em 14/02/2018, transferido da unidade de saúde local para hospital geral em Belo Horizonte em 16/02/2018, onde foi admitido com acidose e IRA, sendo submetido a hemodiálise. Transferido ao HFR em 18/02/2018 às 20h, admitido lúcido sem EH. No dia seguinte apresentou crises convulsivas reentrantes, motivando intubação, com choque pós intubação orotraqueal. Submetido a sessão de plasmaférese mesmo assim; sem condições clínicas de transporte para realização de imagem de crânio. Hemoculturas negativas. Evoluiu com choque refratário e disfunção orgânica múltipla, óbito em 21/02/2018.

Caso 14

Masculino, 47 anos, médico, sem co-morbidades conhecidas, vacinação para FA em 2011. Visita à zona rural em 10/02/2018, início de sintomas em 14/02/2018. Procurou PA HFR em 19/02/2018 com hepatite grave, sem alterações neurológicas. Submetido a 3 sessões de plasmaférese. Uso de sofosbuvir 20/02/2018 a 02/03/2018. EH grau I em 23/02/2018; piora neurológica progressiva, sendo intubado em 25/02/2018 às 21h por EH grau IV. TC crânio de 21/02/2018 sem alterações agudas; TC de crânio de 25/02/2018 com sinais de edema cerebral. Inscrito na fila de transplante pelo critério de Clichy modificado; TH 26/02/2018, correção agressiva da coagulopatia antes da cirurgia. IRA e hemodiálise no pós-operatório. Alta do CTI em 10/03/2018; sem novas intercorrências. Alta hospitalar em 20/03/2018.

ANEXO B – Apresentações realizadas em eventos científicos

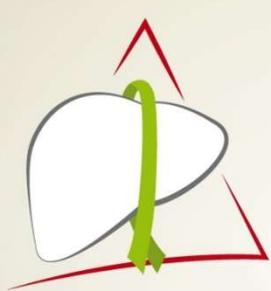


Apresentação no “*Yellow Fever Study Group*” ainda com a epidemia em curso, formado pelas equipes transplantadoras designadas pelo Ministério da Saúde como referência para febre amarela, com trocas de experiências e definição de protocolos



Apresentação no Simpósio do Hospital das Clínicas da UFMG com a presença das equipes de infectologia, hepatologia e transplantes do estado de MG

O desafio do Transplante Hepático
na febre amarela: experiência de MG



**SEMINÁRIO MINEIRO
E 1º ENCONTRO MULTIDISCIPLINAR
DE TRANSPLANTE DE FÍGADO**

23 e 24 de março de 2018 - Belo Horizonte/MG

Antônio Márcio de Faria Andrade

Responsável Técnico Transplante de Fígado do Hospital Felício Rocho
Gastroenterologista Grupo de Transplante de Fígado – HC-UFMG

Realização:  Apoio:  Organização:  Patrocínio: 

Apresentação no Seminário Mineiro de Transplante de Fígado, promovido pela Associação Mineira de Gastroenterologia



**LIVERCENTER
AT UFMG**



**ACOMETIMENTO HEPÁTICO
NA FEBRE AMARELA**
Avanços e perspectivas na pesquisa básica e clínica
BELO HORIZONTE - MG - BRASIL

***Febre Amarela e
falência hepática aguda***

Antônio Márcio de Faria Andrade
26 de abril de 2018

Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital Felício Rocho
Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho – Transplante de Fígado
Grupo de Transplante de Fígado do IAG / HC-UFMG

Apresentação no seminário promovido pelo LiverCenter at UFMG, entidade com suporte da Universidade de Yale e com o envolvimento de profissionais do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Febre Amarela

XXX Jornada Médica



Associação Médica
de João Monlevade

24, 25 e 26
de Maio/18

30 anos de Atualização do Conhecimento Médico

Antônio Márcio de Faria Andrade
Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do Hospital Felício Rocho
Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho – Transplante de Fígado
Grupo de Transplante de Fígado do IAG / HC-UFG




Apresentação a convite da Associação Médica de MG, Associação Mineira de Gastroenterologia e da Associação Médica de João Monlevade na jornada local



**OFICINA DE DISCUSSÃO DO
GUIA DE MANEJO CLÍNICO DE FEBRE AMARELA**

**EXPERIÊNCIA DO
TRANSPLANTE EM MG**




ANTÔNIO MÁRCIO DE FARIA ANDRADE

18 DE JULHO DE 2018

Apresentação na Oficina de Discussão de Manejo em Febre Amarela promovida pela Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde



Apresentação no Simpósio de Hepatites Virais de MG e Internacional de Doenças do Fígado promovido pela UFMG

Acute liver failure due to the recent Yellow Fever outbreaks in Brazil: from initial management to liver transplantation

Authors: Andrade, Antônio Márcio de Faria^{1,2}; Castro, Ricardo Fortes Monteiro¹; Lisboa, Quelson Coelho¹; Vidigal, Paula Vieira Teixeira¹; Castro, Ricardo Gontijo¹; Garcia, Silvério Macedo¹; Lima, Cristiano Xavier^{1,2};
¹Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte – MG Brazil; ²Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG Brazil;

INTRODUCTION

Yellow fever (YF) is an endemic disease with high mortality rates, present in forest areas in Africa and Latin America and caused by a flavivirus transmitted by mosquitoes. Although the virus has general systemic effects, the liver is the most affected organ and acute liver failure (ALF) is a common cause of death. The Brazilian state of Minas Gerais has experienced a recent outbreak with 528 confirmed cases and 177 deaths in a one year period, from June 2017 to 2018. In this context, patients developing ALF were transferred to specialized liver centers and the first liver transplantations for YF were performed.

RESULTS

14 patients had confirmed YF and 8 developed ALF with neurological signs of hepatic encephalopathy (HE). All cases resulted in death or liver loss and the consequent need for transplantation. Liver function tests: aspartate transaminase 8572 U/L (7900-25000), alanine transaminase 4658 U/L (2282-9680); bilirubin on the 5th day of symptoms 5.06 mg/dl (2.8-8.3) with the peak occurring after the 14th day – 8.64 mg/dl (4.47-17.12); INR ranged from between 1.4 to >9, with a median of 2.9; factor V 11-29% (median 22%). The mean time interval between initial neurological signs and a Glasgow coma scale of < 8 was 42 hours (6-72), whilst the passage to death took 70 hours (8-120). The mean interval between jaundice-HE was 6 days, 4 patients died without a liver transplant, 2 with septic shock and 2 with multiple organ failure. 4 patients were submitted to liver transplantation, and 2 survived. They presented very severe coagulopathy during and after surgery, requiring high amounts of blood products.

A liver biopsy of the graft confirmed re-infection with YF virus in 3 patients, 2 of whom died of refractory shock in the first 48 hours. The 2 survivors had bacterial infections – pneumonia, sepsis – and needed preemptive therapy for cytomegalovirus.

CONCLUSION

Patients with ALF and HE died or suffered liver loss. However, despite these negative outcomes, many did not meet the King's college criteria which recommends liver transplantation at the moment of HE onset. INR and bilirubin levels did not correlate well with a bad prognosis at this moment. It is well known that the interval between the onset of jaundice and the development of HE results in a worse prognosis, especially after 7 days, but this did not happen with YF. Factor V activity showed itself to be more sensitive to evaluation of the need for a LT, but the progression to severe coma or death was very fast after the initial neurological signs.

Waiting until HE reaches grade III or IV to take the decision for liver transplantation would thus render the surgery futile. In our opinion, the criteria used to indicate the efficacy of liver transplantation has to include a modification of Chilly's criteria, with factor V activity < 30% and EH grade I-II. Among the patients who had undergone transplants the survival rate was 50%, with a follow up period of 8 months.

PATHOLOGY – LIVER BIOPSY

a Biopsy of an explanted liver taken from a patient with YF and ALF and submitted to a liver transplant, manifesting massive necrosis of Zone 2 which is typical of the YF virus;

b Biopsy of the graft taken from the same patient who died 48 hours after surgery with the same severe lesion;

c Biopsy of the graft of a patient with YF and ALF 48 hours after transplant with a good evolution, manifesting the same typical lesion at zone 2;

d Immunohistochemistry of a biopsy of the graft taken from the same patient confirming the presence of the YF virus.

Methods

We provide a report on a series of 8 patients admitted to the liver unit at the Felício Rocho Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, with YF and ALF during the period 2017-2018. These include 4 patients who were submitted to liver transplantation.

Contact information

Hospital Felício Rocho – Transplant Unit – Liver transplantation division
 Address: Av. do Contorno, 9530 - Barro Preto, Belo Horizonte - MG, 30110-934;
 Phone: +55 (31) 3514-7000;
 E-mail: antoniomarcio@andradejunior.com

Apresentação em pôster no The Liver Meeting 2018 – Congresso Americano de Hepatologia promovido pela Associação Americana para Estudos de Doenças do Fígado (AASLD)



HOSPITAL
**Felício
Rocho**

55º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL
XXVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA
CHAGASLEISH | 2019



MEDTROP 2019 PARASITO
28 A 31 JULHO | CAMPUS UFMG | BELO HORIZONTE

Hepatopatia na febre amarela e transplante hepático: experiência brasileira

Antônio Márcio de Faria Andrade
29 de Julho de 2019

Hospital Felício Rocho
Belo Horizonte - MG

Apresentação no Congresso Brasileiro de Medicina Tropical 2019



Felício
Rocho

Núcleo de Ciências
da Saúde Felício Rocho

EXPERIÊNCIA DO TRANSPLANTE DE FÍGADO NA FEBRE AMARELA



04 de abril de 2023

1º SIMPÓSIO DE INFECTOLOGIA DO HOSPITAL FELÍCIO ROCHO

DESAFIOS NO MANEJO DA FEBRE AMARELA

ANTÔNIO MÁRCIO DE FARIA ANDRADE

Apresentação no Simpósio de Infectologia do Hospital Felício Rocho 2023

HOSPITAL FELÍCIO
ROCHO/MG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise descritiva do manejo clínico de pacientes com hepatite aguda por febre amarela.

Pesquisador: CRISTIANO XAVIER LIMA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 90780318.9.0000.5125

Instituição Proponente: Hospital Felício Rocho/MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.851.504

Apresentação do Projeto:

O Brasil enfrenta um grande surto de febre amarela. Na região sudeste, o Estado de Minas Gerais é um dos estados brasileiros mais acometidos. Em virtude do grande número de casos graves com falência hepática aguda o Ministério da Saúde elaborou um plano de ação conjunta entre um grupo restrito de Hospitais de Referência para Transplante Hepático de pacientes do SUS para atendimento inicial, acompanhamento e possível transplante de fígado de pacientes com falência hepática aguda. O Hospital Felício Rocho está entre eles. Até o mês de dezembro de 2017, o tratamento da falência hepática aguda por febre amarela era exclusivamente baseado em conduta clínica de suporte. Entretanto, o transplante hepático de urgência foi utilizado, de forma inédita no mundo, com sucesso pelo Hospital das Clínicas da USP em dezembro de 2017. Desde então, o Ministério da Saúde criou uma comissão de pesquisadores que autoriza e acompanha as indicações e os resultados de transplantes hepáticos para esta situação específica em centros autorizados no Brasil. Desde fevereiro de 2018, o Hospital Felício Rocho recebeu e ainda pode receber uma série de pacientes provenientes do SUS com sinais clínicos e laboratoriais de acometimento hepático pelo vírus da febre amarela. Este presente estudo se propõe a realizar a revisão dos dados obtidos de prontuário médico e resultado de exames laboratoriais, radiológicos e de histopatologia (acervo) e conservar adequadamente o material biológico humano coletado durante o tratamento médico de rotina, de forma a constituir importante fonte de estudo de novos conhecimentos que sirvam para futuras proposições terapêuticas. Considerando-se a importância

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.110-934

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3514-7626

Fax: (31)3514-7626

E-mail: cep@feliciorocho.org.br

Continuação do Parecer: 2.851.504

do estudo para saúde pública, os dispositivos legais da Resolução 580 de 22 de março de 2018 do Conselho Nacional de Saúde que estabelece normativas relativas às especificidades éticas das pesquisas de interesse estratégico para o Sistema Único de Saúde (SUS), seu Capítulo 4, Artigo 14 sobre a tramitação de projetos com a Cooperação do Governo Brasileiro, a qual estabelece em seu parágrafo único que nestes casos, a apreciação será realizada pelo CEP da instituição proponente, solicitamos que a presente proposta seja analisada.

Objetivo da Pesquisa:

1. Descrever a apresentação clínica, sua correlação com os exames complementares e evolução dos pacientes admitidos com hepatite aguda por febre amarela.
2. Conservação adequada das amostras de pacientes portadores de hepatite aguda por febre amarela submetidos a tratamento no Hospital Felício Rocho (biorepositório).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente projeto não apresenta riscos diretos, apenas riscos indiretos de ordem psíquica (ansiedade e medo), moral (risco perda do anonimato), social (gasto com deslocamento ou perda de dia de trabalho), cultural (estigmatização de grupo de risco). Para cada um destes riscos o pesquisador possui alternativas de mitigação de ocorrência como descrito detalhadamente no TCLE. Não haverá interferência com a condução médica dos casos, não serão realizadas punções ou procedimentos exclusivos para coleta de amostras. Todas amostras utilizadas serão obtidas de coletas determinadas pelo caso clínico e após prescrição médica baseada na necessidade clínica e provenientes de excedente de amostras processadas.

Benefícios:

Os benefícios do estudo são de ordem geral na saúde pública, não oferecendo qualquer outro benefício individual exceto o de satisfação pessoal de contribuição com o bem comum e gerar conhecimentos que propiciem novos tratamentos mais eficazes para a doença. Não haverá qualquer compensação financeira pela participação no estudo.

Em carta reposta ao CEP o pesquisador declarou:

"Foi inserida a citação que o pesquisador irá manter o sigilo dos dados pessoais dos participantes

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.110-934

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3514-7626

Fax: (31)3514-7626

E-mail: cep@feliciorocho.org.br

HOSPITAL FELÍCIO ROCHO/MG



Continuação do Parecer: 2.851.504

no projeto no TCLE. Com relação a descrição de como serão minimizados os riscos, o pesquisador reforça que todos eles serão debatidos, explicados e sua minimização assegurada durante a apresentação da pesquisa e do TCLE. O maior risco que é o de perda de anonimato, será minimizado com a colocação de código desde a coleta inicial de dados. Foi inserida parte do TCLE, na qual estas questões estão devidamente descritas, no projeto do CEP"

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de relevância para a sociedade.

Recomendo a aprovação

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram sanadas as pendências anteriores:

Incluída a carta sobre o biorrepositório.

Cronograma atualizado.

Alterações no TCLE realizadas: incluída a opção para os participantes de que se ele autoriza ou não a utilização e armazenamento das amostras.

Foram apresentados os termos obrigatórios.

Recomendações:

Enviar os relatórios de andamento semestrais e final da Pesquisa. Caso haja alterações na pesquisa submeter emenda ao CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1134825.pdf	06/08/2018 17:53:01		Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartarespostaaoparecerdoCEP.docx	06/08/2018 17:52:14	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Brochura Pesquisa	projetodetalhadofaretficado.docx	06/08/2018 17:48:42	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico /	Biorepositorio.pdf	06/08/2018 17:41:15	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.110-934

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3514-7626

Fax: (31)3514-7626

E-mail: cep@feliciorocho.org.br

HOSPITAL FELÍCIO
ROCHO/MG



Continuação do Parecer: 2.851.504

Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio.pdf	06/08/2018 17:41:15	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Outros	termodecompromisso.pdf	06/08/2018 17:40:27	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	06/08/2018 17:35:40	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhadofa.docx	23/05/2018 12:04:53	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclefebreamarela.docx	23/05/2018 12:03:30	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Outros	autorizacaochefiafa.pdf	23/05/2018 11:54:17	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaofa.pdf	23/05/2018 11:53:50	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostofa.pdf	23/05/2018 11:53:28	CRISTIANO XAVIER LIMA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 29 de Agosto de 2018

Assinado por:
Selme Silqueira de Matos
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.110-934

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3514-7626

Fax: (31)3514-7626

E-mail: cep@feliciorocho.org.br

Molecular Mechanism for Protection Against Liver Failure in Human Yellow Fever Infection

Fernanda de Oliveira Lemos,^{1*} Andressa França,^{1*} Antônio Carlos Melo Lima Filho,^{1*} Rodrigo M. Florentino,^{1*} Marcone Loiola Santos,¹ Dabny G. Missiaggia,¹ Gisele Olinto Libanio Rodrigues,² Felipe Ferraz Dias ,³ Ingredy Beatriz Souza Passos,⁴ Mauro M. Teixeira,² Antônio Márcio de Faria Andrade,⁵ Cristiano Xavier Lima,^{5,6} Paula Vieira Teixeira Vidigal,⁷ Vivian Vasconcelos Costa,⁴ Matheus Castro Fonseca,⁸ Michael H. Nathanson,⁹ and M. Fatima Leite¹

Yellow fever (YF) is a viral hemorrhagic fever that typically involves the liver. Brazil recently experienced its largest recorded YF outbreak, and the disease was fatal in more than a third of affected individuals, mostly because of acute liver failure. Affected individuals are generally treated only supportively, but during the recent Brazilian outbreak, selected patients were treated with liver transplant. We took advantage of this clinical experience to better characterize the clinical and pathological features of YF-induced liver failure and to examine the mechanism of hepatocellular injury in YF, to identify targets that would be amenable to therapeutic intervention in preventing progression to liver failure and death. Patients with YF liver failure rapidly developed massive transaminase elevations, with jaundice, coagulopathy, thrombocytopenia, and usually hepatic encephalopathy, along with pathological findings that included microvesicular steatosis and lytic necrosis. Hepatocytes began to express the type 3 isoform of the inositol trisphosphate receptor (ITPR3), an intracellular calcium (Ca^{2+}) channel that is not normally expressed in hepatocytes. Experiments in an animal model, isolated hepatocytes, and liver-derived cell lines showed that this new expression of ITPR3 was associated with increased nuclear Ca^{2+} signaling and hepatocyte proliferation, and reduced steatosis and cell death induced by the YF virus. **Conclusion:** Yellow fever often induces liver failure characterized by massive hepatocellular damage plus steatosis. New expression of ITPR3 also occurs in YF-infected hepatocytes, which may represent an endogenous protective mechanism that could suggest approaches to treat affected individuals before they progress to liver failure, thereby decreasing the mortality of this disease in a way that does not rely on the costly and limited resource of liver transplantation. (*Hepatology Communications* 2020;4:657-669).

The yellow fever virus (YFV) is the prototypical member of the Flaviviridae family, which also includes viruses such as hepatitis C virus, dengue, West Nile, Zika, and Japanese encephalitis.^(1,2) Yellow fever (YF) is endemic in 47 countries across Africa and Central and South America,⁽³⁾ and over

2,000 cases were reported in the Brazilian outbreak between July 2016 and June 2018.⁽⁴⁾ The infection was fatal in more than one-third of these patients, and the lethal cases were mostly attributed to acute liver failure.⁽⁵⁾ Therefore, YF remains a major health problem despite intense study about transmission

Abbreviations: 5mC, 5-methyl cytosine; ANOVA, analysis of variance; ATP, adenosine triphosphate; dpi, days post-infection; EGF, epidermal growth factor; ER, endoplasmic reticulum; FBS, fetal bovine serum; HCC, hepatocellular carcinoma; H&E, hematoxylin & eosin; ICG, indocyanine green; IFN, interferon; IHC, immunohistochemistry; ITPR, inositol trisphosphate receptor; KO, knockout; MAM, mitochondria-associated membranes; MOI, multiplicity of infection; mRNA, messenger RNA; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PCR, polymerase chain reaction; PFU, plaque-forming unit; R3KO, knockout for ITPR3; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais; YF, yellow fever; YFV, yellow fever virus; YFV_{17DD}, YFV 17DD vaccine substrain; YFV_{WT}, YFV wild-type strain; WT, wild type.

Received December 3, 2019; accepted February 20, 2020.

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1504/suppinfo.

*These authors contributed equally to this work.

Financial support: National Institute of Science and Technology in Dengue (573876/2008); Foundation for the National Institutes of Health (DK112797, DK114041, DK34989, and DK57751); Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2018/20014-0); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (159892/2018-0); and Liver Center at Universidade Federal de Minas Gerais.

and prophylaxis of the virus and the availability of an effective vaccine. The pathogenesis of the liver disease caused by YFV is poorly understood; indeed, treatment of infected individuals has typically been limited to supportive measures. During the recent Brazilian outbreak, however, selected patients with liver failure were considered for urgent liver transplant.^(6,7) This provided the opportunity to more carefully characterize the clinical and pathological features of YF-induced acute liver failure and to investigate the cell biology of its pathogenesis. Calcium signals in hepatocytes regulate pathological processes that are known to occur in YF, including changes in cell proliferation, lipid droplet formation,⁽⁷⁾ and cell death.^(2,8) Therefore, we examined cellular and molecular alterations in the calcium signaling machinery in livers of patients infected with YFV and in isolated liver cells and an animal model.

Materials and Methods

HUMAN LIVER SPECIMENS

Human liver samples and clinical data from patients with YF were obtained under the auspices of protocols approved by the Ethics Committee of Hospital Felício

Rocho (Belo Horizonte, Brazil) number CAAE: 90780318.9.0000.5125. YF specimens were from explanted livers, posttransplant liver biopsy of a patient who presented retroperitoneal bleeding 48 hours after the liver transplant, and autopsies of patients hospitalized at Hospital Felício Rocho in the 2018 YF outbreak. Healthy liver samples were obtained from biopsies of pretransplant liver grafts. YF diagnosis was confirmed by real-time polymerase chain reaction (PCR) in all cases. Patient selection for orthotopic liver transplantation was based on Clichy criteria.⁽⁹⁾

CELLS

HepG2 wild-type (WT) and inositol trisphosphate receptor (ITPR) 3 knockout (KO) cells were obtained from the laboratory of Dr. M. Nathanson (Yale University), maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, and kept at 37°C in 5% CO₂.

PRODUCTION OF VIRUSES AND PLAQUE ASSAY

For *in vitro* and *in vivo* experiments we used two YFV strains: (1) the 17DD vaccine substrain (YFV_{17DD}),

© 2020 The Authors. *Hepatology Communications* published by Wiley Periodicals, Inc., on behalf of the American Association for the Study of Liver Diseases. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep4.1504

Potential conflict of interest: Nothing to report.

ARTICLE INFORMATION:

From the ¹Department of Physiology and Biophysics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Department of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ³Center of Microscopy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁴Department of Morphology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁵Hepatic Transplant Service, Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, Brazil; ⁶Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁷Pathological Anatomy and Forensic Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁸Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Rua Giuseppe Máximo Solfaro, Campinas, Brazil; ⁹Section of Digestive Diseases, Department of Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT.

ADDRESS CORRESPONDENCE AND REPRINT REQUESTS TO:

Michael H. Nathanson, M.D., Ph.D.
Section of Digestive Diseases, Department of Internal Medicine
Yale University School of Medicine
300 Cedar Street, TAC S241D

New Haven, CT 06520-8019
E-mail: michael.nathanson@yale.edu
Tel.: (+1) 203-785-5610

kindly donated by the Reference Laboratory for Flavivirus, Fiocruz, Brazilian Ministry of Health, and (2) The WT strain (YFV_{WT}), which was isolated in our Laboratory from a clinical specimen of serum from a symptomatic patient from the 2018 outbreak in Minas Gerais. 17DD virus stocks were passaged at a multiplicity of infection (MOI) of 0.01 in Vero cells (ATCC CCL81, existing collection in our laboratory from Banco de Células do Rio de Janeiro [BCRJ, access code 0245]) in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (Cultilab, Campinas, Brazil) supplemented with 10% segmented filamentous bacteria for 5 days at 37°C. The YFV_{WT} virus strain was propagated in mosquito cells (*Aedes albopictus* clone C6/36 [ATCC CRL-1660, existing collection in our laboratory from BCRJ, code 0343]) in L15 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab) and maintained at 28°C. YFV_{WT} isolation was confirmed by real-time PCR as described subsequently. To concentrate the virus, 50 mL of the cell culture supernatant was loaded onto a VivaCell 100 centrifugal concentrator (Sartorius, Göttingen, Germany) and centrifuged at 2,000g for 10 minutes, and the supernatant remaining in the concentrator was aliquoted and stored at -80°C. For quantification of virus, Vero cells were grown to a confluent monolayer in RPMI 1640 medium with 10% FBS (Cultilab) and 1% penicillin-streptomycin-glutamine (Gibco) in 24-well plates at 37°C. The virus was serially diluted in serum-free medium and then inoculated into the cells at 37°C with gentle shaking every 15 minutes for 1 hour. Next, the medium was replaced with RPMI 1640 medium containing 2% carboxymethylcellulose and 2% FBS (Cultilab) (overlay medium) and the culture kept at 37°C. After 5 days, the cells were fixed in 3% formalin in phosphate-buffered saline for 1 hour, washed, and stained with 1% crystal violet in 10% formalin solution for 1 hour. Plates were washed with water, and plaques were counted manually.

ANIMALS AND YF MOUSE INFECTION

In vivo experiments were conducted using type I INF receptor deficient mice (A129^{-/-}) on a SV129 background. The A129^{-/-} mice were originally from the Jackson Laboratories (reference 010830) and were obtained from Bioterio de Matrizes da Universidade de Sao Paulo and kept under specific pathogen-free

conditions at the Immunopharmacology Lab at the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). This mouse model was used because its use has already been described for studying the pathogenesis of YF.⁽¹⁰⁾ In particular, this model recapitulates key features of fatal human YF infection, including death, YFV replication and dissemination, proinflammatory cytokine release, and severe pathology in visceral organs, including the liver.⁽¹⁰⁾ The rationale for using the A129^{-/-} strain is that the resistance of mice to fatal viscerotropic YFV infection is mediated by interferons (IFNs), as it appears to be for dengue virus.⁽¹¹⁾ Mice were housed in filtered cages with autoclaved food and water available *ad libitum* on ventilated shelves (Alesco, Monte Mor, Brazil). Mice were housed under standard conditions with controlled temperature (18°C-23°C), humidity (40%-60%), and 12/12-hour dark-light cycle. Sample sizes for *in vivo* studies were determined using the G*Power 3.1 software package. The experimental protocol was approved by the Committee on Animal Ethics of the UFMG (permit protocol no. 84/2018). All surgeries were performed under ketamine/xylazine anesthesia. Studies with YFV were conducted under biosafety level 2 containment at Immunopharmacology Lab from the Instituto de Ciências Biológicas at the UFMG.

For the experiments, adult male and female A129^{-/-} mice (7-9 weeks old, 20-22 g) were inoculated with different inoculums of either YFV_{17DD} or YFV_{WT} viruses' strains through intravenous route/200 µL (tail vein). Control (noninfected) mice received 200 µL of C6/36 cell culture supernatant also through intravenous route (tail vein). Morbidity parameters such as lethality rates and bodyweight loss were evaluated daily. For clinical analysis, a kinetic of infection was performed and analysis was conducted on days 1, 3, and 6 following YFV infection.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as arithmetic mean ± SEM unless otherwise indicated. For statistical analysis, means between two groups were compared by Student *t* test, and comparisons among groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's posttest. A *P* value of 0.05 or less was considered statistically significance.

FURTHER METHODOLOGICAL DETAILS

Detailed additional materials and methods are available in the Supporting Information.

Results

CLINICAL, PATHOLOGICAL, AND CELL BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF YFV-INDUCED LIVER FAILURE

We examined clinical presentations (Table 1) and liver biopsies (Fig. 1 and Supporting Fig. S1) of YFV-infected patients who were considered for liver transplant at Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, Brazil, during the 2018 outbreak. Fourteen patients were admitted, most of whom transferred from other hospitals specifically for transplant evaluation. Thirteen patients were male (92.8%) with an average age 47 (22-67 years), and all patients were exposed to forested areas. All but 1 of the patients were not vaccinated. Eight of the patients were deemed appropriate for listing for liver transplantation. These patients had high serum levels of transaminases at admission (9,000-27,000 U/mL), with aspartate aminotransferase > alanine aminotransferase; 6 developed acute kidney injury and required hemodialysis. All patients had severe coagulopathy, with thrombocytopenia (18,000-55,000), elevated international normalized ratio (1.5-10.0), and low factor V activity (11%-30%). Serum bilirubin also was elevated in nearly all of the patients, although serum alkaline phosphatase was in the normal range (not shown), suggesting that liver failure was due entirely to hepatocellular injury. Patients developed hepatic encephalopathy between 6 and 11 days after onset of symptoms, and progression from grade I to grade IV (24 hours) and then to death (36 hours) was very fast. After listing, 4 patients (50%) underwent orthotopic liver transplantation, whereas the other 4 died on the waiting list after a median of 24 hours. Two of the 4 transplanted patients died: one 3 hours after liver transplantation due to primary graft nonfunction, and the other 3 days after liver transplantation due to septic shock. The 2 patients who survived received sofosbuvir from 2 days before the surgery until 8 days following transplant. Both of these patients were in good health 18 months later.

TABLE 1. CLINICAL DATA OF PATIENTS HOSPITALIZED AT HOSPITAL FELÍCIO ROCHO IN 2018 YFV OUTBREAK

Patient	Age (years)	Gender	Platelets (per mL)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Bilirubin (mg/dL)	INR	Creatinine (mg/dL)	Lactate (IU/L)	Encephalopathy	Transplantation (days)	Outcome
1	53	M	29,000	9,693	2,282	17.2	2.9	12.4	133	4	N	Dead
2	64	M	26,000	7,900	4,648	3.54	2.3	6.48	61	2	Y	Alive
3	37	M	58,000	8,151	7,206	8.16	>10	7.1	164	3	Y	Dead
4	49	M	89,000	5,160	2,463	5.12	1.81	8.74	40	n	N	Alive
5	39	M	58,000	8,707	4,509	6.81	2.9	8.81	125	4	N	Dead
6	58	M	12,000	12,590	7,446	21.9	1.65	1.17	42	n	N	Alive
7	69	M	35,000	8,572	3,987	5.9	>10	8.11	135	3	Y	Dead
8	57	M	29,000	8,451	3,854	10.1	4.4	7.49	184	4	N	Dead
9	57	F	46,000	28,266	9,680	4.47	>10	5.06	115	4	N	Dead
10	63	M	56,000	3,650	2,215	5.41	1.12	0.77	20	n	N	Alive
11	23	M	18,000	9,471	3,926	13.47	1.7	0.92	20	n	N	Alive
12	45	M	79,000	2,790	2,126	1.02	1.1	1.2	8	n	N	Alive
13	47	M	38,000	13,207	2,992	8.15	2.9	1.46	41	3	Y	Alive
14	40	M	49,000	157	288	0.49	1.1	0.82	15	n	N	Alive

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; INR, international normalized ratio; N, no; Y, yes.

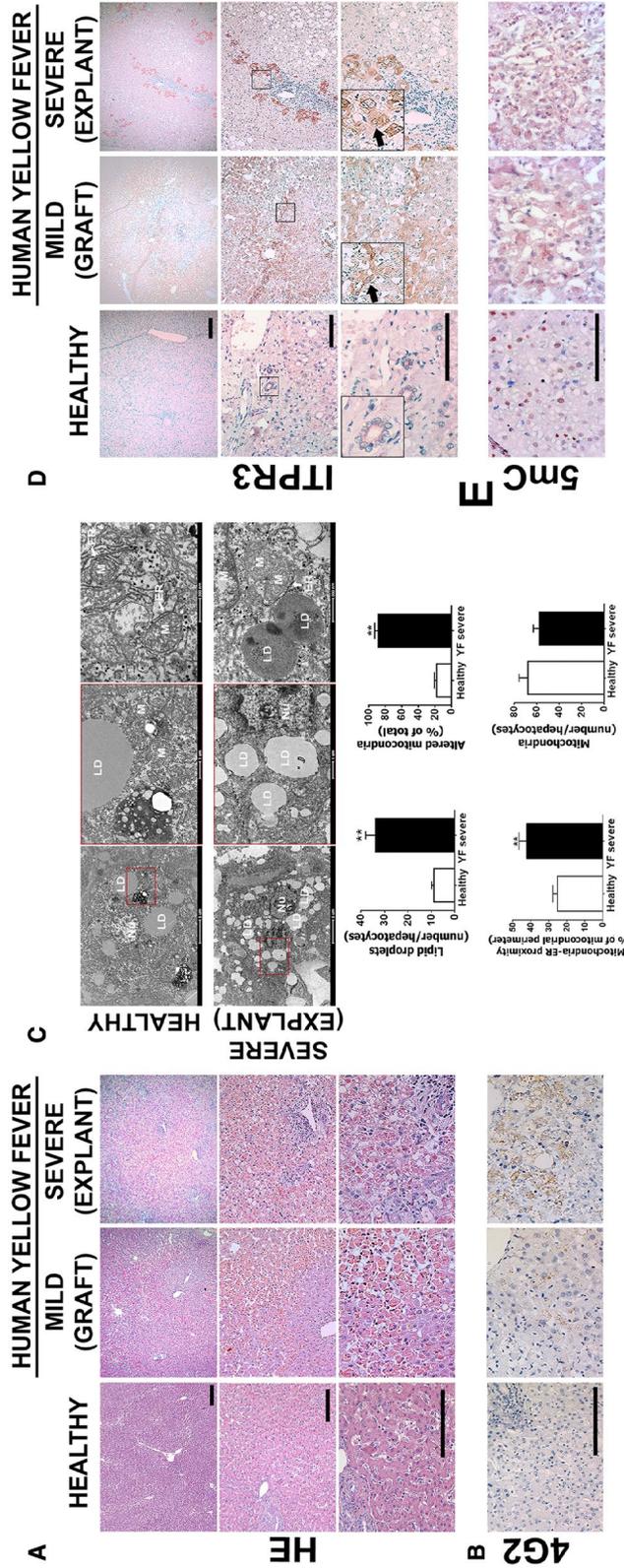


FIG. 1. Patients with acute liver failure from YF have steatosis, pan-lobular cell death, and new expression of ITPR3. (A) H&E-stained liver sections from healthy patient (left panel), YFV-infected patient showing mild liver disease (middle panel, biopsy from a liver graft), and a liver explant specimen from a patient with severe hepatic disease due to YFV infection (right panel). Patients were infected in 2018 during the YFV outbreak in Minas Gerais, Brazil. (B) Immunohistochemistry (IHC) staining for flavivirus envelope protein 4G2. (C) TEM images of liver samples from healthy patients (top panels) or YFV-infected patient displaying severe hepatic disease (bottom panels), showing mitochondria with disorganized or absent cristae, phagosomes, and lipid droplets. Graphs show quantification of number of lipid droplets, percentage of altered mitochondria, mitochondria-endoplasmic reticulum proximity, and mitochondrial number. Bars indicate the average values of samples from at least eight hepatocytes/group. (D) IHC liver slices stained for ITPR3. Arrows indicate ITPR3 localization in the cytoplasm and nucleus in hepatocytes of mild and severe cases of YF. (E) IHC stained for 5mC (scale bar: 50 μ m, 100 μ m, and 200 μ m for H&E and IHC, and 1 μ m and 5 μ m for TEM). Significance was analyzed using Student *t* test (***P* < 0.01). Abbreviations: LD, lipid droplet; Nu, nucleus; M, mitochondrion; Ph, phagosome.

Histological analysis of liver biopsy specimens showed severe hepatocellular damage throughout the hepatic lobule in the explants, while grafts developed mild injury in the midzone region (Fig. 1A and Supporting Fig. S1A). Pathological changes in explants included steatosis, lytic necrosis, hemorrhage, and inflammatory infiltrates, similar to what was described in a recent case report,⁽⁷⁾ and consistent with the clinical presentations of these patients. Pathological changes in midzonal hepatocytes of grafts included swelling, steatosis, apoptosis, and lytic necrosis (Fig. 1A, middle panel). All biopsy specimens also showed positive staining for the flavivirus envelope protein 4G2 (Fig. 1B and Supporting Fig. S1B), confirming the association between liver injury and YFV infection in these patients. Transmission electron microscopy (TEM) analysis demonstrated microvesicular steatosis in the YFV-infected hepatocytes (Fig. 1C), with a 3-fold increase in the number of lipid droplets relative to what was observed in normal control hepatocytes. Both steatosis and certain types of cell death have been linked to alterations in mitochondrial calcium signals in hepatocytes,⁽¹²⁻¹⁴⁾ which in turn may result from aberrant expression of the ITPRs that conduct calcium from the endoplasmic reticulum (ER) into mitochondria at mitochondria-associated membranes (MAMs).⁽¹⁴⁾ TEM analysis also showed that YFV-infected hepatocytes displayed mitochondrial alterations, including dissolved mitochondrial crests and presence of membrane pores, and an increased amount of MAMs, but no change in the total number of mitochondria (Fig. 1C). Transmission of calcium into mitochondria depends on which ITPR isoforms are expressed at the MAM,^(15,16) which varies among cell types and can change in disease states.^(13,14,17,18) Therefore, we examined whether expression of each of the three ITPR isoforms was altered in YF.

ITPR1 and ITPR2 are the isoforms principally expressed in normal hepatocytes,^(19,20) although hepatocytes begin to express ITPR3 as well in chronic liver diseases and in liver cancer, where it is responsible for certain pathological effects.^(21,22) Unexpectedly, ITPR3 expression markedly increased in hepatocytes during YF infection (Fig. 1D and Supporting Fig. S1C). Cytoplasmic, perinuclear, and nuclear ITPR3 staining was observed in hepatocytes in both explants and grafts (Fig. 1D). In contrast, there was no change in expression of ITPR1 (Supporting Fig. S1C), which is the isoform that normally localizes to

the MAM in hepatocytes,⁽¹⁴⁾ whereas ITPR2 expression was increased but to a much lesser extent than ITPR3 (Supporting Fig. S1C-E). Demethylation of its promoter can increase ITPR3 expression in hepatocytes,⁽²²⁾ and viral infection can promote DNA demethylation,^(23,24) so we analyzed the general methylation state in human YFV-infected tissue by examining tissue staining for 5-methyl cytosine (5mC), the methylated form of the DNA base cytosine targeted to DNA demethylases (Fig. 1E). Hepatocytes from normal liver were mostly positively stained (Fig. 1E, left panel), while hepatocytes were not labeled in either mild or severe liver injury from YFV (Fig. 1E, middle and right panels, respectively). Together, these findings demonstrate that YF infection induces hepatocytes to express ITPR3 and suggest that this occurs through DNA demethylation.

MOUSE MODEL OF YFV INFECTION REPLICATES HISTOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LIVER INVOLVEMENT IN HUMAN DISEASE

An animal model was used to investigate the mechanism of YF-induced liver injury and the role of ITPR3 in this. IFN α/β receptor KO SV129 mice were infected with YFV, and the time-course of ITPR3 expression was monitored. Mice were infected with either the attenuated YFV strain (YFV_{17DD}) used in the YF vaccine (Fig. 2) or with a sylvatic YFV strain (YFV_{WT}) that was isolated from a patient with YFV-liver failure in February 2018 (Supporting Fig. S2). Both strains caused loss of body weight and death (Fig. 2A and Supporting Fig. S2A). YFV_{17DD} reduced survival by 20% at 4×10^4 plaque-forming units (PFU) 7 days post-infection (dpi) (Fig. 2A), while all mice died by 7 dpi with 4×10^4 PFU of YFV_{WT} (Supporting Fig. S2A). Therefore, 4×10^4 PFU injections were used for further studies. Quantitative RT-PCR showed YFV_{17DD} messenger RNA (mRNA) in the mouse liver at 3 dpi, although the virus was not detected at 1 dpi and was completely eliminated by 6 dpi (Fig. 2B). Kinetics of indocyanine green (ICG) clearance from the blood was used to assess liver function in the YFV_{17DD}-infected mice (Fig. 2C). There was a significant

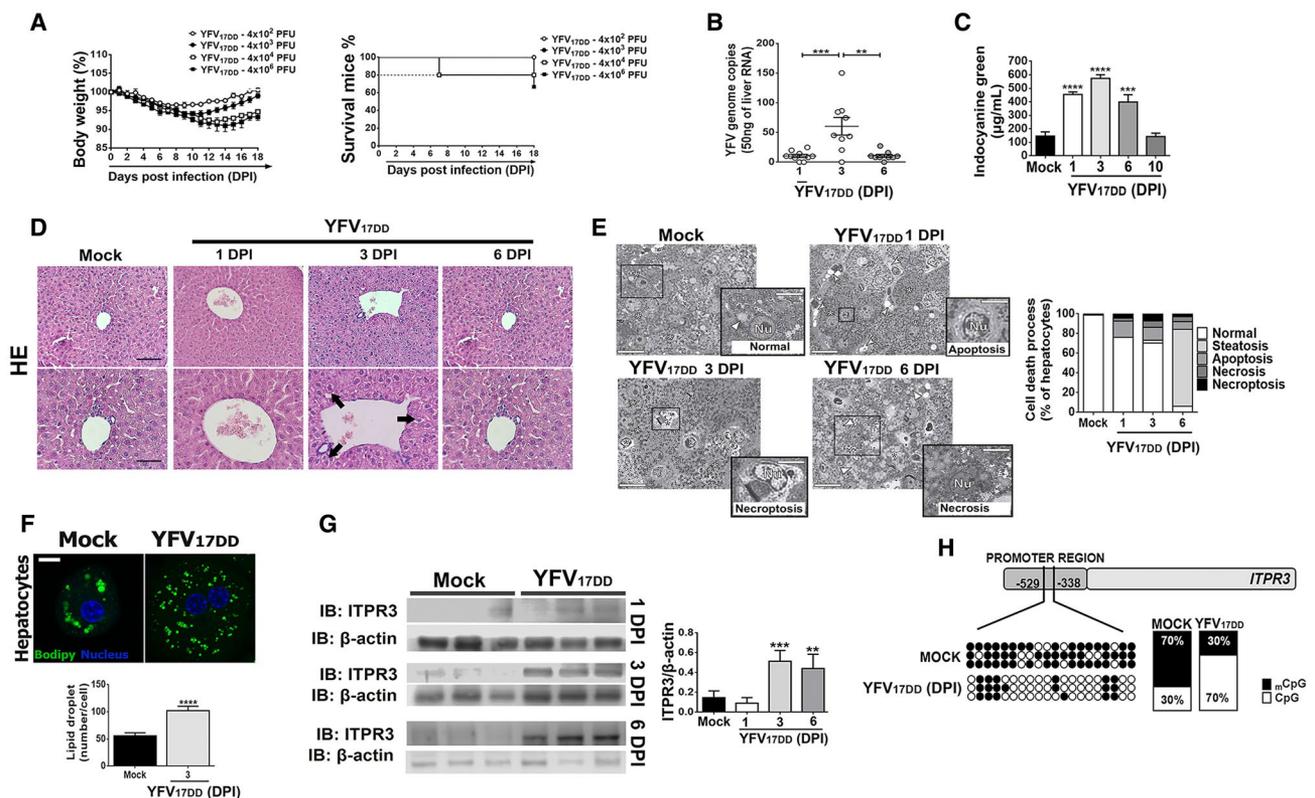


FIG. 2. Mouse model replicates histological findings in patients with liver failure from YF infection. IFN- α/β R^{-/-} SV129 mice (7–9 weeks old) were inoculated intravenously with YFV strain (YFV_{V17DD}) vaccine. (A) Changes in body weight (left panel) and Kaplan-Meier survival curve (right panel) after inoculums of 4×10^2 to 4×10^6 PFU. (B) Quantitative RT-PCR analysis of YFV viral load in the mice livers on 1 dpi, 3 dpi, and 6 dpi after inoculation of 4×10^4 PFU. Results are expressed as mean \pm SEM (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ using ANOVA, Bonferroni's posttest). (C) Liver function measured by the ICG clearance after inoculation of 4×10^4 PFU. Bars indicate mean \pm SEM of samples from 3–6 animals/group (*** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ using ANOVA, Bonferroni's posttest compared with mock samples). (D) Representative H&E-stained liver slices of mock and YFV_{V17DD} inoculated animals on 1 dpi, 3 dpi, and 6 dpi. Scale bar: 50 μ m and 100 μ m. Arrows indicate hydropic degeneration characterized by the presence of swollen hepatocytes with clear and vacuolated cytoplasm and central nucleus. (E) Images of high-resolution light microscopy of 300- μ m-thick liver sections stained with toluidine blue, and representative images of mock and YFV_{V17DD} inoculated mice on 1 dpi (B), 3 dpi (C), and 6 dpi (D) showing hepatocytes with normal aspect (white *) and ongoing different cell death processes (black *). Normal hepatocytes from mock animal with central nucleus, rough cytoplasm with many organelles, and few lipid droplets (arrowheads). Early apoptosis with initial cell and organelle condensation in hepatocyte from 1 dpi of YFV_{V17DD}. Necroptosis characterized by pale and swollen nucleus and cytoplasm with plasma membrane integrity in hepatocyte from 3 dpi of YFV_{V17DD}. Necrosis, illustrated by empty spaces of cytoplasm in hepatocyte from 6 dpi of YFV_{V17DD} (left panel). Arrows indicate sinusoid capillaries; arrowheads indicate lipid droplets (scale bar: 25 μ m and 50 μ m). Frequency of cell death processes and steatosis analyzed in high-resolution images of 300-nm-thick sections (right panel). (F) Representative immunofluorescence images of isolated hepatocytes stained with Bodipy (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindol (blue) from mock and YFV_{V17DD} 3-dpi inoculated animals (upper panel) (scale bar: 20 μ m). Bottom panel shows the quantification of lipid droplets (number/cell). Bars indicate mean \pm SEM of samples from three animals/group (**** $P < 0.0001$ using Student t test). (G) ITPR3 expression is increased in liver 3 and 6 days after infection of mice with YFV_{V17DD}. Left panel shows representative blots for ITPR3 expression in liver lysates from mock, and YFV_{V17DD} 1-dpi, 3-dpi, and 6-dpi inoculated animals. Each lane reflects the blot for the lysate from a separate animal. Right panel shows quantification of ITPR3 expression, normalized by β -actin. Bars indicate mean \pm SEM of samples from 3–6 animals/group (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ using ANOVA, Bonferroni's posttest compared with mock samples). (H) Demethylation sites on cytosine-guanine dinucleotide (CpG) islands in mouse ITPR3 promoter region after 3 dpi with YFV_{V17DD} virus. Black dots represent methylated sites, and white dots represent demethylated sites. Quantification of methylated/demethylated CpG island ratio in mock and YFV-infected liver samples. Abbreviations: IB, immunoblot; Nu, nucleus.

increase in ICG concentration in the blood after 1, 3, and 6 dpi, reflecting hepatic impairment, although the ICG concentration returned to normal at 10 dpi. Hematoxylin and eosin (H&E) stained liver specimens were microscopically examined. Hepatocytes displayed discrete hydropic degeneration (swollen cells with clear and vacuolated cytoplasm and central nucleus) in response to inoculation with 1 or 3 dpi of YFV_{17DD} (Fig. 2D) or YFV_{WT} (Supporting Fig. S2B); however, at 6 dpi, liver tissues were similar to controls. The frequency of apoptosis, steatosis, necroptosis, and necrosis were analyzed in 300-nm-thick sections stained with toluidine blue, and showed a progressive increase following infection, regardless of whether animals were infected with YFV_{17DD} (Fig. 2E) or YFV_{WT} (Supporting Fig. S2C). Hepatocytes isolated from YFV_{17DD}-infected mice at 3 dpi displayed an increased number of Bodipy-labeled lipid droplets compared with control hepatocytes (Fig. 2F). As in patients, livers of YFV-infected mice began to express ITPR3 (Fig. 2G and Supporting Fig. S2D). Western blot analysis demonstrated that expression of ITPR3 was significantly increased 3 dpi and 6 dpi in mice infected with either YFV_{17DD} (Fig. 2G) or YFV_{WT} (Supporting Fig. S2D). Similarly, 5mC staining showed that DNA methylation was decreased at 3 dpi with YFV_{WT} (Supporting Fig. S2E) compared with the noninfected group. Sequencing the ITPR3 promoter region of liver samples from mice at 3 dpi after YFV_{17DD} (Fig. 2H) or YFV_{WT} infection (Supporting Fig. S2F) confirmed demethylation, consistent with this being responsible for the new expression of ITPR3 in infected hepatocytes. Together, these results show that α/β KO SV129 mice infected with YFV display cellular and molecular alterations in the liver that are similar to what is observed in humans, including *de novo* expression of ITPR3.

ITPR3 EXPRESSION IN HEPATOCYTES PROTECTS YFV-INFECTED LIVER

To investigate the effects of YFV-induced *de novo* expression of ITPR3 in hepatocytes, experiments were performed in the liver-derived HepG2 cell line, which constitutively expresses ITPR3.^(22,25) These cells were compared with knockout for ITPR3 (R3KO) HepG2 cells, in which CRISPR was used to delete ITPR3 (Fig. 3A).⁽²²⁾

Calcium signal indicates the increase of free Ca²⁺ in a cell compartment relative to the basal level elicited by an agonist that directly or indirectly activates a calcium-dependent cascade. Cytosolic calcium signals were increased in YFV_{17DD}-infected cells relative to uninfected controls. The amplitude of the calcium signals was more than 3-fold greater in infected WT cells, but less than 2-fold greater in infected R3KO HepG2 cells, each relative to their uninfected controls (Fig. 3B,C). Calcium signaling can be regulated independently in the nucleus,⁽²⁵⁾ and nuclear calcium signals modulate progression through the cell cycle, hepatocyte proliferation, and liver regeneration,⁽²⁶⁻³⁰⁾ so we investigated Ca²⁺ signaling in the nucleus as well (Fig. 3D). YFV_{17DD} infection enhanced nuclear Ca²⁺ signals in both WT and R3KO cells, relative to uninfected cells. However, the amplitude of the nuclear Ca²⁺ signal was about 2.2-fold more pronounced in WT than in R3KO HepG2 cells (Fig. 3D). Consistent with this, a higher proliferation rate was observed in YFV_{17DD}-infected HepG2 cells compared with mock cells, whereas YFV_{17DD} did not induce proliferation in R3KO HepG2 cells (Fig. 3E). Moreover, cells lacking ITPR3 were more susceptible to the cytotoxic effect of YFV_{17DD} (Fig. 3F). This increased cytotoxic activity may have been due in part to the induction of apoptosis; Annexin V-positive cells were more prevalent in YFV_{17DD}-infected R3KO HepG2 cells than in uninfected cells, but not in YFV_{17DD}-infected WT HepG2 cells relative to their uninfected controls (Fig. 3F). Additionally, lipid droplet formation was higher in R3KO HepG2 cells than in WT cells, and this was even more pronounced after YFV_{17DD} infection (Fig. 4A). This preferential increase in steatosis in R3KO HepG2 was not related to mitochondrial Ca²⁺ signaling, because the amplitude of mitochondrial Ca²⁺ signals was increased to a similar extent in R3KO and WT HepG2 cells infected with YFV_{17DD} (Fig. 4B). However, the expression of *cpt1b* and *VLCAD*, which are genes related to β -oxidation, was down-regulated in YFV_{17DD}-infected R3KO HepG2 cells, whereas *VLCAD* was up-regulated in WT HepG2 cells (Fig. 4C,D). Therefore, the steatosis observed in R3KO HepG2 cells may have been due at least in part to inhibition of β -oxidation, which is responsible for breakdown of fatty acids derived from lipolysis of lipid droplets.⁽³¹⁾ YFV_{17DD} caused down-regulation of mRNA levels of the lipogenesis genes *SREBP1* and *FAS* in both HepG2 cell lines,

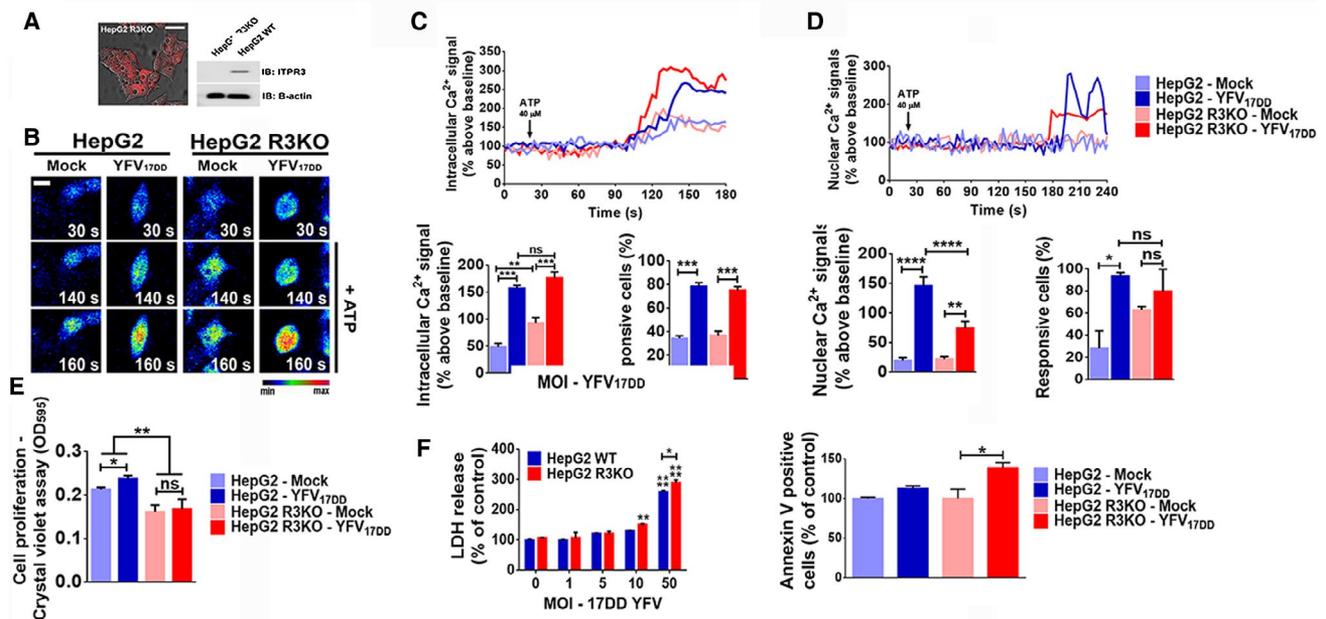


FIG. 3. ITPR3 expression is protective in a YFV-infected, liver-derived cell line. (A) Representative confocal images of HepG2 ITPR3 KO (HepG2 R3KO) cells and western blot for ITPR3 expression in HepG2 and HepG2 R3KO cells. (B) Confocal images of HepG2 and HepG2 R3KO cells loaded with Fluo-4/AM (6 μ M) and stimulated with 40 μ M ATP. The cells were infected with 50 MOI of YFV_{17DD} strain 24 hours before the Ca²⁺ analysis (scale bar: 20 μ m). (C) Representative time-course of total Ca²⁺ signal (upper panel), quantification of the peak fluorescence following stimulation with ATP (bottom-left panel), and percentage of responsive cells to increase of cytoplasmic Ca²⁺ signal (bottom-right panel). (D) Representative time-course of nuclear Ca²⁺ signal in the cells loaded with Fluo-4/AM (6 μ M) (upper graph). Bottom-left panel graph shows quantification of the peak fluorescence, and bottom-right graph shows percentage of responsive cells to increase of nuclear Ca²⁺ signal following stimulation with ATP. (E) Crystal violet proliferation assay 1 dpi with 50 MOI of YFV_{17DD}. (F) YFV_{17DD} cytotoxicity. Cell viability was measured by lactate-dehydrogenase release by the cells 1 dpi with different YFV_{17DD} inoculums (left panel). Proportion of apoptotic cells at day 1 of YFV_{17DD} 50 MOI infection, measured by flow cytometer analysis for annexin V-positive cells (right panel). Bars indicate the average values of samples from 3-6 biological replicates (>20 cells/replicate for Ca²⁺ signaling analysis). Significance was analyzed by the ANOVA, Bonferroni's posttest (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, and **** P < 0.0001) compared with mock samples. Abbreviations: IB, immunoblot; LDH, lactate dehydrogenase; ns, no statistical difference.

but more pronounced in R3KO HepG2 cells than in WT (Fig. 4E,F). These findings are consistent with the idea that ITPR3 stimulates nuclear Ca²⁺ signaling, cell proliferation, and lipolysis in YFV-infected hepatocytes, which collectively mitigates the deleterious effects of the infection.

To further investigate the effects of YFV infection on ITPR3 expression and calcium signaling, these were examined in freshly isolated primary mouse hepatocytes. Cells were stimulated with either epidermal growth factor (EGF) (Fig. 5A) or adenosine triphosphate (ATP) (Supporting Fig. S3), because both of these stimuli are important for calcium-mediated hepatocyte proliferation and liver regeneration.⁽³²⁻³⁵⁾ The amplitude of both cytosolic and nuclear Ca²⁺ signals induced by EGF was higher in hepatocytes

from YFV_{17DD}-infected mice than in mock hepatocytes (Fig. 5B,C, respectively). Cytosolic and nuclear Ca²⁺ signals in YFV_{17DD}-infected hepatocytes were also more pronounced in cells stimulated with ATP (Supporting Fig. S3A-C, respectively). ITPR3 expression was increased in the nucleus of YFV_{17DD}-infected hepatocytes, with its expression peak at 3 dpi (Fig. 5D), and this was associated with a higher number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive hepatocytes in the YFV_{17DD}-infected mice as well (Fig. 5E). Specifically, nuclear staining for PCNA, a marker for proliferation, was significantly increased in YFV_{17DD}-infected mice at 1 dpi, 3 dpi, and 6 dpi (Fig. 5E). Consistent with these findings, a marked increase in PCNA staining was observed in the livers of YFV-infected patients with either mild

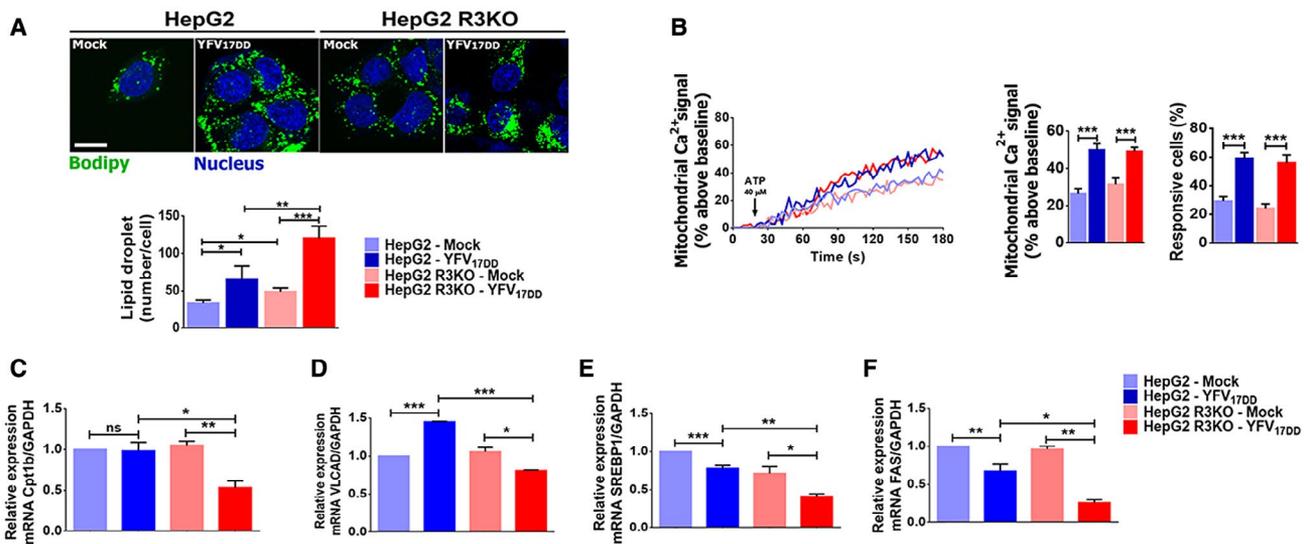


FIG. 4. ITPR3 expression decreases steatosis in a YFV-infected, liver-derived cell line. (A) Immunofluorescence images of HepG2 and HepG2 R3KO cells stained with Bodipy (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue), both in mock and 1-dpi YFV_{17DD} cells (upper panel), and quantification of lipid droplets (number/cell) (scale bar: 20 μ m) (bottom panel). (B) Representative time-course of mitochondrial Ca²⁺ signal (left graph). Cells were transfected with the mitochondrial matrix-targeted Ca²⁺ indicator inverse-pericam and stimulated with 40 μ M ATP. Graphs show quantification of the peak of fluorescence following stimulation with ATP (middle graph) and percentage of responsive cells to increase of mitochondrial Ca²⁺ signals (right graph). Quantitative RT-PCR analysis for mRNA expression of β -oxidation, Cpt1b (C), VLCAD (D), lipogenesis, and SREBP1 (E) and FAS (F) genes. Bars indicate the average values of samples from three to six biological replicates (>20 cells/replicate for Ca²⁺ signaling analysis). Significance was analyzed by the ANOVA, Bonferroni's posttest (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, and **** P < 0.0001) compared with mock samples. Abbreviations: GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ns, no statistical difference.

(Fig. 5F, middle panel) or severe (Fig. 5F, right panel) liver disease. Together, these results suggest that ITPR3 expression induced by YFV infection triggers a regenerative mechanism through a nuclear Ca²⁺ increase, in an attempt to protect the liver by stimulating hepatocyte proliferation.

Discussion

Despite extensive knowledge about YFV transmission and prophylaxis,⁽³⁶⁾ this infection remains a major threat to human health, and understanding of its pathogenesis remains limited. Here, we characterized the clinical and pathological findings in patients evaluated for liver transplant because they developed acute liver failure from their infection. The current findings complement and extend other recent clinical observations of YF liver failure, including the presence of massive hepatocellular necrosis and microvesicular steatosis, plus the rapid progression of coagulopathy, encephalopathy, and acute kidney injury.^(5-7,37)

Hepatocytes of infected patients also began to heavily express ITPR3, a calcium channel that is normally absent or minimally expressed in hepatocytes.^(19,20,38) This change was observed in a mouse model of YFV infection as well.

New expression of ITPR3 occurs in a variety of chronic liver diseases, and becomes more pronounced in hepatocellular carcinoma (HCC).⁽²²⁾ In that setting, pathological effects such as enhanced proliferation and resistance to apoptosis have been attributed to the ITPR3.⁽²²⁾ We report that ITPR3 can also become expressed in acute liver injury. Some of the ITPR3 in YFV infection localizes to the nucleus, where it is positioned to contribute to the enhanced nuclear calcium signaling observed here. This may have important therapeutic implications, as hepatocyte proliferation is dependent on calcium signals in the nucleus,⁽²⁶⁾ and the growth factors that are principally responsible for liver regeneration exert their effects by selectively activating nuclear calcium signaling pathways.^(27-30,39) It is less clear whether ITPRs that are localized to MAMs play a role in the

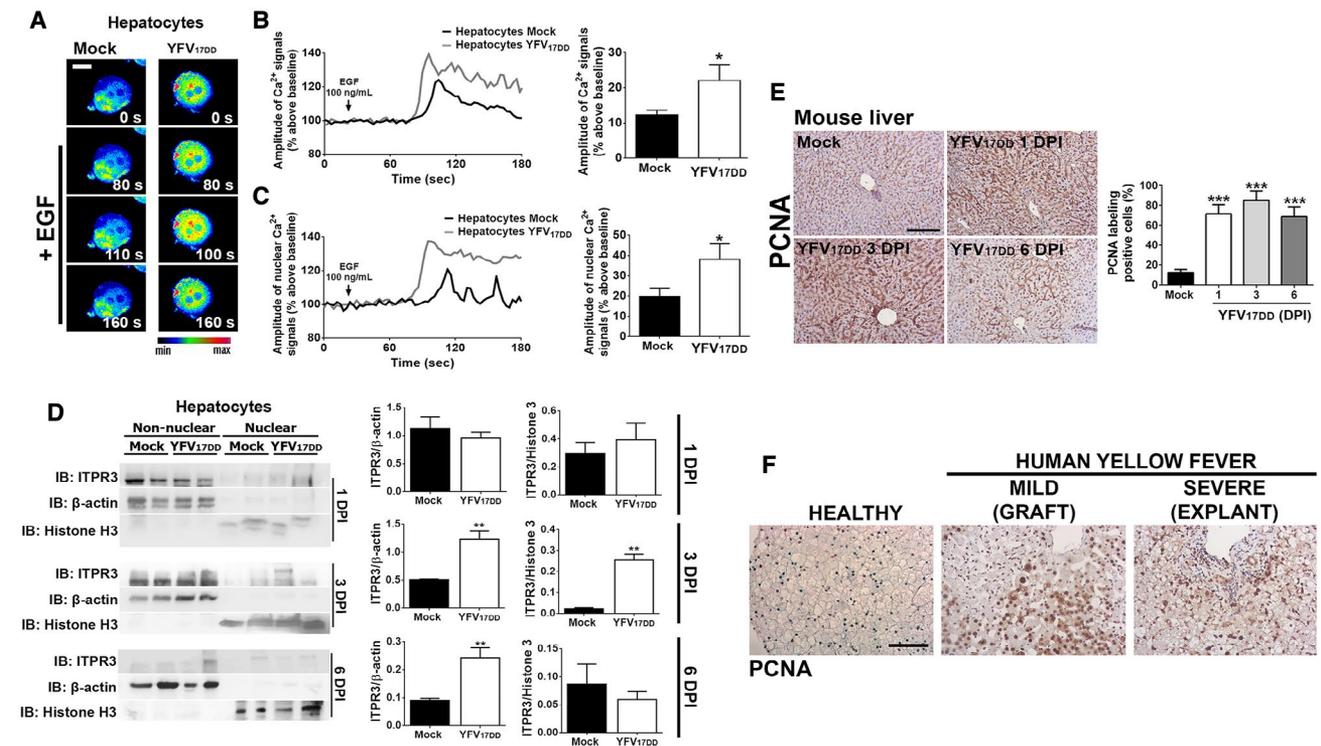


FIG. 5. YFV infection increases Ca²⁺ signals in the nucleus and enhances proliferation of hepatocytes. (A) Confocal images of hepatocytes isolated from liver tissue of 3-dpi YFV_{17DD}-infected mice. Cells were loaded with Fluo-4/AM (6 μM) and stimulated with 100 ng/mL EGF (scale bar: 20 μm). (B) Representative time-course of total Ca²⁺ signal (left panel) and quantification of the peak fluorescence following stimulation with EGF (right panel). (C) Representative time-course of nuclear Ca²⁺ signal (left panel) and quantification of the peak fluorescence of nuclear Ca²⁺ signal following stimulation with EGF (right panel). (D) Nonnuclear and nuclear protein fractions of liver lysates from mock, 1-dpi, 3-dpi, and 6-dpi YFV_{17DD}-infected animals were tested for ITPR3 expression by western blot. Left panel shows representative blots; middle and right graphs show quantification of ITPR3 in nonnuclear and nuclear protein fractions. (E) IHC images of liver slices stained for PCNA in mock and YFV_{17DD}-infected animals on 1 dpi, 3 dpi, and 6 dpi (left panel). Scale bar: 100 μm. Quantification of PCNA-positive cells is shown in the right graph. (F) PCNA staining of liver slices from a healthy patient (left panel), YFV-infected hepatic human tissue from a graft biopsy with mild liver disease (middle panel), and an explant sample from a patient with severe hepatic disease (right panel). Scale bar: 50 μm. Bars indicate the average values of samples from three to six biological replicates (>20 cells/replicate for Ca²⁺ signaling analysis). Significance was analyzed by Student *t* test or the ANOVA, Bonferroni's posttest (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001) compared with mock samples. Abbreviation: IB, immunoblot.

pathogenesis of YFV liver disease. These ITPRs are responsible for mitochondrial calcium signals, which in turn regulate lipid droplet formation and certain forms of cell death.^(12-14,16) Normally this is regulated by ITPR1 in hepatocytes,⁽¹⁴⁾ and expression of this isoform was not altered by YFV. ITPR2 can preferentially transmit calcium into mitochondria in some cell types,^(15,40) and ITPR2 expression was increased in YFV-infected hepatocytes, but there is disagreement about whether this isoform localizes to the MAM and does not regulate steatosis in hepatocytes.^(14,41) ITPR3 can preferentially transmit calcium into mitochondria in other cell types^(15-17,42). Indeed, we found that loss of ITPR3 sensitized YFV-infected cells to

apoptosis; however, effects of ITPR3 on steatosis may instead reflect concomitant changes in expression of enzymes involved in fatty acid oxidation and lipogenesis. The role of ITPR3 in controlling the expression of lipogenic genes is an open question that is just now being investigated. Several calcium signaling genes were recently shown to be important in human and mouse samples of HCC caused by nonalcoholic steatohepatitis. Among them, ITPR3 was aberrantly up-regulated in this disease,⁽²¹⁾ suggesting that this calcium channel could play a role in lipid metabolism. Chronic ITPR3 expression also modulates gene expression, triggering an anti-apoptotic response in HCC.⁽²²⁾ Together, these observations suggest the

possibility of a modulatory effect of ITPR3 on different molecular pathways in YFV-infected hepatocytes through regulation of gene expression, including genes related to lipid metabolism. Consistent with this, patients who develop symptoms from the YFV vaccine have enhanced ER stress,⁽⁴³⁾ which typically increases rather than decreases steatosis.⁽⁴⁴⁾ Lipid droplets are used by viruses from the Flaviviridae family, including YFV and hepatitis C virus (HCV), as an energy reservoir for replication, a platform for viral assembly⁽⁴⁵⁾ and a source of very low density lipoprotein, which is complexed to the HCV virus as a mechanism to evade the immune system.⁽⁴⁶⁾ Therefore, the current observation that ITPR3 inhibits steatosis may represent an additional protective role that it serves in YFV-infected hepatocytes.

A correlation between viral load and worse outcome has been reported in nonhuman primates infected with YFV⁽⁴⁷⁾ as well as in patients with YFV,⁽⁵⁾ and this relationship was recapitulated in our mouse model. Therefore, even though our findings suggest that *de novo* expression of ITPR3 in hepatocytes may be an endogenous protective mechanism in YFV infection, there also may be limits to the extent of this beneficial effect. It remains to be determined whether and to what extent the regulation of ITPR3 expression and targeting of this calcium channel to the nucleus can mitigate the liver damage that commonly contributes to the morbidity and mortality of this disease.

Author Contributions: F.O.L. designed and performed experiments, analyzed the data, and wrote the manuscript. A.F., A.C.M.L.F., R.M.F., M.L.S., D.G.M., and G.O.L.R. performed *in vitro* and *in vivo* experiments and analyzed the data. G.O.L.R., I.B.S.P., and V.V.C. performed the wild-type YF virus isolation, YFV propagation, and *in vivo* experiments, and analyzed the data related to the YF mouse model. F.F.D. processed tissue samples and performed TEM and morphometric analysis in the YF specimens. A.M.F.A., C.X.L., and P.T.V. identified and diagnosed human YF-infected specimens. M.M.T., V.V.C., M.C.F., M.H.N., and M.F.L. supervised the project, formulated the hypothesis, designed the experiments, and edited the manuscript.

Acknowledgments: The authors thank the Center of Microscopy at the Universidade Federal de Minas Gerais (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for experiments involving electron microscopy.

REFERENCES

- 1) Barrett AD, Monath TP. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Adv Virus Res* 2003;61:291-315.
- 2) Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* 2001;1:11-20.
- 3) Klitting R, Gould EA, Paupy C, de Lamballerie X. What does the future hold for yellow fever virus? *Genes (Basel)* 2018;9. pii: E291.
- 4) **Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM**, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* 2018;361:894-899.
- 5) Kallas EG, D'Elia Zanella L, Moreira CHV, Buccheri R, Diniz GBF, Castineiras ACP, et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2019;19:750-758.
- 6) Duarte-Neto AN, Cunha MDP, Marcilio I, Song ATW, de Martino RB, Ho YL, et al. Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. *Histopathology* 2019;75:638-648.
- 7) Song ATW, Abdala E, de Martino RB, Malbouisson LMS, Tanigawa RY, Andrade GM, et al. Liver transplantation for fulminant hepatitis attributed to yellow fever. *Hepatology* 2019;69:1349-1352.
- 8) Quaresma JA, Barros VL, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, da Costa Vasconcelos PF Jr., et al. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta Trop* 2005;94:116-127.
- 9) Bernuau J, Goudeau A, Poynard T, Dubois F, Lesage G, Yvonnet B, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in fulminant hepatitis B. *Hepatology* 1986;6:648-651.
- 10) Meier KC, Gardner CL, Khoretonenko MV, Klimstra WB, Ryman KD. A mouse model for studying viscerotropic disease caused by yellow fever virus infection. *PLoS Pathog* 2009;5:e1000614.
- 11) Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Beatty PR, Harris E. Murine model for dengue virus-induced lethal disease with increased vascular permeability. *J Virol* 2006;80:10208-10217.
- 12) **Mansouri A, Gattolliat CH**, Asselah T. Mitochondrial dysfunction and signaling in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 2018;155:629-647.
- 13) Ferioud CN, Gustavo Oliveira A, Guerra MT, Nguyen L, Mitchell Richards K, Jurczak MJ, et al. Hepatic inositol 1,4,5 trisphosphate receptor type 1 mediates fatty liver. *Hepatology* 2017;1:23-35.
- 14) **Arruda AP, Pers BM**, Parlakgul G, Guncy E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med* 2014;20:1427-1435.
- 15) Bartok A, Weaver D, Golenar T, Nichtova Z, Katona M, Bansaghi S, et al. IP3 receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer. *Nat Commun* 2019;10:3726.
- 16) **Mendes CC, Gomes DA**, Thompson M, Souto NC, Goes TS, Goes AM, et al. The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor preferentially transmits apoptotic Ca²⁺ signals into mitochondria. *J Biol Chem* 2005;280:40892-40900.
- 17) **Kuo IY, Brill AL**, Lemos FO, Jiang JY, Falcone JL, Kimmerling EP, et al. Polycystin 2 regulates mitochondrial Ca²⁺ signaling, bioenergetics, and dynamics through mitofusin 2. *Sci Signal* 2019;12. pii: eaat7397.
- 18) **Ueasilomngkol P, Khamphaya T**, Guerra MT, Rodrigues MA, Gomes DA, Kong Y, et al. Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is increased and enhances malignant properties in cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2020;71:583-599.

- 19) Hirata K, Pusch T, O'Neill AF, Dranoff JA, Nathanson MH. The type II inositol 1,4,5-trisphosphate receptor can trigger Ca²⁺ waves in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 2002;122:1088-1100.
- 20) Kruglov EA, Gautam S, Guerra MT, Nathanson MH. Type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor modulates bile salt export pump activity in rat hepatocytes. *Hepatology* 2011;54:1790-1799.
- 21) **Liang JQ, Teoh N**, Xu L, Pok S, Li X, Chu ESH, et al. Dietary cholesterol promotes steatohepatitis related hepatocellular carcinoma through dysregulated metabolism and calcium signaling. *Nat Commun* 2018;9:4490.
- 22) **Guerra MT, Florentino RM**, Franca A, Lima Filho AC, dos Santos ML, Fonseca RC, et al. Expression of the type 3 InsP3 receptor is a final common event in the development of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2019;68:1676-1687.
- 23) Gomes AV, de Souza Morais SM, Menezes-Filho SL, de Almeida LG, Rocha RP, Ferreira JM, et al. Demethylation profile of the TNF- α promoter gene is associated with high expression of this cytokine in Dengue virus patients. *J Med Virol* 2016;88:1297-1302.
- 24) Fan H, Cui Z, Zhang H, Mani SK, Diab A, Lefrancois L, et al. DNA demethylation induces SALL4 gene re-expression in subgroups of hepatocellular carcinoma associated with Hepatitis B or C virus infection. *Oncogene* 2017;36:2435-2445.
- 25) Leite MF, Thrower EC, Echevarria W, Koulen P, Hirata K, Bennett AM, et al. Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2975-2980.
- 26) Rodrigues MA, Gomes DA, Leite MF, Grant W, Zhang L, Lam W, et al. Nucleoplasmic calcium is required for cell proliferation. *J Biol Chem* 2007;282:17061-17068.
- 27) Gomes DA, Rodrigues MA, Leite MF, Gomez MV, Varnai P, Balla T, et al. c-Met must translocate to the nucleus to initiate calcium signals. *J Biol Chem* 2008;283:4344-4351.
- 28) **De Angelis Campos AC, Rodrigues MA**, de Andrade C, de Goes AM, Nathanson MH, Gomes DA. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;412:341-346.
- 29) Rodrigues MA, Gomes DA, Andrade VA, Leite MF, Nathanson MH. Insulin induces calcium signals in the nucleus of rat hepatocytes. *Hepatology* 2008;48:1621-1631.
- 30) Amaya MJ, Oliveira AG, Guimaraes ES, Casteluber MC, Carvalho SM, Andrade LM, et al. The insulin receptor translocates to the nucleus to regulate cell proliferation in liver. *Hepatology* 2014;59:274-283.
- 31) Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inher Metab Dis* 2010;33:469-477.
- 32) Runge DM, Runge D, Dorko K, Pizarov LA, Leckel K, Kostrubsky VE, et al. Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes. *J Hepatol* 1999;30:265-274.
- 33) Tackett BC, Sun H, Mei Y, Maynard JP, Cheruvu S, Mani A, et al. P2Y2 purinergic receptor activation is essential for efficient hepatocyte proliferation in response to partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307:G1073-G1087.
- 34) Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* 2005;128:503-506.
- 35) Besnard A, Gautherot J, Julien B, Tebbi A, Garcin I, Doignon I, et al. The P2X4 purinergic receptor impacts liver regeneration after partial hepatectomy in mice through the regulation of biliary homeostasis. *Hepatology* 2016;64:941-953.
- 36) Klitting R, Fischer C, Drexler JF, Gould EA, Roiz D, Paupy C, de Lamballerie X. What does the future hold for yellow fever virus? *Genes (Basel)* 2018;9:425-462.
- 37) Ribeiro AF, Cavalin RF, Abdul Hamid Suleiman JM, Alves da Costa J, Januaria de Vasconcelos M, Sant'Ana Malaque CM, Sztajnbock J. Yellow fever: factors associated with death in a hospital of reference in infectious diseases, Sao Paulo, Brazil, 2018. *Am J Trop Med Hyg* 2019;10:180-188.
- 38) Dufour JF, Luthi M, Forestier M, Magnino F. Expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in rat cirrhosis. *Hepatology* 1999;30:1018-1026.
- 39) Garcin I, Tordjmann T. Calcium signalling and liver regeneration. *Int J Hepatol* 2012;2012:630670.
- 40) **Wu S, Lu Q**, Wang Q, Ding Y, Ma Z, Mao X, et al. Binding of FUN14 domain containing 1 with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes maintains mitochondrial dynamics and function in hearts *in vivo*. *Circulation* 2017;136:2248-2266.
- 41) Ferioli CN, Nguyen L, Jurczak MJ, Kruglov EA, Nathanson MH, Shulman GI, et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type II (InsP3R-II) is reduced in obese mice, but metabolic homeostasis is preserved in mice lacking InsP3R-II. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;307:E1057-E1064.
- 42) De Stefani D, Bononi A, Romagnoli A, Messina A, De Pinto V, Pinton P, et al. VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. *Cell Death Differ* 2012;19:267-273.
- 43) Chan KR, Gan ES, Chan CYY, Liang C, Low JZH, Zhang SL, et al. Metabolic perturbations and cellular stress underpin susceptibility to symptomatic live-attenuated yellow fever infection. *Nat Med* 2019;25:1218-1224.
- 44) Lebeaupin C, Vallee D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2018;69:927-947.
- 45) Martins AS, Martins IC, Santos NC. Methods for lipid droplet biophysical characterization in flaviviridae infections. *Front Microbiol* 2018;9:1951.
- 46) Filipe A, McLauchlan J. Hepatitis C virus and lipid droplets: finding a niche. *Trends Mol Med* 2015;21:34-42.
- 47) Engelmann F, Josset L, Girke T, Park B, Barron A, Dewane J, et al. Pathophysiologic and transcriptomic analyses of viscerotropic yellow fever in a rhesus macaque model. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e3295.

Author names in bold designate shared co-first authorship.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found at onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1504/supinfo.