



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS-PPGCBM**

VANESSA POLEANA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO POR  
*Chikungunya virus* CONFIRMADOS POR MÉTODOS MOLECULARES**

PARNAÍBA – PI  
AGOSTO – 2019

VANESSA POLEANA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO POR  
*Chikungunya virus* CONFIRMADOS POR MÉTODOS MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas – PPGCBM da Universidade Federal do Piauí – UFPI, *Campus* Ministro Reis Velloso, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Área de concentração: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos em saúde.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

PARNAÍBA – PI  
AGOSTO – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba  
Serviço de Processamento Técnico

S586c Silva, Vanessa Poleana

Caracterização de aspectos clínicos da infecção por *chikungunya virus* confirmados por métodos moleculares [recurso eletrônico] / Vanessa Poleana Silva. – 2019.

1 Arquivo em PDF

Dissertação (Pós-Graduação em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal do Piauí, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

Área de Concentração: Medicina investigativa e marcadores epidemiológicos em saúde.

1. Arboviroses. 2. *Chikungunya virus*. 3. Poliartralgia. 4. RT-PCR. I. Título.

CDD: 616.9

*“Por isso não tema, pois Estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; Eu o segurarei com a minha mão direita e vitoriosa.”*

*Isaias 41:10*

*“Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.”*

*Augusto Cury*

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe Rosário, pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem escolhe trilhar novos caminhos. Tudo que consegui só foi graças a seu amor e dedicação incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela graça concedida, por me permitir aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir. Sem Ele, presente em todos os momentos, principalmente nos mais turbulentos, nada disso seria possível. A Ele toda minha gratidão.

À minha família em especial minha mãe, minha avó Cecília e meu tio Mário que desde meus primeiros passos me ensinaram sobre a importância dos estudos e uma boa educação. Por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me muito grata em ter vocês.

Ao meu noivo, Francisco Neto, por todo amor, dedicação, conselhos e, principalmente, paciência. Obrigada por fazer eu me sentir sempre importante e apoiar todas as minhas escolhas e decisões.

À minha grande amiga Dra. Vânia Cristina, que por tantas vezes acreditou mais em mim que eu mesma, foi uma injeção ânimo constante com seu otimismo e luz, estando sempre presente em inúmeros momentos desafiadores.

Ao apoio, carinho e colaboração de Tereza Garcês durante toda essa caminhada, minha sincera gratidão.

Ao meu orientador Prof. Gustavo Portela Ferreira, pela credibilidade por ter me aceito como sua mestranda nessa instituição, preocupando-se em me passar segurança todas as vezes que temi não corresponder as exigências de uma linha de pesquisa completamente nova para mim. Agradeço a confiança, amizade, conselhos e paciência.

Aos membros da banca examinadora de qualificação e dissertação, Prof. Fuad Ahmad Hazime, Prof. Vinícius Saura Cardoso, Prof.<sup>a</sup> Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira, Prof. Marcelo de Carvalho Filgueiras, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Aos colegas do laboratório BIOMIC, Dacylla, Jaiane, Philipe, Juliana Queiroz, Prof. Thiago Nobre e todos aqueles que estiveram presentes em momentos de aprendizagem ou descontração nesse ambiente acadêmico. À Emanuela Barros pelos resultados compartilhados. Agradeço as oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal no convívio com vocês.

À Profa. Elyrose Sousa Brito Rocha, pela amizade, e gratidão pelos ensinamentos no início de minha vida acadêmica por ter sido a primeira a acreditar em mim. Embora o destino nos tenha traçado caminhos diferentes, ficaram as marcas de competência e respeito.

Ao Prof. José Tupinambá Sousa Vasconcelos, pelo grande apoio no tocante ao aspecto clínico deste trabalho, além das inúmeras palavras de incentivo e conselhos.

Ao Prof. Baldomero Kato por sua disponibilidade e auxílio, além dos pertinentes conselhos dados sempre que o procurei.

A todos os pacientes que participaram espontaneamente deste trabalho. Por causa deles é que esta dissertação se concretizou.

Aos amigos da Comunidade Católica Shalom e Promoção Humana pelas orações e aconselhamentos, importantes para meu fortalecimento espiritual e concretização desse momento. Sou muito grata a Deus pela vida de cada um de vocês.

À Universidade Federal do Piauí – Campus Ministro Reis Velloso que proporcionou meu aprendizado.

A FAPEPI - que me concedeu uma bolsa, durante a realização deste mestrado, contribuindo para a viabilização desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ninguém vence sozinho... Obrigada a todos!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	I
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	v
<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2.REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	03
<b>2.1 Arbovírus</b> .....	03
<b>2.2 Alfavírus</b> .....	04
2.2.1 <i>Chikungunya virus</i> .....	06
2.2.1.1 Epidemiologia .....	06
2.2.1.2 Diversidade Genética .....	07
2.2.1.3 Transmissão .....	08
2.2.1.4 Fisiopatogênese .....	09
2.2.1.5 Apresentação Clínica .....	10
2.2.1.6 Diagnóstico .....	14
2.2.1.7 Prevenção e controle .....	15
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	17
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
<b>4.1 Aspectos éticos legais</b> .....	18
<b>4.2 Coleta de amostras e obtenção de dados clínicos laboratoriais de pacientes positivos para CHIKV</b> .....	18
<b>4.3 Diagnóstico Molecular</b> .....	18
4.3.1 Seleção de amostras .....	18
4.3.2 Extração de RNA Viral e RT-PCR .....	19
4.3.3 Reação em Cadeia Polimerase .....	19
4.3.4 Visualização dos produtos amplificados .....	21
<b>4.4 Acompanhamento clínico dos pacientes positivos para CHIKV</b> .....	21
<b>4.5 Análise Estatística</b> .....	21
<b>5. RESULTADOS</b> .....	23
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42
<b>ANEXO I</b> .....	50
<b>ANEXO II</b> .....	53
<b>ANEXO III</b> .....	55
<b>APÊNDICE I</b> .....	57



## RESUMO

Os arbovírus estabelecem um grupo heterogêneo de vírus que se distinguem dos demais por apresentarem a peculiar capacidade de se multiplicarem tanto em vertebrados como em artrópodes susceptíveis, possuindo algumas características epidemiológicas em comum que lhe conferem um significativo papel na saúde pública. O *Chikungunya virus* (CHIKV), é o arbovírus causador da Febre Chikungunya, a qual indivíduos infectados podem apresentar uma grave e debilitante artralgia. Atualmente diversos relatos de manifestações clínicas ocasionadas por essa doença desafiam sua natureza branda. O diagnóstico precoce da CHIKV depende de testes moleculares durante a fase aguda da infecção para permitir o diagnóstico diferencial com outros arbovírus co-circulantes, como *Dengue virus* e *Zika virus* e alternativamente, a sorologia pode auxiliar no diagnóstico e fornecer informações epidemiológicas sobre surtos atuais e passados. O presente estudo tem como objetivo investigar a dinâmica de circulação do CHIKV no estado do Piauí, com ênfase na avaliação do perfil clínico de pacientes positivos por métodos moleculares e posterior caracterização. Neste trabalho foram analisadas amostras de soro de pacientes com sintomatologia clínica para arboviroses coletadas no Pronto Socorro Municipal de Parnaíba-PI (PSM), Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA) e Laboratório Central de Saúde Pública do Piauí (LACEN-PI). Portanto, o RNA foi extraído e em seguida convertida em cDNA por meio da técnica de Transcrição Reversa (RT) utilizando iniciadores aleatórios. Foram utilizados protocolos que codificam regiões das glicoproteínas E1, E2 e 6K do CHIKV. Posteriormente os pacientes positivos foram acompanhados por meio de questionário semiestruturado em intervalos temporais pré-definidos. Os dados foram tratados por análises univariadas e regressão logística modelo *stepwise* para verificar fatores de risco associados a artralgia persistente. Os resultados identificaram 184 pacientes positivos para CHIKV onde desses 68 evoluíram com perfil de cronicidade. Dentro da amostra de pacientes crônicos foi predominante o gênero feminino e idade superior a 49 anos. Sinais inflamatórios como rigidez e edema e as articulações periféricas foram as mais acometidas nesse período. Quando todos os fatores foram considerados simultaneamente em uma análise multivariada, as variáveis do modelo final de regressão foram capazes de explicar 11,9% da persistência da artralgia no período D90, 2,3% em D180 e 9,3% no período D>180 sendo fatores preditivos de fraca magnitude para artralgia crônica em CHIKV no grupo estudado. O desfecho clínico de uma paciente com polineuropatia periférica padrão axonal sensitivo-motora relacionada ao quadro de infecção viral evidenciou dentro do número amostral estudado o neurotropismo do vírus bem como a ocorrência de manifestações atípicas.

**Palavras-chave:** Arboviroses, *Chikungunya virus*, poliartralgia, RT-PCR

## ABSTRACT

Arboviruses establish a heterogeneous group of viruses that are distinguished from the others because they have the peculiar ability to multiply both in tissues of vertebrates and susceptible arthropods. They have some common epidemiological characteristics that confer a significant role in public health. The *Chikungunya virus* (CHIKV) is the arbovirus that causes Chikungunya fever, to which infected individuals may present a severe and debilitating arthralgia. Currently, several reports of clinical manifestations caused by this disease challenge its mild nature. Early diagnosis of CHIKV depends on molecular testing during the acute phase of the infection to allow differential diagnosis with other co-circulating arboviruses such as dengue and zika and alternatively, serology may aid in diagnosis and provide epidemiological information on current and past outbreaks. The present study aims to investigate the circulation dynamics of CHIKV, with emphasis on the evaluation of the clinical profile of positive patients by molecular methods and subsequent characterization. In the present study, serum samples from patients with clinical symptomatology for arboviruses collected at the Municipal Emergency Room of Parnaíba-PI (PSM), Dirceu Arcoverde State Hospital (HEDA) and the Central Laboratory of Public Health of Piauí (LACEN-PI) were analyzed. The RNA was extracted according to the manufacturer's protocol and then converted into cDNA by means of the Reverse Transcription (RT) technique using random primers. Protocols encoding CHIKV E1, E2 and 6K glycoprotein regions were used. Subsequently, the positive patients were followed up by means of a semi-structured questionnaire applied by phone calls and home visits at predefined time intervals. The data were treated by univariate analysis and logistic regression stepwise model to verify risk factors associated with persistent arthralgia. The results identified 184 CHIKV positive patients, of whom 68 evolved with a chronicity profile. Within the sample of chronic patients was predominant the female gender and age over 49 years. Inflammatory signs such as stiffness and edema and peripheral joints were the most affected in this period. When all factors were considered simultaneously in a multivariate analysis, the variables of the final regression model were able to explain 11.9% of the persistence of arthralgia in the period D90, 2.3% and D180 and 9.3% in the period D> 180 being predictive factors of low magnitude for chronic arthralgia in CHIKV in the studied group. The clinical outcome of a patient with sensory-motor axonal pattern peripheral polyneuropathy related to the viral infection showed within the sample number studied the neurotropism of the virus as well as the occurrence of atypical manifestations.

**Key Words:** Arboviruses, *Chikungunya virus*, polyarthralgia, RT-PCR

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Diagrama esquemático do genoma dos alfavírus e seus produtos gênicos. Adaptado de THIBERVILLE et al, 2013.	<b>05</b>
<b>Figura 02</b>	Distribuição de linhagens de CHIKV que estão associadas a surtos recentes em todo o mundo antes e depois do ano 2000. Adaptado de TANABE et al., 2018.	<b>08</b>
<b>Figura 03</b>	Patogênese da infecção pelo CHIKV: disseminação viral e impacto na resposta imune do hospedeiro. Adaptado de LUM et al, 2015.	<b>09</b>
<b>Figura 04</b>	Espectro clínico da chikungunya. Fonte: SVS/MS, 2017.	<b>11</b>
<b>Figura 05</b>	Características clínicas da doença nos pacientes com infecção pelo CHIKV. Adaptado de MINER et al, 2015.	<b>12</b>
<b>Figura 06</b>	Esquema representativo para detecção de amostras positivas para CHIKV por meio de testes moleculares e sorológicos durante os anos de 2017 e 2018	<b>23</b>
<b>Figura 07</b>	Fatores de risco para poliartralgia em pacientes no curso da doença crônica associada ao CHIKV no período D90 (n=13/68).	<b>27</b>
<b>Figura 08</b>	Fatores de risco para poliartralgia em pacientes no curso da doença crônica associada ao CHIKV no período D180 (n=28/68).	<b>27</b>
<b>Figura 09</b>	Fatores de risco para poliartralgia em pacientes no curso da doença crônica associada ao CHIKV no período D>180 (n=27/68).	<b>28</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Manifestações atípicas apresentadas na infecção por chikungunya. Adaptado de RAJAPAKSE et al., 2010.	13
<b>Tabela 02</b>	Sequência de iniciadores descritos por Porter e colaboradores (2004), Kumar e colaboradores (2007), e sequência de iniciadores desenhada para amplificação das regiões de interesse dos genes E1, E2 e a junção <i>E2-6K</i> com suas localizações e tamanhos dos produtos.	20
<b>Tabela 03</b>	Descrição e caracterização das variáveis estudadas	22
<b>Tabela 04</b>	Frequência de diagnósticos positivos por RT-PCR, sorologia IgM e ambos os testes por amostragem de dias referentes ao início dos sintomas.	24
<b>Tabela 05</b>	Características epidemiológicas dos pacientes com infecção crônica por chikungunya N=68	25
<b>Tabela 06</b>	Padrão de Acometimento Articular.	26
<b>Tabela 07</b>	Análise de regressão linear múltipla (modelo <i>stepwise</i> ), no período <i>D90</i> , para a variável dependente artralgia persistente (n=13/68).	29
<b>Tabela 08</b>	Análise de regressão linear múltipla (modelo <i>stepwise</i> ), no período <i>D180</i> , para a variável dependente artralgia persistente (n=28/68).	30
<b>Tabela 09</b>	Análise de regressão linear múltipla (modelo <i>stepwise</i> ), no período <i>D&gt;180</i> , para a variável dependente artralgia persistente (n=27/68).	31
<b>Tabela 10</b>	Correlação entre as variáveis explicativas e artralgia crônica por CHIKV (n=68).	

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AR** - Artralgia

**BIOMIC** – Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microrganismos e Plantas

**C** – Capsídeo

**CHIKV** – *Chikungunya virus*

**CHIKF** – Febre Chikungunya

**CN** – Características Neurotrópicas

**DENV** – *Dengue virus*

**DF** – Doença Febril

**DNA** – Do inglês *Deoxyribonucleic Acid*, traduz-se Ácido Desoxirribonucleico

**E** – Proteína de envelope

**ECSA** – Leste – centro- sul- africano

**EDTA** – Do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*, traduz-se ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA** – Do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, traduz-se Ensaio de Imunoabsorvância Ligado à Enzima

**HAS** – Hipertensão Arterial Sistêmica

**HEDA** – Hospital Estadual Dirceu Arcoverde

**IFN** - Interferon

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**LACEN** - Laboratório Central de Saúde Pública

**LIO** - Linhagem do Oceano Índico

**M** – Proteína de membrana

**MAYV** – *Mayaro virus*

**MMLV-RT** – Do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, traduz-se Transcriptase Reversa do Vírus da Leucemia Murina de Moloney

**NS1** – Do inglês, *Nonstructural Protein 1*, traduz-se proteína/antígeno NS1

**NT** – Nucleotídeos

**ORF** – Quadro de leitura aberta

**PCR** – Do inglês *Polymerase Chain Reaction*, traduz-se Reação em Cadeia da Polimerase

**PSM** – Pronto Socorro Municipal

**RNA** – Do inglês *Ribonucleic Acid*, traduz-se Ácido Ribonucleico

**RT-PCR** – Do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, traduz-se Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa

**SH** – Síndrome Hemorrágica

**SN** – Síndrome Neurológica

**TCLE** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**ZIKV** – *Zika virus*

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se observado a emergência uma nova categoria de agentes patogênicos, os vírus transmitidos por artrópodes, também conhecidos como arbovírus e considerados um dos principais causadores da doença febril humana, constituindo um significativo problema de saúde pública em todo o mundo (LIANG, et al. 2015; ALVA-URCIA et al., 2017; FRITZELL et al., 2018).

Os arbovírus apresentam uma alta capacidade de mutação e adaptação, lhes proporcionando a capacidade de causar surtos. Recentemente, essas infecções se tornaram sucessivas na América do Sul, especialmente em regiões tropicais, onde altas temperaturas e umidade favorecem a proliferação de mosquitos e, portanto, a transmissão de doenças causadas por esses vírus (ALVA-URCIA et al., 2017).

A população brasileira nos últimos 30 anos sofreu as consequências de uma epidemia de *Dengue virus* (DENV), a mais importante arbovirose mundial no que diz respeito à morbidade e ao impacto econômico, nesse contexto, somaram-se novas preocupações, como a partir de 2014 o alerta de casos de *Chikungunya virus* (CHIKV) e em 2015 a confirmação de infecções causadas pelo *Zika virus* (ZIKV) (AZEREDO et al., 2018).

O Estado do Piauí é considerado uma área hiperendêmica, onde circulam as quatro estirpes de DENV e outros arbovírus como CHIKV e ZIKV (SANTOS, 2012; VALE, 2015; GARCES, 2015; BARROS, 2018). Esse cenário demonstra a necessidade de um melhor entendimento da co-circulação dessas arboviroses, bem como do seu impacto na população suscetível.

A co-circulação de diferentes arboviroses no Brasil dificulta o manejo clínico em razão da similaridade de seus sintomas, por vezes idênticos, acarretando implicações na transmissão em idosos, grávidas e crianças pequenas, além de uma limitada retaguarda laboratorial (IOOS et al., 2014; ROTH et al., 2016; DONALISIO et al., 2017).

Diante dessa problemática, a utilização de métodos moleculares permite o estabelecimento de um diagnóstico rápido, sensível e diferencial para as arboviroses (BURT et al., 2012). Com isso, o monitoramento dessas doenças endêmicas e emergentes pode fornecer informações necessárias para a implantação de medidas políticas adequadas no controle de epidemias, uma maior vigilância da saúde pública e monitoramento das principais espécies circulantes.

O CHIKV é o arbovírus causador da Febre Chikungunya (CHIKF), caracterizada por causar em indivíduos infectados uma grave e debilitante artralgia, na qual a exacerbação da dor ao movimento em articulações previamente lesadas pode durar de meses a anos determinando a fase crônica da infecção (BURT et al. 2012; LANGSJOEN et al, 2016, SILVA, DERMODY, 2017).

Atualmente diversos relatos de manifestações clínicas ocasionadas pela CHIKF desafiam a natureza branda da doença (MOHAN, 2010; MEHTA et al., 2018). O surgimento de manifestações atípicas durante a infecção por CHIKV, tem sido associado clinicamente com a síndrome de Guillain - Barré, dor neuropática, encefalite, corroborando com a evidência de neurotropismo do vírus (FRED et al., 2018).

Diante das informações apresentadas e do cenário epidêmico instalado no Brasil e especificamente na região nordeste nos últimos anos torna-se necessário se pautarem estudos na perspectiva de associar a apresentação clínica do CHIKV e sua caracterização molecular, contribuindo para o entendimento das manifestações de maior gravidade e atípicas, importantes para o aprimoramento da qualidade do cuidado e para que seja avaliada a necessidade de intervenções terapêuticas que mudem o prognóstico da infecção na população, uma vez que a infecção pode ser uma causa potencial de incapacidade em doenças crônicas.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Arbovírus

A expressão “*arbovirus*” passou a ser utilizada em 1942 para representar um grupo de vírus que se propagou em artrópodes hematófagos e que eram transmitidos biologicamente a hospedeiros vertebrados. Formada pela primeira sílaba das duas palavras do vocabulário inglês “*arthropode-borne*” e acrescidas da palavra vírus, os arbovírus estabelecem um grupo heterogêneo, do ponto de vista de suas propriedades físico-químicas, possuindo, entretanto, algumas características epidemiológicas em comum (GUBLER, 2002; JOHNSON et al., 2012; GUBLER, VASILAKIS, 2016).

Constituindo o maior grupo de vírus conhecido, os arbovírus estão distribuídos em sete famílias, onde seis delas são compostas por agentes que têm como material genético o RNA (*Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae*) e apenas uma família composta por vírus de DNA (*Asfarviridae*) (HOLLIDGE et al., 2010). Destes, cinco famílias e nove gêneros se destacam como agentes patológicos para humanos e outros animais de sangue quente. As principais famílias e respectivos gêneros são: *Togaviridae* (Alfavírus), *Flaviviridae* (Flavivírus) *Bunyaviridae* (Bunyavírus), *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (FIGUEIREDO, 2007; RUST, 2012).

No ciclo de transmissão desses vírus, os mosquitos do gênero *Aedes*, especificamente *A. aegypti* e *A. albopictus*, são os principais responsáveis pela propagação de muitos arbovírus em todo o mundo. Os humanos são considerados hospedeiros terminais, no entanto existe um mecanismo de transição do ciclo enzoótico para um ciclo humano-mosquito-humano, onde os humanos se tornaram o principal hospedeiro amplificador dentro de um ciclo epidêmico urbano (CONWAY et al., 2014; PATTERSON; SAMMON, 2016; IRANPOUR et al., 2016).

Doenças causadas por arbovírus têm manifestações clínicas bastante diversificadas e podem variar também em termos de gravidade em relação ao hospedeiro humano. Há, entretanto, arboviroses causadas por agentes virais distintos e que desenvolvem quadros clínicos bastante similares, esses casos requerem atenção especial no diagnóstico diferencial (CHIA et al., 2010; DONALISIO et al., 2017). Contudo, as infecções por arbovirus também podem acontecer de forma

assintomática dificultando a detecção e controle epidemiológico dos vírus (WILDER-SMITH, 2016).

De acordo com as apresentações clínicas as arboviroses podem ser classificadas de quatro formas: doença febril (DF) indiferenciada, moderada ou grave, artralgia e erupções cutâneas (AR), síndrome neurológica (SN) e síndrome hemorrágica (SH). A DF geralmente se apresenta com sintomas semelhantes aos da gripe, como febre, cefaleia, dor retro orbital e mialgia. A SN pode manifestar-se como mielite, meningite e/ou encefalite, com mudanças de comportamento, paralisia, parestesia, convulsões e problemas de coordenação. A AR manifesta-se como exantema ou *rash* maculopapular, poliartralgia e poliartrite, enquanto que a SH é evidenciada pelas petéquias, hemorragia e choque combinado com uma redução intensa de plaquetas (LOPES et al., 2014).

Devido ao amplo espectro de síndromes clínicas associadas a essas infecções, a entrada de arbovirus como o CHIKV e ZIKV no Brasil e em outros países das Américas caracteriza um risco potencial a população, uma vez que todos os indivíduos são susceptíveis, não existem vacinas disponíveis como método profilático e não há um tratamento satisfatório estabelecido. Dessa forma, a introdução desses arbovírus em países já endêmicos para dengue, como o Brasil, pode ter como consequência o colapso nos serviços de saúde durante epidemias explosivas simultâneas (CHANCEY et al., 2015; LIMA-CAMARA, 2016, VIEIRA et al., 2018).

Além disso, os desdobramentos da associação desses arbovírus em um mesmo paciente ainda não são amplamente conhecidos, uma circunstância possível de ocorrer por estes coabitarem, muitas vezes, a mesma região geográfica e serem transmitidos pelos mesmos vetores (ROTH, 2014; RODRIGUEZ-MORALES, 2015). No Brasil, é provável que possíveis coinfeções não estejam sendo identificadas ou diagnosticadas erroneamente, uma vez que os testes moleculares para todos os arbovírus geralmente não são realizados em laboratórios de saúde pública (AZEREDO et al., 2018).

## 2.2 Alfavírus

O gênero *Alphavirus* é um membro da família *Togaviridae*, fazendo parte do grupo de vírus de RNA de sentido positivo envelopado. Existem atualmente 31 espécies reconhecidas, nas quais a divergência dos alfavírus é marcada pelos vírus

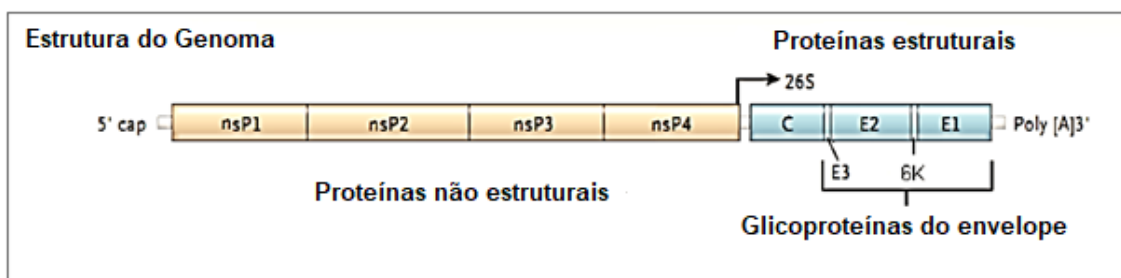
do Novo Mundo e do Velho Mundo, que surgiram após múltiplas introduções geográficas e reintroduções (NASAR et al., 2012; FORRESTER et al., 2012; RUPP et al., 2015).

Relacionados a infecções em humanos, classicamente, os alfavírus artrálgicos do Velho Mundo como o CHIKV causam uma infecção incluindo sinais clínicos como febre alta, dor de cabeça, mialgia, artralgia, erupção maculopapular, edemas, dores abdominais e em alguns casos encefalite. Os alfavírus encefálicos do Novo Mundo como o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), o vírus da encefalite equina oriental (EEEV) e o vírus da encefalite equina ocidental (WEEV), são responsáveis por distúrbios do sistema nervoso central (SNC), incluindo encefalite grave (SALIMI et al., 2016; RONCA et al., 2016; GIRY et al., 2017).

Os vírions apresentam aproximadamente 70 nm de diâmetro, com um genoma composto de duas janelas abertas de leitura (ORF) que codificam poliproteínas estruturais e não estruturais. Quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) são necessárias para a transcrição e replicação do RNA viral, e três proteínas estruturais principais (proteína C e glicoproteínas do envelope E2 e E1) estão envolvidas em processos como adsorção, penetração, montagem de vírions e brotamento (**Figura 1**) (HYDE et al., 2015).

Dependendo das espécies de alfavírus, as proteínas virais E3, 6K ou TF (**Figura 1**) também podem estar presentes, mas estas não são necessárias para que a partícula seja infecciosa (MARTINEZ; KIELIAN et al., 2016; BROWN; KIELIAN, 2018). O RNA subgenômico 26S é traduzido para originar a poliproteína precursora das proteínas estruturais (C-Pe2-6K-E1) as quais em etapas replicativas tardias posteriores, se tornarão proteínas estruturais maduras (CHEVILLON et al., 2008).

**Figura 1.** Diagrama esquemático do genoma dos alfavírus e seus produtos gênicos.



**Fonte:** Adaptado de WEAVER e LECUIT, 2015.

A proteína capsídica é multifuncional, nos alfavírus encefálicos do Novo Mundo está envolvida no fechamento dos processos transcricionais do hospedeiro, enquanto em alfavírus artrítogênico do Velho Mundo parecem não estar envolvidas neste processo. Em vez disso, os vírus artrítogênico do Velho Mundo dependem da nsP2 para induzir o fechamento transcricional e do hospedeiro (GARMASHOVA et al., 2007; WONG; CHU, 2018).

A emergência dos alfavírus está sujeita a muitos determinantes. A adaptação do vírus pode resultar em uma nova espécie hospedeira por meio de alterações genéticas e refletir a possibilidade de ultrapassarem as barreiras das espécies e promoverem novos ciclos de transmissão. Na ocasião de surgimento de um novo alfavírus, um painel extenso de testes de detecção específicos de patógenos pode ser difícil de configurar (COFFEY et al., 2013; ALLISON et al., 2015; GIRY et al., 2017).

Atualmente, não existem terapias antivirais licenciadas para o tratamento de infecções por alfavírus, mas existem candidatos promissores inibidores da síntese ou regulação viral e terapias com anticorpos. Várias vacinas estão em testes clínicos, embora até o momento não exista vacinas de alfavírus licenciadas (JIN et al., 2015; ERASMUS et al., 2016; DA SILVA JUNIOR et al., 2017; BROWN; KIELIAN, 2018).

## 2.2.1 *Chikungunya virus*

### 2.2.1.1 Epidemiologia

O CHIKV foi identificado pela primeira vez durante uma epidemia de poliartralgia febril na Tanzânia em 1953. Desde então, tem sido relatado vários surtos em grande escala na África, Índia, Sudeste Asiático, Pacífico Ocidental e Américas. Antes de 2000, os surtos de febre chikungunya eram na maior parte esporádicos e limitados, mas, depois disso, o vírus tem sido frequentemente causador de formas graves de epidemias, impondo pesadas cargas econômicas e perda de produtividade (ROOSENHOFF et al., 2016; BURT et al., 2017, HOSSAIN et al., 2018).

Nas Américas, a transmissão autóctone do CHIKV foi detectada pela primeira vez na Ilha de St. Martin em outubro de 2013 e rapidamente se espalhou para outras regiões nos meses seguintes. Os primeiros casos autóctones no Brasil foram confirmados em Oiapoque, no estado do Amapá, em 13 de setembro de 2014. Sete dias depois, casos autóctones também foram confirmados em Feira de Santana, Bahia (TEIXEIRA et al., 2015; NUNES et al., 2015).

Esse cenário epidêmico manteve-se até meados de 2017, a partir de então, passou a ocorrer uma propagação mais lenta com ocorrência de surtos mais dispersos. Segundo dados do Ministério da Saúde brasileiro, até o início do quarto trimestre de 2018, foram registrados 80.010 casos prováveis de FC havendo 33 óbitos confirmados laboratorialmente. Em 2017, no mesmo período, foram 189 mortes, a redução é de 57% em relação a 2017, quando foram registrados 185.593 casos de infecção por CHIKV em todo o país. (BRASIL, 2018).

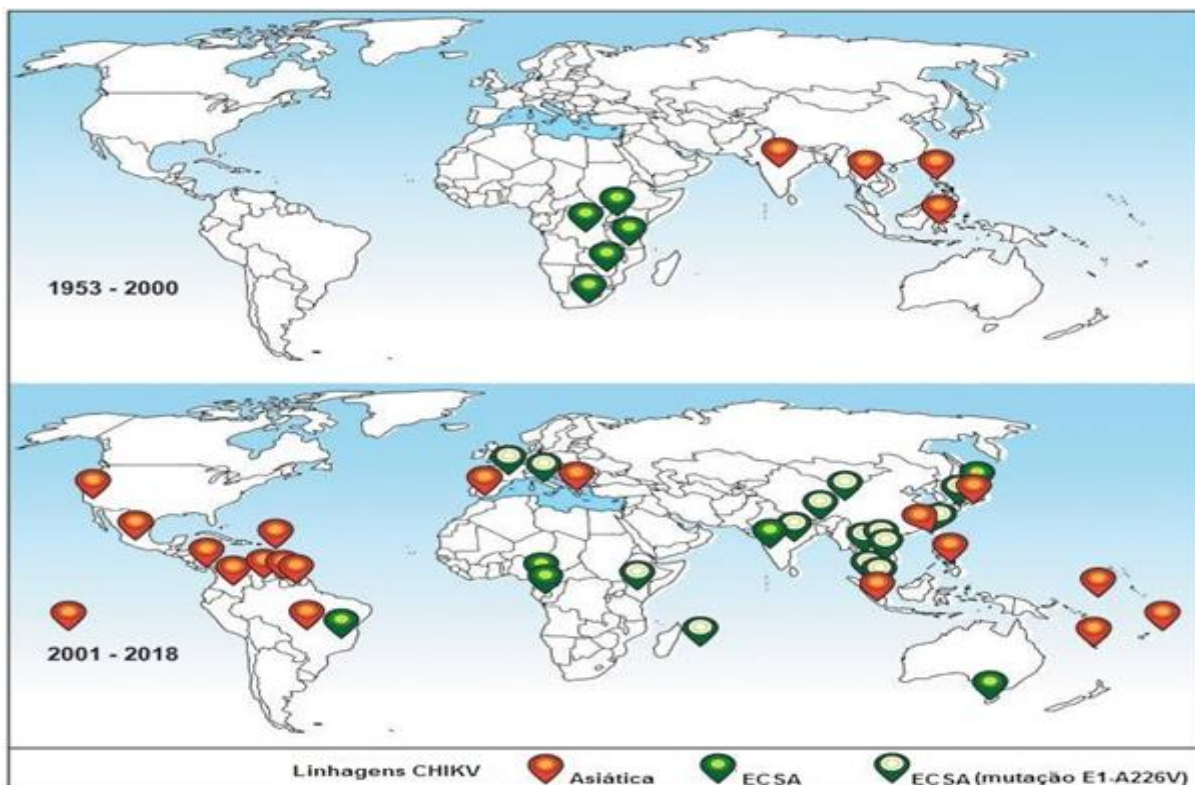
Dados do MS (2017) mostraram que a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis da doença (141.363; 76,6%) em relação ao país. O estudo de Barros (2018) corroborou com essas estimativas mostrando o perfil de endemicidade do CHIKV no ano de 2017 no estado do Piauí, evidenciando sua co-circulação com outros arbovírus.

#### 2.2.1.2 Diversidade Genética

Atualmente três genótipos do CHIKV foram identificados desde a sua descoberta. Os genótipos leste-centro-sul-africano (ECSA) e oeste africano são endêmicos e causam epidemias na África subsaariana, enquanto o genótipo asiático circula em *Ae. aegypti* - ciclos de transmissão urbano no Sudeste Asiático (**Figura 2**). A linhagem do Oceano Índico (LIO) derivada da linhagem ECSA, surgiu do surto de La Réunion e causou epidemias explosivas nas ilhas do Oceano Índico e na Ásia entre 2005 e 2011 (COFFEY et al., 2014; CHEN et al., 2016).

Esta nova linhagem teve a substituição A226V da proteína E1, que junto com outras mutações, permitiu a infecção de mosquitos *A. albopictus* em maior extensão (KUMAR et al, 2008; GALÁN – HUERTA et al., 2018). Nas américas, a propagação inicial de casos autóctones foi devido ao genótipo asiático, mas o genótipo ECSA também foi detectado circulando no Brasil em 2014 (TEIXEIRA et al., 2015).

**FIGURA 2.** Distribuição de linhagens de CHIKV associadas a surtos recentes em todo o mundo antes e depois do ano 2000.



Ícone laranja – linhagem asiática; ícone verde – linhagem leste/central/ sul-africana (ECSA); ícone verde com um círculo branco – ECSA com uma mutação A226V na glicoproteína do envelope E1, esta linhagem é algumas vezes referida como linhagem do Oceano Índico. **Fonte:** Adaptado de Tanabe et al, 2018.

### 2.2.1.3 Transmissão

O CHIKV é transmitido em dois ciclos diferentes: urbano e silvestre. O ciclo urbano refere-se à transmissão de humano para mosquito para humano, enquanto a transmissão silvestre é de primatas para mosquito para humano. O ciclo silvestre é a principal forma de manutenção na África. O CHIKV em outras áreas mais densamente povoadas é primariamente mantido em um ciclo urbano, no qual os humanos agem como os principais hospedeiros e os mosquitos do gênero *Aedes* atuam como vetores (GANESAN et al, 2017).

Também pode ocorrer a transmissão materno-fetal no período intraparto, o que resulta em altas taxas de morbidade infantil, sendo especialmente deletéria quando a mãe está infectada até quatro dias que antecedem o parto (GERÁRDIN et al, 2008; GERÁRDIN et al, 2014). Acredita-se que a introdução ocasional do vírus em áreas urbanas cause surtos periódicos da doença. Pouco se sabe sobre os fatores que contribuem para a manutenção natural do CHIKV, mas a compreensão dos

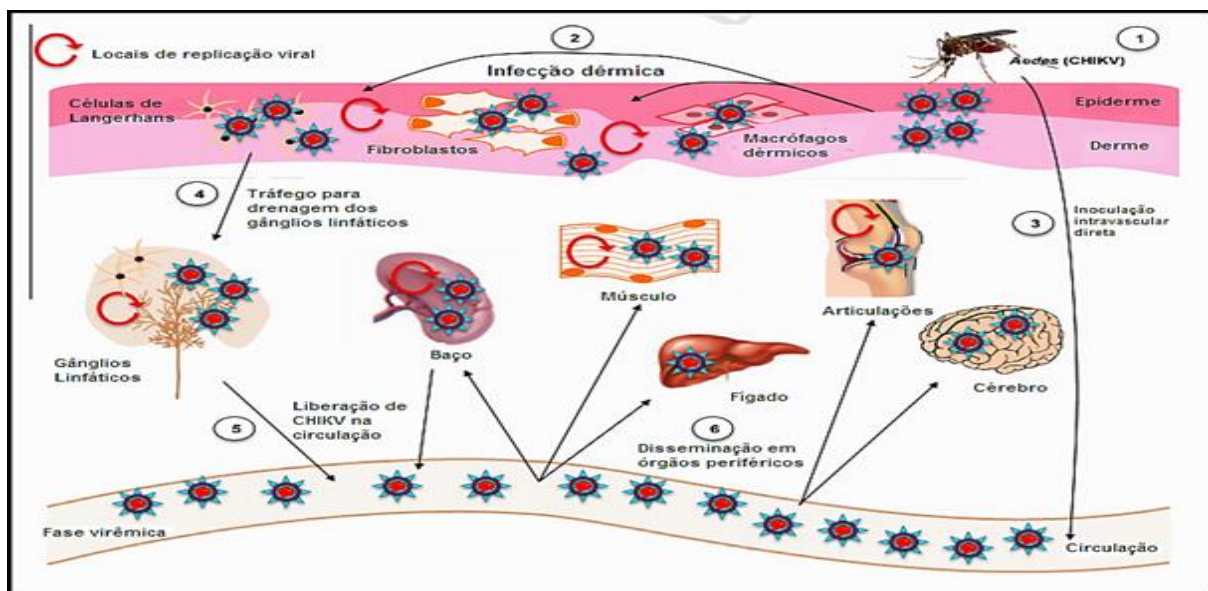
catalisadores que promovem a manutenção e a difusão do CHIKV é essencial para combater o surgimento e disseminação do vírus (SILVA; DERMORDY, 2017).

#### 2.2.1.4 Fisiopatogênese

Durante a infecção, ocorre a inoculação intradérmica do CHIKV que adentra os capilares subcutâneos presentes na derme e se replica nos fibroblastos, macrófagos dérmicos, células dendríticas e possivelmente nas células endoteliais (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Estudos mostram que a saliva do *A. aegypti* possui propriedades anticoagulantes e anti-inflamatórias que auxiliam na proliferação do CHIKV na derme, inibindo a resposta antiviral local (WICHIT et al, 2017).

A resposta imune inicia poucas horas após a infecção, sendo o vírus capaz de sobrepor a resposta e alcançar a corrente sanguínea (COUDERC et al, 2008). Durante este período de incubação que leva de 3 a 7 dias, observa-se um aumento substancial da carga viral em diversos órgãos como linfonodos, fígado, rins, incluindo cérebro, músculos e articulações (**Figura 3**), podendo chegar à titulação de  $10^{10}$  cópias/mL no plasma (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013; ROOSENHOFF et al., 2016).

**Figura 3.** Patogênese da infecção pelo CHIKV



(1) Disseminação viral e impacto na resposta imune do hospedeiro; (2) A infecção pelo CHIKV ocorre pela picada de um mosquito infectado, resultando em uma fase de infecção dérmica; (3) Células residentes na pele ficam infectadas, permitindo as rodadas iniciais de replicação; (4) Inoculação direta de vírus na circulação também pode ocorrer através de picadas de mosquito; (5) Posteriormente, o vírus se dissemina para a drenagem dos linfonodos, onde se replica antes de ser liberado na circulação; (6) Em seguida, ele se dissemina para órgãos periféricos, como o baço e músculos, onde ocorre replicação adicional. **Fonte:** Adaptado de LUM et al., 2015.

A infecção aguda provoca uma resposta inflamatória em tecidos infectados, caracterizada por uma extensa infiltração, principalmente de macrófagos e monócitos, mas também neutrófilos, células NK e linfócitos em tecidos-alvo, além do aumento do número de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. A replicação viral e as respostas imunes do hospedeiro causam mialgia e poliartralgia em articulações distais. A doença cônica do CHIKV é provavelmente mediada por vírus e inflamação persistentes (TANABE et al., 2018).

Dentro da articulação cronicamente infectada, a presença continuada de um subgrupo de células infiltrantes (principalmente macrófagos, monócitos e linfócitos) e mediadores pró-inflamatórios específicos (IL-6, IL-8 e MCP-1) no líquido sinovial provavelmente contribuem para o prolongamento da doença inflamatória, local onde a persistência viral pode durar por cerca de 1 ano. O revestimento interno das articulações sinoviais é formado por células sinoviais semelhantes a macrófagos e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, e os últimos são conhecidos por serem importantes para a patogênese da artrite reumatoide, dessa forma assemelhando a patologia articular crônica do CHIKV com a doença reumática (SILVA; DERMODY, 2017).

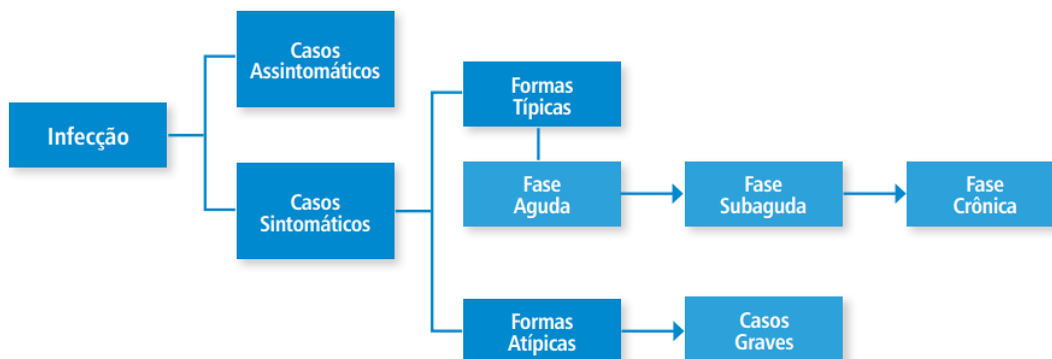
O cérebro é conhecido por ter sua própria resposta imune inata. Como vem sendo observado, embora os sintomas neurológicos sejam incomuns, eles podem ser graves, particularmente em recém-nascidos (AMDEKAR et al, 2017). Diante disso, estudos experimentais corroboram com a evidência de neurotropismo do CHIKV e acoplamento de uma resposta imune inata multifacetada de astrócitos, microglia e células dendríticas residentes. No entanto, permanece incerto se os sintomas neurológicos são devidos à persistência do vírus ou resposta imune inadequada (FRED et al., 2018).

#### 2.2.1.5 Apresentação clínica

O espectro clínico da CHIKF é amplo (**Figura 4**). Os sintomas podem surgir entre quatro a sete dias após a infecção e a doença pode evoluir em três fases: aguda, subaguda e crônica. Após o período de incubação inicia-se a fase aguda ou febril, que dura até o décimo quarto dia. Na fase aguda, os indivíduos apresentam febre alta, calafrio, cefaleia, náusea, vômito, fadiga, dor nas costas, mialgia e artralgia simétrica (JAVELLE et al., 2015; WONG; CHU, 2018).



**Figura 4.** Espectro clínico da febre chikungunya



**Fonte:** SVS/MS, 2017.

Na fase aguda, o vírus está normalmente presente nas áreas onde os sintomas são relatados. O CHIKV é capaz de infectar tanto as células progenitoras do músculo esquelético como os fibroblastos nos tecidos conectivos dos músculos e articulações, onde reside uma alta densidade de terminações nervosas nociceptivas (SILVA, DERMODY, 2017). Casos assintomáticos são considerados raros, representando de 3 a 5% dos infectados (AZEVEDO et al., 2015).

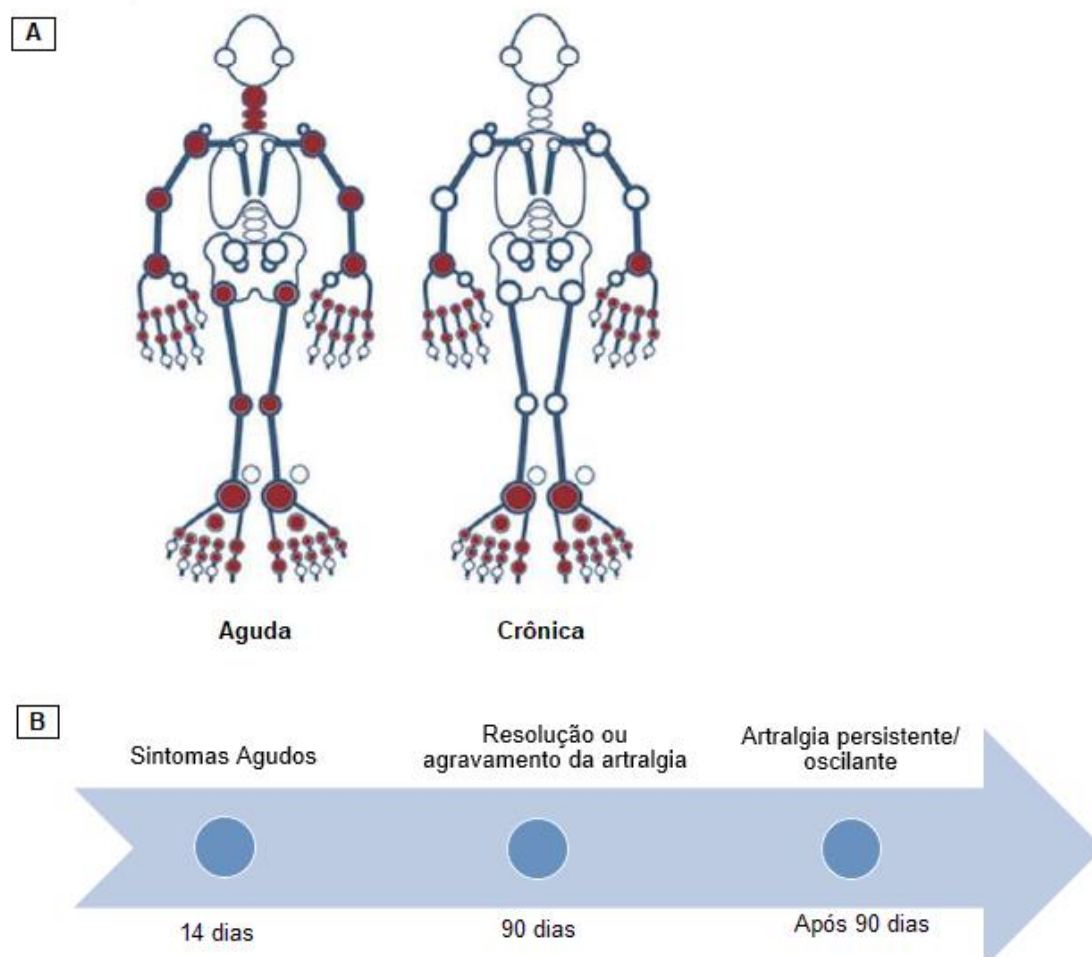
Alguns pacientes evoluem com persistência das dores articulares após a fase aguda, caracterizando o início da fase subaguda, com duração de até 3 meses. Nestas fases, algumas manifestações clínicas podem variar de acordo com o sexo e a idade. Exantema, vômitos, sangramento e úlceras orais parecem estar mais associados ao sexo feminino. Dor articular, edema e maior duração da febre são mais prevalentes quanto maior a idade do paciente (BURT et al, 2012; MS/SVS, 2017).

Durante a fase subaguda a febre normalmente desaparece, podendo haver persistência ou agravamento da artralgia. O comprometimento articular costuma ser acompanhado por edema de intensidade variável. Podem ocorrer também astenia, recorrência do prurido generalizado e exantema maculopapular, além do surgimento de lesões purpúricas, vesiculares e bolhosas. Alguns pacientes podem desenvolver doença vascular periférica, fadiga e sintomas depressivos. Se os sintomas persistirem por mais de três meses, após o início da doença, estará instalada a fase crônica (NASCI, 2014; WHITE et al., 2018).

O padrão de comprometimento articular crônico pode ocorrer na forma de oligo ou poliartralgia persistente ou recidivante, geralmente simétrica e de intensidade variável, predominando em punhos, mãos, tornozelos e joelhos, associados a rigidez

matinal e edema articular (**Figura 5 AB**). Mesmo pacientes que apresentam melhoria significativa inicial podem cursar com recidivas, com intervalos que podem variar de uma semana a anos, com sintomas variáveis e com comprometimento das mesmas articulações acometidas previamente (SIMON et al., 2015; BRITO et al., 2017).

**Figura 5.** Características clínicas da doença nos pacientes com infecção pelo CHIKV



Representação utilizando Discus Homúnculo do Google Analytics, do envolvimento das articulações de pacientes com base em história na fase aguda e exame médico na fase crônica da infecção. **B** – Linha do tempo que descreve o início dos sintomas agudos, resolução ou agravamento da artrite ao longo do tempo. **Fonte:** Adaptado de MINER et al., 2015.

As apresentações atípicas da infecção por CHIKV podem envolver quase todos os sistemas de órgãos, como visto na (**Tabela 1**), sendo as manifestações extra articulares mais comuns relatadas na literatura aquelas que relacionadas ao sistema nervoso e ocular. Alterações no trato gastrointestinal, fígado, rim, músculos, membranas mucosas e células da pele e hematológicas têm sido evidenciadas, assim

como nos processos de hemostasia e coagulação. O comprometimento cardiovascular quando acometido geralmente têm desfechos fatais (RAJAPAKSE et al., 2010; GERARDIN et al., 2016; ALVAREZ et al., 2017).

Tabela 1. Manifestações atípicas apresentadas na infecção por CHIKV

SISTEMA/ÓRGÃO	MANIFESTAÇÕES
Nervoso	Meningoencefalite, encefalopatia, convulsão, Síndrome de Guillain-Barré, Síndrome cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias.
Olho	Neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite e uveíte.
Cardiovascular	Miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmia e instabilidade hemodinâmica.
Pele	Hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses vesiculobolhosas e ulcerações aftosa-recorrentes.
Rins	Nefrite e insuficiência renal aguda.
Outros	Discrasia sanguínea, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético e insuficiência adrenal.

**Fonte:** Adaptado de RAJAPAKSE et al., 2010.

A infecção por CHIKV pode causar apresentações clínicas graves, não apenas em pacientes idosos ou em pacientes de alto risco, mas também em pacientes mais jovens com histórico médico normal. A mortalidade dos casos graves pode chegar a 48% e o CHIKV tem sido fortemente associado a dramáticas complicações neurológicas, hepáticas e cardíacas. Formas clínicas graves estão associadas à presença de várias condições médicas subjacentes como doenças respiratórias ou cardiovasculares em cerca de 90% dos casos (TORRES et al, 2014).

Idosos representam um grupo com risco aumentado de progressão mais grave da infecção por CHIKV havendo relatos de casos fatais com descrição de insuficiência hepática com subsequente colapso cardiovascular e deterioração neurológica e pulmonar seguida por falência múltipla de órgãos, no entanto a infecção por CHIKV pode causar apresentações clínicas graves também em pacientes mais jovens com histórico médico normal (CHIA et al., 2010; HOZ et al., 2015).

Os casos mais graves, embora raros, são aqueles que envolvem de complicações neurológicas. Além disso, há alguns casos de CHIKV causando abortos e complicações neonatais como encefalopatia neonatal após transmissão materno-fetal (TORRES et al., 2016; AMARAL; SCHOEN, 2018; FRED et al., 2018).

### 2.2.1.6 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico de infecções virais podem ser classificados como virológicos (diretos) e sorológicos (indiretos), sendo empregados de acordo com a cinética da viremia e com a resposta de anticorpos (PEELING et al, 2010; BURT et al., 2012). São exemplos de métodos virológicos e sorológicos respectivamente, o isolamento viral por detecção molecular por meio de “*Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction*” (RT-PCR) e os ensaios “*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*” (ELISA) para a detecção de antígenos (BRONZONI et al., 2005; GUZMAN, et al. 2010; TANG, et al. 2012).

O diagnóstico clínico é desafiador, já que os sinais e sintomas da CHIKF podem se sobrepor ao de outras doenças. Achados laboratoriais como níveis elevados de transaminases, leucocitose, trombocitopenia e creatinina elevada estão previamente associados à infecção por CHIKV em adultos, no entanto, sendo resultados inespecíficos, não são suficientes para definir o diagnóstico (HSU et al, 2019). Além disso, inicialmente é indicado a detecção de RNA viral pela técnica de biologia molecular RT-PCR em amostras de soro, plasma ou líquido cefalorraquidiano (LCR) obtidas nos primeiros dias de manifestação sintomática (entre o 1º e 5º dia), oferecendo maior sensibilidade nos resultados (BRONZONI et al., 2005; MARDEKIAN e ROBERTS, 2015).

Pacientes infectados com CHIKV respondem com a produção de anticorpos na fase inicial da doença, podendo ser detectadas concentrações de imunoglobulina M (IgM) no início da infecção bem como imunoglobulina G (IgG) anti-CHIKV, neutralizantes, na segunda semana da doença. Os anticorpos são importantes para a depuração da infecção viral. Os anticorpos neutralizantes persistem por ao menos 21 meses e provavelmente por anos protegendo contra novas infecções por CHIKV (BURT et al. 2017).

Embora o teste de isolamento viral seja importante para identificar as etiologias da doença, os resultados dependem de níveis de viremia que são suficientes apenas para detecção durante os primeiros dias de infecção. Na ausência de viremia, ELISA e testes de neutralização de redução de placa podem ser usados para detectar anticorpos específicos de vírus, mas esses métodos não são passíveis de análise de alto rendimento, e testes de vírus vivos podem exigir um nível de biossegurança (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015; JOHNSON et al., 2016). No Brasil o diagnóstico é

realizado conforme a classificação de risco, diante de um caso suspeito de febre chikungunya, são solicitados exames específicos (PCR/sorologia), o hemograma deve ser solicitado obrigatoriamente para os pacientes do grupo de risco, e com bioquímica como transaminases, creatinina e eletrólitos para os pacientes com sinais de gravidade e pacientes com critérios de internação. Na ausência dessas condições, a solicitação fica a critério médico (BRASIL, 2017).

Estudos realizados Bandeira e colaboradores (2016) detectaram presença de CHIKV na urina após 30 dias dos sintomas iniciais, contrastando com achados da literatura que mostravam não haver detecção do CHIKV na urina após a primeira semana do início dos sintomas. Isso poderia fornecer uma janela ampliada para o diagnóstico de uma infecção recente com o CHIKV.

Em países que vivenciam epidemias de CHIKF, os clínicos devem estar familiarizados com a possibilidade de ocorrência de casos atípicos e graves da doença, e incluindo métodos diagnósticos complementares que permitam a detecção precoce do comprometimento de órgãos-alvos. Esse conhecimento pode ajudar a melhorar o gerenciamento das manifestações clínicas prevenindo o desencadeamento de incapacidades e óbitos (TORRES et al, 2014).

Em regiões onde o CHIKV apresenta caráter endêmico o diagnóstico diferencial torna-se um grande desafio, uma vez que suas manifestações clínicas podem ser confundidas com uma sintomatologia de rotina apresentada por outras patologias (MINER et al, 2015). A sobreposição de sintomas entre as arboviroses desafiam o diagnóstico preciso com base nas manifestações clínicas e a detecção direta é limitada à fase aguda da infecção (BOZZA et al, 2019). Alterações como leucopenia, neutropenia e linfopenia assim como na infecção por CHIKV, também podem ocorrer durante o curso de outras arboviroses, como a dengue, estando relacionadas à virulência do genótipo envolvido na infecção e características associadas ao hospedeiro, como a presença de comorbidades, imunodepressão e idade (FERREIRA et al., 2010).

#### 2.2.1.7 Prevenção e controle

A maior ênfase no controle do CHIKV está voltada para o desenvolvimento de vacinas eficazes, no entanto, atualmente algumas opções terapêuticas têm sido abordadas, como o uso de compostos antivirais tradicionais, síntese de compostos

moduladores de resposta imune, testes de eficácia com medicamentos existentes e a utilização de anticorpos monoclonais terapêuticos, como uma tentativa de atenuar o caráter endêmico e o impacto econômico que o vírus tem estabelecido em diversas populações (TANABE et al, 2018).

O tratamento combinado com anticorpos monoclonais e medicamentos antirreumáticos, tem sido uma alternativa inovadora no controle da doença causada pelo CHIKV. Um estudo utilizando essa associação em modelo murino mostrou que o tratamento foi capaz de eliminar completamente o edema e a infecção viral, o que corresponde a uma opção terapêutica para uma variedade de doenças infecciosas (POWERS et al, 2017).

As drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) funcionam modulando vários aspectos das respostas imunes e inflamatórias, controlando a atividade da doença e prevenindo sua progressão (RAVINDRAN; ALIAS, 2016). Esses medicamentos são considerados poupadores de corticoides minimizando seu uso prolongado além de outras classes como os anti-inflamatórios não-esteroides (AINEs) usados principalmente para controlar os sintomas. Dessa forma, o uso da terapia combinada com Metotrexato tem sido indicada e estudos demonstraram redução mais rápida da atividade da doença, a melhora satisfatória no funcionamento físico e menos evidências radiográficas de progressão de danos (BERGSTRÄ et al, 2017).

De acordo com Chen e colaboradores (2018), a associação de curtos ciclos de corticosteroide beneficia pacientes com desordens musculoesqueléticas associadas ao CHIKV, reduzindo o fenômeno inflamatório e bloqueando o processo imunológico. O Metotrexato tem sido amplamente utilizado no tratamento da chikungunya devido a observação da presença de monócitos e macrófagos no tecido sinovial de pacientes crônicos, possivelmente pela persistência do vírus nessa localidade (BEDOUI et al, 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Investigar a dinâmica de circulação do CHIKV, com ênfase na avaliação do perfil clínico de pacientes confirmados por métodos moleculares, na cidade de Parnaíba-PI no período de 2017 a 2019.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Detectar CHIKV em amostras clínicas de soro por RT-PCR, utilizando iniciadores específicos e ELISA
- Verificar a hipótese que variáveis inerentes a história e apresentação clínica podem ser fatores preditores para artralgia persistente em pacientes infecção confirmada por CHIKV.
- Analisar a correlação estatística de forma individual e em conjunto, de fatores de risco associado ao perfil de cronicidade do CHIKV.
- Investigar a ocorrência de manifestações atípicas e casos graves associados a infecção por CHIKV como encefalites e neuropatias.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Éticos e Legais**

A pesquisa foi realizada mediante aprovação do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí a Resolução nº466/12 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde), que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos.

### **4.2 Coleta de amostras e obtenção de dados clínicos-laboratoriais dos pacientes**

Foram coletadas amostras de soro de pacientes com sintomatologia clássica para arboviroses, atendidos no Laboratório do Pronto Socorro Municipal (PSM) de Parnaíba, Hospital Estadual Dirceu Arcoverde (HEDA) e Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Costa Alvarenga (LACEN-PI), durante o período de 2017 a 2019.

As amostras foram armazenadas em freezer -70°C no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Microrganismos e Plantas (BIOMIC), localizado na Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, para posterior análise. As informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes atendidos em Parnaíba foram obtidas por meio de aplicação de questionário semiestruturado (**Anexo II**) diretamente com o paciente, após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo I**).

### **4.3 Diagnóstico molecular**

#### **4.3.1 Seleção de amostras**

Para o teste de identificação viral foram descartadas amostras que apresentarem mais de 7 dias de sintomas e quando os mesmos não forem sintomas sugestivos para CHIKF. Não serão selecionadas amostras que apresentarem sorologia IgG para CHIKV ou com quantidades insuficientes de soro para detecção viral.

#### **4.3.2 Extração de RNA Viral e RT-PCR**

O RNA viral foi extraído a partir das amostras de soro utilizando o QIAamp® Viral RNA Mini Kit conforme instruções do fabricante. Após esta etapa é realizada a



reação de Transcrição Reversa (RT), onde o RNA viral é convertido em DNA complementar (cDNA) por meio da ação de uma enzima denominada Transcriptase Reversa.

O protocolo selecionado utiliza os Random Hexamers, que correspondem a oligodesoxirribonucleotídeos de sequências curtas e aleatórias, que se ligam a qualquer região do RNA e permitem a síntese de cDNA. Este protocolo ocorre em duas etapas: na primeira etapa, 10 µl de RNA molde e 5 µl de Random Hexamers (50 µM) são incubados no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) a 25°C por 10 min e 70°C por 5 min.

Após serem retiradas do termociclador, as amostras são armazenadas no gelo por 2 minutos para evitar a formação de dímeros. Na segunda etapa são adicionados 5 µl de Tampão da enzima (5X), 5 µl de dNTP (10mM) e 1 µl de MMLV (200U/ µl), obtendo-se um volume final de 26 µl, quando os mesmos são novamente incubados a 37°C por 60 min e 85°C por 5 min.

#### 4.3.3 Reação em Cadeia Polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase promove a amplificação dos fragmentos de interesse por ação da enzima Taq DNA polimerase. Nesta etapa são utilizados protocolos para amplificação da região do gene escolhida do vírus que se deseja pesquisar. Para detecção de CHIKV foram empregados três protocolos para amplificação de regiões dos genes que codificam as glicoproteínas E1, E2 e E2-6K.

Foram utilizados os iniciadores CHIKV-F e CHIKV-R descritos por Kumar et al (2007), que se anelam em regiões específicas do gene que codifica a glicoproteína estrutural de envelope E1, resultando em um produto de 330 pb. Para detecção da região que codifica a glicoproteína E2, utiliza-se uma nested PCR com os iniciadores descritos por Porter et al (2004), realizada em duas etapas, na primeira são utilizados os iniciadores JM1 e JM2, que geram um produto final de 240 pb. Na segunda etapa são utilizados os iniciadores JM3 e JM4, resultando em um produto final de 200 pb. Sequências de oligonucleotídeos foram selecionados para a amplificação específica de fragmentos dos genes E2-6K, resultando em um produto de 618 pb. As descrições detalhadas das sequências de iniciadores são descritas na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Sequência de iniciadores descritos por Porter e colaboradores (2004), Kumar e colaboradores (2007), e sequência de iniciadores desenhada para amplificação das regiões de interesse dos genes E1, E2 e a junção *E2-6K* com suas localizações e tamanhos dos produtos

INICIADORES	SEQUÊNCIA (5'- 3')	GENE	PRODUTO
DVRChk-F	ACCGGCGTCTACCCATTCATGT	E1	330pb
DVRChk-R	GGGCGGGTAGTCCATGTTCTAGA		
JM1-F	GCAGACGCAGAGAGGGCCAG	E2	240pb
JM2-R	CGTGCTGCAAGGTAGTTCTC		
JM3-F	GCTATTTGTAAGAACGTCAG		
JM4-R	TACCGTGCTGCGGTCGCCAA		
E2-6K-F	GAGCTACCGTCCCTTTCCTG	E2-6K	618pb
E2-6K-R	GCGGTATGAGCCCTGTATGC		

**Fonte:** do autor

Nos protocolos de Porter e colaboradores (2004) e Kumar e colaboradores (2007) para um volume final de 25 µl são adicionados: 2,5 µl de tampão (10x), 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,4 µl de dNTPs (10mM), 0,2 µl de primer forward (10 pmol/ µL), 0,2 µl de primer reverse (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17,25µl de H<sub>2</sub>O estéril e 3 µl de cDNA para cada amostra.

No protocolo padronizado no laboratório BIOMIC foi estabelecido para um volume final de 25 µl a adição de 2,5µl de tampão (10x), 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,5µl de dNTPs (10mM), 0,3µl de primer forward (10 pmol/ µL), 0,3 µl de primer reverse (10pmol/µl), 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl), 17µl de H<sub>2</sub>O estéril e 3 µl de cDNA para cada amostra. Depois de misturados, os reagentes são incubados no termociclador Thermal Cyclers (Amplitherm®) e submetidos a diferentes etapas conforme estabelecidos pelos autores.

O ciclo estabelecido para reação de Porter e colaboradores (2004) consiste nas etapas de desnaturação inicial por 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 55°C por 30 seg; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 10 min. São utilizados 2,5ul do produto da primeira etapa em uma segunda reação com os primers JM3 e JM4, utilizando os mesmos parâmetros e condições da primeira reação.

Para a reações de Kumar (2007) foram realizadas etapas de desnaturação inicial por 5 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de amplificação (94°C por 45 seg; 58°C

por 30 seg; 72°C por 1 min) e de uma extensão final a 72°C por 30 min. Na reação implementada no laboratório BIOMIC foram utilizadas as mesmas etapas, modificando apenas a temperatura de anelamento, utilizando 55°C por 30 segundos.

#### 4.3.4 Visualização dos produtos amplificados

Os produtos da PCR e um marcador de tamanho molecular (“Ladder” – 100pb) serão submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com GelRed®. A eletroforese é realizada em cuba horizontal preenchida com tampão TBE 1x (tris + ácido bórico + EDTA), em corrente de 120 V por período de 40 min. Em seguida os fragmentos amplificados serão visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no transluminador L-PIX (Loccus Biotecnologia) para posterior análise visual.

#### 4.4 Acompanhamento clínico dos pacientes positivos para CHIKV

Participaram do acompanhamento clínico pacientes positivos para CHIKV por RT-PCR ou sorologia IgM realizada pelo LACEN- PI, o grupo será submetido a entrevistas através de telefonemas e visitas domiciliares. Os dados clínicos de todos os pacientes foram recolhidos sistematicamente após a fase de sintomas agudos durante os dias D90, D180 retornando contato após D180, a fim de monitorar a tendência de manifestações clínicas e cronicidade. O potencial de recidivas e permanência dos sintomas foi observado durante entrevista.

Um questionário semiestruturado contruído pelo autor e colaboração de Barros (2018) (**Anexo III**) foi utilizado para recolher informações sobre persistência dos sintomas, presença de comorbidades, principais membros/articulações acometidas, terapêutica utilizada e registro de manifestações atípicas. Para indivíduos com idade inferior a 15 anos, responderão os pais ou responsáveis legais.

#### 4.5 Análise Estatística

Para identificação dos sintomas mais frequentes, comorbidades relacionadas e a persistência dos sinais entre os casos positivos para CHIKV, os dados foram inseridos em planilha e realizada estatística descritiva dos sintomas utilizando o software IBM SPSS Statistics 21.0. As variáveis contínuas foram resumidas em medianas e intervalos interquartil, enquanto as variáveis categóricas serão expressas como contagens e porcentagens (Quadro. O *Odds ratios* (OR) com 95% -IC foram calculados para identificar fatores de risco em modelos univariados de regressão logística. Foram selecionadas as variáveis (**Tabela 3**) que tiveram na correlação de

*Spearman* um  $p < 0,20$  para posterior interpretação da magnitude das correlações de acordo com os valores de coeficientes de correlação *Beta* em modelos ajustados de regressão logística multivariada do tipo *Stepwise*. Para todas as análises foi considerado um alfa de 5% para significância estatística.

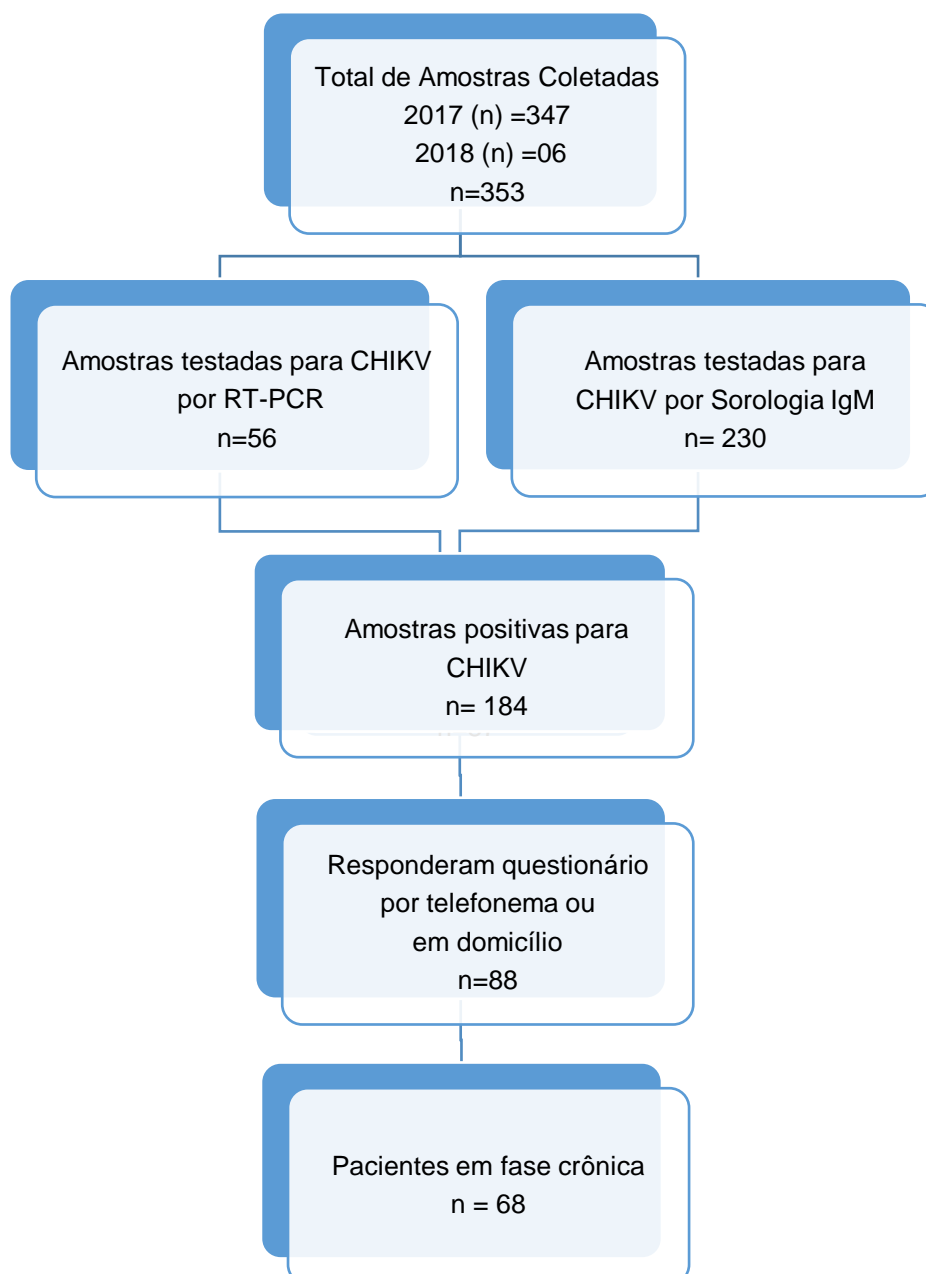
**Tabela 3.** Descrição e caracterização das variáveis estudadas

VARIÁVEL	TIPO	CATEGORIA DE ANÁLISE
<b>Dependente</b>		
<b>Artralgia Persistente</b>	Categórica Nominal	1- Presente 2- Ausente
<b>Independentes</b>		
<b>Gênero</b>	Categórica nominal	1- Masculino 2- Feminino
<b>Idade</b>	Contínua	Não se aplica
<b>Sintomas</b>	Categórica Nominal	1- Edema nas articulações 2- Dormência 3- Manifestações cutâneas 4- Mialgia 5- Rigidez Matinal 6- Déficit de concentração
<b>Comorbidades</b>	Categórica Nominal	1- HAS 2- Diabetes 3- Doenças Reumáticas Prévias 4- Autoimunes 5- Obesidade 6- Outras comorbidades

## 5. RESULTADOS

Durante os anos de 2017 e 2018 foram coletadas 353 amostras (**Figura 6**) de soro de pacientes com sintomatologia clássica de infecção por arboviroses, das quais após serem considerados critérios de exclusão pré-estabelecidos foram realizados de testes sorológicos e moleculares para detecção de pacientes positivos para CHIKF e posterior acompanhamento clínico.

**Figura 6.** Esquema representativo para detecção de amostras positivas para CHIKV por meio de testes moleculares e sorológicos durante os anos de 2017 e 2018



Para realização de testes moleculares foram selecionadas um total de 56 amostras, submetidas a extração de RNA viral e testadas por RT-PCR para CHIKV utilizando os protocolos descritos por Porter e colaboradores (2004) e Kumar e colaboradores (2007). Posteriormente, as amostras foram testadas utilizando iniciadores desenhados no laboratório BIOMIC que amplificam uma região da junção dos genes E2-6k com um produto de 618 pb.

A infecção pôde ser confirmada em um total de 184 (52,1%) amostras, das quais 170 (92,4%) foram positivas por sorologia IgM com uma média de 11,8 dias de sintomas até a realização do teste e 14 (7,6%) por RT-PCR em um intervalo de tempo médio de 3,9 dias do início dos sintomas, 04 (2,2%) pacientes tiveram resultado positivo por ambos os testes em uma média de 4,8 dias de queixas clínicas, conforme apresentado na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Frequência de diagnósticos positivos por RT-PCR, sorologia IgM e ambos os testes por amostragem de dias referentes ao início dos sintomas.

TESTE DIAGNÓSTICO	N (AMOSTRAS)	MÉDIA [MÍN-MAX] (DIAS DE SINTOMAS)
RT-PCR	14/56	3,9 [02-05]
Sorologia IgM	170/230	11,8 [03-44]
RT-PCR e IgM	04/14	4,8 [04-05]

Após a constatação dos pacientes positivos para CHIKV, foram realizadas entrevistas de acompanhamento no período de agosto de 2017 a agosto de 2018. Dessa forma 88 (47,8%) pacientes com diagnóstico confirmado para CHIKV responderam o questionário semiestruturado de cronicidade e permitiram o acompanhamento clínico. Para traçar o perfil de cronicidade, o grupo foi composto por aqueles que apresentaram artralgia persistente nos intervalos D 90, D180 e D>180 do início dos sintomas. Permaneceram dentro desse critério 68 pacientes que compuseram o número amostral deste estudo.

A idade média encontrada foi de 46,0 anos (IQR 33,3-57,6 anos) com prevalência do sexo feminino (79,4%) em relação ao masculino (20,6%). Concernente às apresentações clínicas, as comorbidades mais prevalentes foram doenças reumáticas prévias (25,0%) e HAS (19,1%), embora tenha se destacado o relato de outras comorbidades (51,5%) como doenças respiratórias ou que envolvem outros

sistemas do corpo não contempladas no questionário. Com relação aos sintomas contínuos, pôde-se observar de forma predominante a presença de edema nas articulações (64,7%), queixa de rigidez matinal (54,4%) e dormência (44,4%) em membros distais. Outro sintoma relatado foi o déficit de concentração (26,5%) conforme mostrado na **Tabela 5**.

**Tabela 5.** Características epidemiológicas dos pacientes com infecção crônica por febre chikungunya N=68

<b>IDADE (MÉDIA [IQR])</b>	46,0	[33,3-57,6]
0-19 anos	29	15,7
20-40 anos	69	37,5
41-60 anos	73	39,7
>60 anos	13	7,1
<b>GÊNERO</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Masculino	14	20,6
Feminino	54	79,4
<b>HISTÓRIA CLÍNICA</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
HAS*	13	19,1
Diabetes	05	7,4
Doenças Reumáticas Prévias	17	25,0
Doenças Autoimune	04	5,9
Obesidade	06	8,8
Outras comorbidades	35	51,5
<b>SINTOMAS</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Edema nas articulações	44	64,7
Dormência	30	44,1
Manifestações cutâneas	10	14,7
Mialgia	16	23,5
Rigidez matinal	37	54,4
Déficit de concentração	18	26,5
<b>ABSENTEÍSMO</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Limitação nas AVD**	45	66,2
Afastamento do trabalho	35	51,5
Tratamento Medicamentoso	62	91,2

\*Hipertensão Arterial Sistêmica; \*\*AVD – Atividades de vida diária.

Apesar de geralmente não ser fatal, a dolorosa natureza debilitante da infecção pelo CHIKV e seu impacto na produtividade são visíveis, nesse estudo 66,2% dos pacientes afirmaram que a dor incapacitou a realização de AVD e 51,5% precisaram solicitar afastamento do trabalho. Foi observado que 91,2% dos pacientes fizeram uso de algum medicamento analgésico, antipirético ou anti-inflamatório durante o curso dos sintomas (**Tabela 5**).

O espectro clínico dos pacientes que evoluíram para fase crônica da doença demonstrou que múltiplas articulações foram simetricamente acometidas (72,4%), com isso, membros periféricos como joelhos (72,1%), tornozelos (72,1%), pés (72,1%) e dedos dos pés (72,1%) em mesma proporção, seguidos de mãos (69,1%), dedos das mãos (67,6%) sendo os mais afetados pela artralgia persistente de acordo com a

**Tabela 6.**

**Tabela 6.** Padrão de Acometimento Articular (n=68)

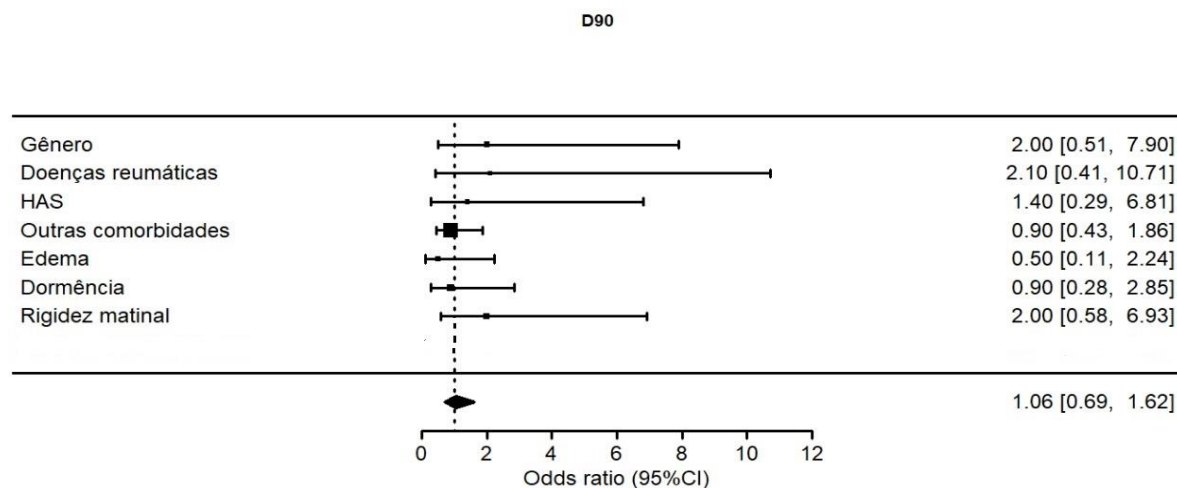
<b>ARTICULAÇÕES AFETADAS</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Mãos	47	69,1
Dedos das mãos	46	67,6
Punhos	37	54,4
Cotovelos	13	19,1
Ombros	15	22,1
Quadril	8	11,8
Joelhos	49	72,1
Tornozelos	49	72,1
Pés	49	72,1
Dedos dos pés	49	72,1

A artralgia recorrente foi observada em 65,5% dos pacientes que referiam o retorno das dores articulares em um intervalo em média de 5 a 10 dias. Houve um relato de recorrência da artralgia aproximadamente 4 meses da interrupção dos sintomas.

Vários fatores podem estar associados a artralgia de longa duração após a CHIKF ou até mesmo relacionados a gravidade da doença. A partir da análise das frequências descritas anteriormente inferimos sobre aquelas que apresentaram relação de risco com a persistência da artralgia nos pacientes participantes do estudo.

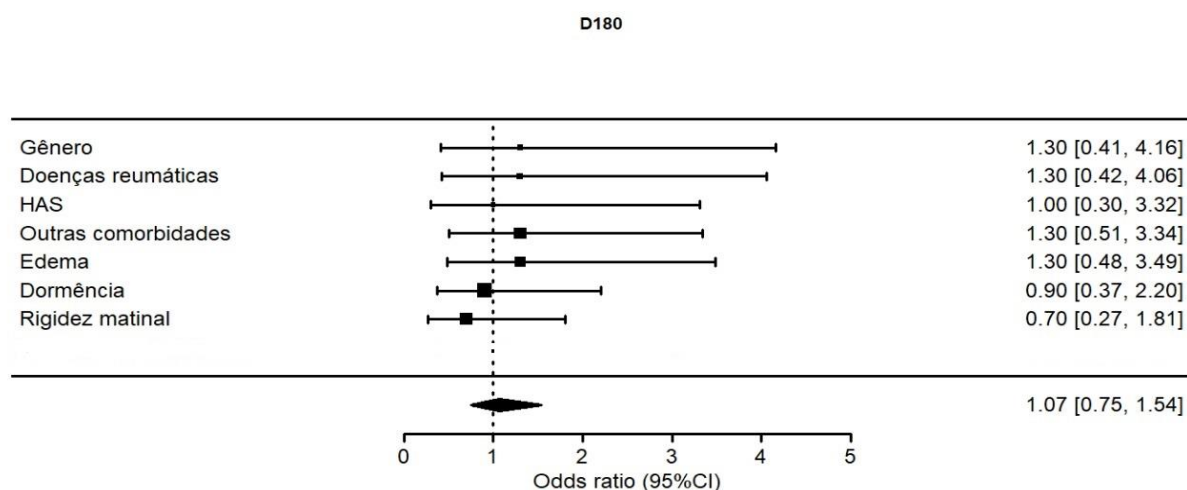


**Figura 7.** Fatores de risco para poliartralgia em pacientes no curso da doença crônica associada ao CHIKV no período D90 (n=13/68).



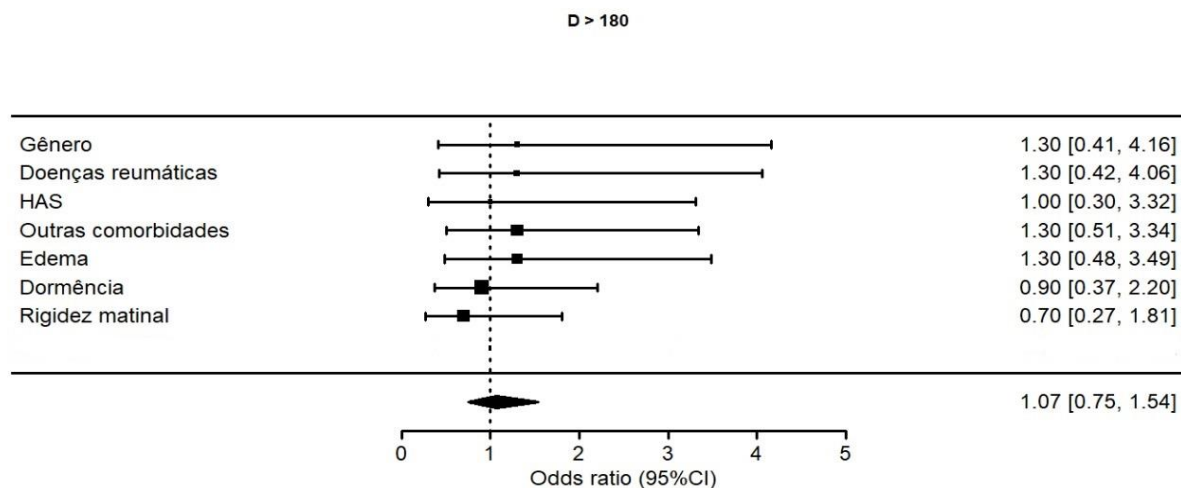
Para controlar o confundimento foi realizada Regressão Logística Univariada, foi considerado variáveis com valor de  $p > 0,20$ .

**Figura 8.** Fatores de risco para poliartralgia em pacientes no curso da doença crônica associada ao CHIKV no período D180 (n=28/68).



Para controlar o confundimento foi realizada Regressão Logística Univariada, foi considerado variáveis com valor de  $p > 0,20$ .

**Figura 9.** Fatores de risco para poliartralgia em pacientes no curso da doença crônica associada ao CHIKV no período D>180 (n=27/68).



Para controlar o confundimento foi realizada Regressão Logística Univariada, foi considerado variáveis com valor de  $p > 0,20$ .

**Tabela 7.** Análise de regressão linear múltipla (modelo *stepwise*), no período D90, para a variável dependente artralgia persistente (n=13/68).

<b>Modelo</b>	<b>Variáveis explicativas</b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Constante</b>	<b>Beta</b>	<b>p</b>
1	Gênero	0,000	0,020	1,978	-0,140	0,263
2	Gênero	0,000	0,092	1,663	-1,16	0,338
	Idade				0,271	0,028
3	Gênero	0,000	0,095	1,717	-0,102	0,424
	Idade				0,261	0,039
	Rigidez matinal				-0,54	0,676
4	Gênero	0,000	0,111	1,625	-0,133	0,310
	Idade				0,253	0,045
	Rigidez matinal				-0,050	0,696
	Presença de edema articular				0,130	0,298
5	Gênero	0,000	0,117	1,701	-0,131	0,318
	Idade				0,258	0,043
	Rigidez matinal				-0,061	0,640
	Presença de edema articular				0,143	0,263
	Dormência				-0,079	0,530
6	Gênero	0,001	0,126	1,458	-1,34	0,310
	Idade				0,304	0,031
	Rigidez matinal				-0,064	0,627
	Presença de edema articular				0,142	0,267
	Dormência				-0,069	0,583
	HAS				0,109	0,428
7	Gênero	0,007	0,131	1,334	-0,145	0,279
	Idade				0,340	0,030
	Rigidez matinal				-0,077	0,567
	Presença de edema articular				0,139	0,280
	Dormência				-0,055	0,670
	HAS				0,083	0,569
	Doenças reumáticas prévias				0,094	0,577

**Tabela 8.** Análise de regressão linear múltipla (modelo *stepwise*), no período D180, para a variável dependente artralgia persistente (n=28/68).

<b>Modelo</b>	<b>Variáveis explicativas</b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Constante</b>	<b>Beta</b>	<b>p</b>
1	Gênero	0,000	0,002	1,625	-0,047	0,706
2	Gênero Idade	0,000	0,002	1,592	-0,046 0,015	0,717 0,904
3	Gênero Idade Rigidez matinal	0,000	0,011	1,463	-0,073 0,034 0,100	0,580 0,796 0,457
4	Gênero Idade Rigidez matinal Dormência	0,001	0,015	1,363	-0,077 0,028 0,109 0,063	0,565 0,828 0,426 0,626
5	Gênero Idade Rigidez matinal Dormência HAS	0,026	0,016	1,296	-0,078 0,038 0,109 0,065 0,023	0,565 0,792 0,432 0,619 0,871
6	Gênero Idade Rigidez matinal Dormência HAS Doenças Reumáticas Prévias	0,031	0,019	1,429	-0,068 0,008 0,119 0,054 0,045 -0,077	0,623 0,958 0,399 0,689 0,769 0,662

**Tabela 9.** Análise de regressão linear múltipla (modelo *stepwise*), no período  $D > 180$ , para a variável dependente artralgia persistente (n=27/68).

<b>Modelo</b>	<b>Variáveis explicativas</b>	<b>p</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Constante</b>	<b>Beta</b>	<b>p</b>
1	Idade	0,000	0,060	1,962	-0,245	0,047
2	Idade Gênero	0,000	0,080	1,744	-0,233 0,141	0,059 0,250
3	Idade Gênero Rigidez matinal	0,000	0,083	1,820	-0,244 0,157 -0,061	0,054 0,220 0,640
4	Idade Gênero Rigidez matinal Outras comorbidades	0,000	0,083	1,817	-0,244 0,157 -0,061 0,003	0,057 0,224 0,643 0,984
5	Idade Gênero Rigidez matinal Outras comorbidades HAS	0,000	0,093	2,109	-0,290 0,160 -0,057 0,001 -0,109	0,041 0,218 0,667 0,993 0,429
6	Idade Gênero Rigidez matinal Outras comorbidades HAS Doenças Reumáticas Prévias	0,000	0,093	2,100	-0,288 0,159 -0,058 0,001 -0,111 0,006	0,067 0,230 0,670 0,992 0,451 0,969

Os dados mostraram fatores preditivos de fraca magnitude para artralgia crônica em CHIKV na população estudada, quando ajustados a um modelo final de regressão logística para predizer artralgia persistente em um período de 90 dias ou mais de sintomas.

Ao considerar simultaneamente todas as variáveis em uma análise multivariada (**Tabelas 7, 8, 9**), os modelos finais de regressão foram capazes de explicar 11,9% da persistência da artralgia no período D90, 2,3% nem D180 e 9,3% no período D>180.

Analisando-se os valores do coeficiente de determinação *beta*, conforme cada período estudado obteve-se um valor de associação positivo para os seguintes modelos: D90 (idade, presença de edema articular, HAS, doenças reumáticas prévias); D180 (idade, rigidez matinal, dormência, HAS); >180D (gênero, doenças reumáticas prévias e outras comorbidades) foram associados positivamente com a evolução crônica da infecção por CHIKV.

A avaliação das variáveis dentro dos modelos univariado e multivariado possibilitou uma comparativa quanto as chances desses sintomas determinarem a artralgia crônica na infecção por CHIKV isoladamente ou como características potenciais dentro de um grupo de sintomas associados. Nessa perspectiva foram observados os seguintes resultados:

Tabela 10. Correlação entre as variáveis explicativas e artralgia crônica por CHIKV (n=68).

Variável	Resultado Global
Idade	Multivariada: <i>Beta</i> positivo nos períodos D90 (0,340) e D>180 (0,008)
Gênero	Univariada: <i>OR</i> maior em D90 (2,00). Multivariada: <i>Beta</i> positivo em D>180 (0,159).
Edema	Univariada: <i>OR</i> maior em D90(0,50). Multivariada: valor de <i>Beta</i> maior em D90(0,139)
Rigidez Matinal	Univariada: <i>OR</i> maior em D90 (2,00) Multivariada: valor de <i>Beta</i> maior em D180(0,119)
Dormência	Univariada: <i>OR</i> maior em D180 (0,90) Multivariada: valor de <i>Beta</i> maior em D180 (0,054)
Comorbidades	Univariada: Doenças reumáticas prévias: <i>OR</i> maior em D90 (2,10). Multivariada: Doenças reumáticas prévias valores de <i>Beta</i> maiores em D90 (0,094) e D>180 (0,006).

Considerando como uma variável contínua o intervalo de faixa etária de maior frequência dentre os pacientes com perfil de cronicidade foi a entre 41-60 anos.

Durante o acompanhamento clínico destacou-se o caso da paciente 217-17, positiva molecularmente para CHIKV que evoluiu para fase crônica com persistência dos sintomas por aproximadamente 6 meses. Obteve o desfecho clínico de polineuropatia periférica padrão axonal sensitivo-motora relacionada ao quadro de infecção viral. Diante da relevância desse caso foi escrito o artigo intitulado “Peripheral polyneuropathy associated with infection by *Chikungunya virus*” submetido no *Journal of Neuro Virology* e aceito para publicação (**Apêndice I**).

## 6. DISCUSSÃO

O alto impacto na saúde pública e econômico causado pelo CHIKV nos últimos anos e o conhecimento do risco de complicações dos quadros clínicos e manifestações atípicas têm suscitado a necessidade de intensificar ações de vigilância, com a finalidade de detectar novos casos de CHIKF, além do reconhecimento oportuno de agravamentos e conseqüentemente, a possibilidade de interferir nos determinantes para conter a ocorrência de óbitos.

Após o surto de CHIKV em La Reunion, em 2005, vários estudos começaram a discutir o papel da infecção viral e seu comportamento após a fase aguda. Um estudo recente apresentou um caso de infecção pelo vírus complicado por rabdomiólise, uma complicação rara da infecção, no entanto o paciente se recuperou sem intercorrências recebendo alta da internação (ELFERT et al, 2019). Khatri e colaboradores (2018) mostraram um caso de encefalomielite associado a infecção por CHIKV com apresentação de quadriparesia e retenção urinária. O paciente foi tratado com 5 doses de imunoglobulina intravenosa juntamente com cuidados de suporte com os quais mostrou recuperação parcial. Amaral e Schoen (2018) relataram um paciente com CHIKF bem caracterizada, seguido por artrite crônica associada ao vírus, também apresentando características extra articulares, incluindo a síndrome de Felty.

Atualmente o Brasil apresenta uma incidência de CHIKF de 7,4 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2019), no entanto nos últimos anos o país enfrentou uma grande epidemia que conforme o perfil do vírus de provocar artralgia persistente, essas implicações tendem a ocorrer por longos períodos. Dessa forma, esse trabalho consistiu no estudo de casos de infecções por CHIKV confirmados durante os anos de 2017-2018 no Estado do Piauí, nos permitindo avaliar a contribuição relativa de testes moleculares e sorológicos para o devido diagnóstico de CHIKV em fase aguda, além de uma descrição detalhada da apresentação clínica, detecção de casos atípicos e mensuração de fatores de risco para artralgia crônica pós CHIKF.

O CHIKV replica rapidamente para altos títulos no hospedeiro, e o RNA viral geralmente pode ser detectado por métodos moleculares na primeira semana após o início da doença (JOHNSON et al, 2017). Nesse estudo (**Tabela 4**), os pacientes positivos por RT-PCR foram detectados em amostras clínicas com uma média de 3,9 dias de sintomas, corroborando com o período estimado pela PAHO (2014), que atribuiu o intervalo de 1-8 dias para detecção do vírus por RT-PCR. O menor número



de amostras detectadas pelo método, 7,6%, pode estar relacionada a sensibilidade do método, qualidade da amostra e nível de viremia do paciente.

Conforme estabelecido pela PAHO (2014), a sorologia IgM pode ser considerada em um intervalo de 4 a 60 dias, no entanto de acordo com o CDC (2016), o soro coletado no prazo de 7 dias do início da doença pode não ter anticorpos IgM específicos do vírus detectáveis. Nas amostras testadas observamos a presença de anticorpos IgM na detecção de 92,4% dos casos em um intervalo médio de sintomas de 11,8 dias.

A maior proporção de casos virêmicos foi observada na média de 4,8 dias (**Tabela 4**) sendo possível encontrar resultados positivos por ambos os testes nesse período. No estudo de Okabayashi e colaboradores (2015) a carga viral mediana variou de  $2,9 \times 10^4$  a  $1,6 \times 10^8$  PFU / ml durante os dias 1 a 4 do período de viremia, e 70% dos pacientes com CHIKF visitaram o hospital durante os primeiros 4 dias após o início dos sintomas.

As características demográficas da população em estudo mostraram uma maior representação do gênero feminino (79,4%) e de indivíduos de meia-idade (IQR 33,3-57,6 anos), dados que corroboram com estudos atuais (DUVIGNAUD et al, 2018; FRED et al, 2018). Além disso, outros autores fizeram a relação bivariada entre sexo feminino e idade avançada (acima de 45 anos) encontrando associação positiva com o desenvolvimento de artrite crônica relacionada ao CHIKV (GÉRARDIN et al., 2013; ESSACKJEE et al., 2013; ARROYO-ÁVILA et al., 2017).

Ao analisarmos fatores de risco associados a persistência da artralgia, foi possível evidenciar a idade acima >40 anos como predominante nos grupos com maior tempo de sintomas (**Tabela 5**), sendo uma variável que se destacou em todos os períodos estudados, D90, D180, D>180, como fator de predição para artralgia persistente. Delgado-Enciso e colaboradores (2017), que trataram sobre os fatores de risco associados a artralgia severa em fases aguda e crônica da CHIKF apresentou resultados consonantes, apontando um risco aumentado de artralgia de alta intensidade durante o estágio crônico em pacientes  $\geq 40$  anos de idade.

Com relação ao gênero feminino, como fator de risco associado a dor persistente, observou-se uma razão de chances superior no período D90 (**Figura 7**), indicando que mulheres de fato são mais suscetíveis a infecção pelo CHIKV,

entretanto, o gênero feminino não esteve fortemente associado ao perfil de artralgia persistente a longo prazo.

De acordo com estudos de Heath e colaboradores (2018), o sexo feminino aumentou o risco de artralgia crônica, embora perdendo por pouco o limite de significância, semelhante ao que ocorreu nesse estudo, durante análise de regressão múltipla mostrando no modelo multivariado  $D > 180$  um valor de beta positivo (0,159) conforme modelo 6 da regressão multivariada descrita na **Tabela 9,10** mostrando que as mulheres correm maior risco de artrite / artralgia persistente que os homens durante a infecção por CHIKV.

Gerardin e colaboradores (2013) em uma análise bivariada, demonstrou que o gênero feminino tendeu a estar associado a artralgia persistente, e a força desta associação foi modulada pelo nível da resposta humoral, que se verificou ser muito mais elevada no gênero feminino que no masculino ( $p < 0,001$ ), esta diferença pode ser devido à mudança natural induzida pelo estrogênio em direção ao perfil de citocinas Th2 para promover a produção de anticorpos em mulheres e ao efeito inibitório da diidrotestosterona (DHS) em mulheres, além da maior produção de IL-10 imunossupressora, que se correlaciona positivamente com DHS e negativamente com títulos séricos de IgG em pacientes masculinos com outras infecções virais.

Bonifay e colaboradores (2018) observou que comorbidades como história de insuficiência cardíaca ou respiratória, história de hipertensão e uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) antes da hospitalização apresentavam alto risco de complicações ou morte. Godaert e colaboradores (2018) não encontrou diferenças significativas entre os pacientes que foram ou não a óbito e o índice de comorbidade.

De acordo com Dorléans e colaboradores (2018) a comorbidade pode estar associada à gravidade, encontrando maior proporção de comorbidade em casos graves em comparação com outros, sendo o diabetes relatado em 29% dos casos clínicos graves. Economopoulou e colaboradores (2009) na ilha de Reunião mostrou que de 610 casos atípicos observados, 546 (89%) tinham condições médicas subjacentes respiratórias ou cardiovasculares e hipertensão sendo associadas com maior risco de desenvolver doença grave. Já a diabetes mellitus, apesar de ser comumente relatada como uma doença subjacente, não foi encontrado para aumentar o risco de doença grave ou morte.

Diversos fatores podem estar fortemente associados ao risco de chikungunya crônica, incluindo, gravidade da doença aguda e presença de doença articular anterior (GERARDIN et al, 2013; BOUQUILLARD et al, 2018). Observamos que a presença de doenças reumáticas prévias, HAS e outras comorbidades apresentaram fraca associação a persistência da dor a longo prazo, sendo as doenças reumáticas prévias apresentando maior razão de chances no período de sintomas D90 (**Figura 7**).

Rahim e colaboradores (2015), uma história de doença reumática anterior a infecção por CHIKV aumentou a probabilidade de incapacidade grave por mais de 2 vezes em pacientes com dor persistente. Sissoko e colaboradores (2009) associaram condições pré-existent de osteoartrite à persistência da artralgia. Os principais achados em nossa pesquisa após análise de regressão linear múltipla, confirmam a incidência em nível populacional de artralgia persistente pós CHIKV em diferentes variáveis e os valores prognósticos de idade avançada (41-60 anos), doenças reumáticas prévias assim como outras comorbidades como doenças metabólicas ou que envolvam outros sistemas foram capazes de prever a evolução crônica da infecção por CHIKV.

A contribuição da comorbidade subjacente tem sido considerada um pré-requisito para dor crônica em CHIKV, Gerardin e colaboradores (2013) demonstraram que distúrbios reumáticos associados a artralgia crônica CHIKV quando associados a um ou mais componentes da síndrome metabólica (obesidade, diabetes mellitus tipo 2, hipertensão ou dislipidemia) como dois fatores de risco fundamentais na doença. No entanto no estudo essa relação não resistiu ao ajuste por idade, devendo essas questões serem consideradas importantes e merecem mais estudos para fechar essa lacuna entre CHIKV e doença metabólicas.

O padrão de acometimento articular simétrico foi prevalente nos pacientes, seguidos de queixas de recidivas que ocorriam com um intervalo em média de meses, persistindo com maior frequência nos joelhos, tornozelos, pés, dedos dos pés, mãos e dedos das mãos. Resultados semelhantes foram apresentados por Miner e colaboradores (2015) bem como por Brito e colaboradores (2017) associaram a artralgia persistente ao relato de rigidez matinal e edema articular, ocorrência também evidenciada neste estudo.

Rahim e colaboradores (2015) evidenciou que uma história de edema articular, além da febre e artralgia durante a fase aguda da doença, este fato aponta para uma resposta inflamatória mais grave a infecção. Por sua vez, este sintoma inicial provou ser um preditor de recorrência da dor. Destacaram que a presença de edema articular prever não só uma doença crônica, mas um maior risco de incapacidade nos pacientes.

Durante pesquisa desenvolvida por Huits e colaboradores (2018), características inflamatórias, como a rigidez matinal, edema e vermelhidão foram comumente relatados, outros sintomas neurológicos foram registrados com frequência, como o déficit de concentração e distúrbios do sono, corroborando com nossos achados que evidenciaram uma maior frequência de edemas de articulações, rigidez matinal, dormência e déficit de concentração.

Larrieu e colaboradores (2010) mostraram que deficiências esqueléticas durante a fase aguda previam a gravidade da doença em infecções por alfavírus artrítogênicos, descobrindo que a persistência dos sintomas tendia estar ligado com a carga clínica durante a fase aguda. Nossos resultados não evidenciaram forte potencial de predição relacionado a características inflamatórias como presença de edema e rigidez matinal quando ajustados a um modelo final de regressão logística para prever artralgia persistente em um período de 180 dias ou mais de sintomas.

Andrade e colaboradores (2010) durante sua pesquisa identificou um subgrupo de pacientes cuja maior problemática não era artralgia, e sim as características neuropáticas (CN), como queimação, dor a exposição ao frio, formigamento, dormência e comichão. Cerca de um em cada cinco de seus pacientes relataram dor com CN, sugerindo que outros mecanismos também pudessem estar envolvidos.

O CHIKV é um vírus neurotrópico, que pode acessar o cérebro através de várias vias, incluindo o transporte axonal retrógrado ao longo dos neurônios motores (LUDLOW et al, 2015). Estudos realizados por Bank e colaboradores (2015) relacionaram sequelas neuropáticas a um fenômeno imunomediado secundário ao invés da atividade direta do próprio vírus. No entanto, os mecanismos que levam as alterações neuropatológicas ou imunopatológicas precisam ser melhor elucidados.

Identificamos o comprometimento de nervos periféricos em uma idosa de 64 anos, sem antecedentes reumáticos ou outra comorbidade, que por meio do exame eletroneuromiográfico foi detectada uma polineuropatia periférica padrão axonal

sensitivo-motora, com isso, a redução no número de axônios operantes que causou a diminuição da velocidade de condução nervosa e amplitude do potencial de ação nervo-sensitiva nos nervos ulnar e mediano direito e esquerdo respectivamente, bem como o fibular superficial direito. Os exames evidenciaram redução de potencial de ação moderado em unidades motoras de pontos musculares examinados do extensor curto, dedos dos pés direito e esquerdo e abductor hálux direito.

Simon e colaboradores (2015) o CHIKV pode causar descompensação de artropatias degenerativas ou traumáticas preexistentes, como osteoartrite ou tendinite, ocasionalmente calcificadas. Manifestações locais, como edema reacional e síndromes de compressão nervosa, particularmente dos nervos ulnar, medial e tibial, que produzem síndromes dos túneis cubital, carpal e do tarso, respectivamente, foram observadas pelos autores. Rigidez articular matinal, dor neuropática e fenômenos vasculares periféricos, como a síndrome de Raynaud, também são descritos.

Um estudo realizado em Bangladesh, a infecção por CHIKV causou perda significativa de produtividade devido ao absenteísmo no trabalho, atividades domésticas e escolares, com 29,6% dos pacientes perdendo mais de 10 dias de produtividade durante a fase aguda, outros chegaram inclusive a perder o emprego (HOSSAIN et al, 2018). Waymouth e colaboradores (2013) revelaram que em 80-100% dos pacientes, o envolvimento das articulações tende a persistir por pelo menos seis semanas e que, ao longo do tempo, esse percentual diminuirá para aproximadamente 10% no final do segundo ou terceiro ano após a fase aguda.

Nesse estudo mais da metade dos participantes relataram incapacidade na realização de AVD e precisaram afastar do trabalho por até 2 meses, como relatado por uma paciente com evolução atípica. Em 91,2% dos casos, houve necessidade de atendimento médico e implementação de tratamento medicamentoso. Atualmente, sabe-se que o perfil imunológico de cada paciente pode interferir na variação de apresentações clínicas, no entanto características associadas a variabilidade genética do vírus também podem estar associadas a intensidade e gravidade dos sintomas (ZAID et al, 2018). Estudos clínicos e experimentais têm buscado proporcionar maiores perspectivas sobre o conhecimento atual da patogênese do CHIKV que contribuam para a compreensão do vírus e forneça possíveis soluções terapêuticas garantindo uma melhor abordagem do tratamento e gestão da CHIKF.

Um estudo recente realizou a investigação molecular de infecções por CHIKV em pacientes com sintomatologia sugestiva, no Estado do Piauí, Nordeste do Brasil, mesma localidade e em um intervalo temporal próximo ao desta pesquisa. Por meio deste foi fornecida a primeira vigilância de genótipo de casos de CHIKV durante 2016/2017 no Estado do Piauí, sendo identificada a circulação do genótipo ECSA. Os autores relataram a ocorrência de uma manifestação neurológica dentre os casos e ressaltaram a importância do monitoramento da alta incidência de sintomas crônicos mostradas por pesquisas anteriores, haja visto os impactos sociais e econômicos ocasionados pela doença, bem como a necessidade de mais pesquisas como esta, que avalie a prevalência e impacto de infecções agudas e crônicas por CHIKV na região (CARDOSO et al, 2019).

Portanto, quanto ao CHIKV, observou-se uma vasta heterogeneidade entre os estudos sobre dor articular crônica associada a infecção, sendo denominada muitas vezes como “reumatismo inflamatório crônico pós-chikungunya”, essas pesquisas evidenciam a dificuldade enfrentada com relação ao diagnóstico diferencial com outras patologias artritogênicas. Até o momento, a dor articular crônica é bem descrita no que refere a carga socioeconômica da infecção pelo CHIKV, o mesmo podendo ser responsável por gerar incapacidades a longo prazo em indivíduos infectados, contudo ainda existe uma grande lacuna a ser preenchida no que refere a prevenção e tratamento dessas infecções bem como suas manifestações clínicas a curto e longo prazo (LEVI; VIGNUZZI, 2019; AMARAL et al, 2019).

Algumas limitações deste estudo devem ser consideradas na interpretação dos resultados alcançados. A falta de sensibilização da população com relação ao prognóstico da CHIKV provavelmente impediu que pacientes sintomáticos procurassem consulta médica introduzindo um viés de seleção em nossa coorte. Um ponto forte dessa avaliação refere-se ao questionário semiestruturado utilizando além de questões de múltiplas escolhas, questões abertas, que possibilitou uma maior quantidade de detalhes sobre a apresentação clínica dos pacientes.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Este estudo permitiu detectar, por técnicas moleculares, a circulação CHIKV durante os anos de 2017 e 2018 no estado do Piauí.
- Nessa pesquisa, a apresentação clínica da infecção CHIKV em uma população adulta indicou que fatores como idade, gênero, presença de comorbidades e características inflamatórias da fase aguda podem contribuir com a persistência da artralgia embora estatisticamente tenham apresentado uma fraca relação, apontando que outros fatores podem estar envolvidos no processo de cronificação e gravidade do CHIKV, como características associadas ao próprio sistema imune do hospedeiro.
- O desfecho clínico de uma paciente com polineuropatia periférica padrão axonal sensitivo-motora relacionada ao quadro de infecção viral evidenciou dentro do número amostral estudado o neurotropismo do vírus bem como a ocorrência de manifestações atípicas.
- Quando todos os fatores foram considerados simultaneamente em uma análise multivariada, as variáveis do modelo final de regressão foram capazes de explicar 11,9% da persistência da artralgia no período D90, 2,3% nem D180 e 9,3% no período D>180 sendo fatores preditivos de fraca magnitude para artralgia crônica em CHIKV no grupo estudado. A idade >49 anos foi significativa em dois momentos avaliados (D90 e D>180) um maior risco foi observado.
- Apesar do baixo coeficiente de determinação, analisando-se os valores do coeficiente de determinação *beta*, conforme cada período estudado obteve-se um valor de associação positivo para os seguintes modelos: D90 (idade, presença de edema articular, HAS, doenças reumáticas prévias); D180 (idade, rigidez matinal, dormência, HAS); >180D (gênero, doenças reumáticas prévias e outras comorbidades) foram associados positivamente com a evolução crônica da infecção por CHIKV.
- Estudos clínicos e experimentais têm buscado proporcionar maiores perspectivas sobre o conhecimento atual da patogênese do CHIKV que contribuam para a compreensão do vírus e forneça possíveis soluções

terapêuticas garantindo uma melhor abordagem do tratamento e gestão da CHIKF.

- Estes fatores de risco devem ser avaliados em estudos prospectivos, para que possam contribuir para a identificação de doentes infectados com perfis suscetíveis a cronicidade e gravidade da infecção, para que esses sejam permitidos se beneficiar de futuras intervenções terapêuticas, tais como drogas antirreumáticas modificadoras da doença ou compostos antivirais, haja visto que a infecção por CHIKV tem se mostrado uma causa potencial de inatividade em doenças crônicas.
- A não procura de pacientes sintomáticos aos serviços de saúde pode ter restringido a seleção dessa coorte, no entanto um ponto forte dessa avaliação refere-se ao questionário semiestruturado utilizando além de questões de múltiplas escolhas, questões abertas, que possibilitou uma maior quantidade de detalhes sobre a apresentação clínica dos pacientes.



## REFERÊNCIAS

- ALLISON AB. et al. Evolutionary genetics and vector adaptation of recombinant viruses of the western equine encephalitis antigenic complex provides new insights into alphavirus diversity and host switching. **Virology**. 2015;474:154–162.
- ALVAREZ M.F. et al. Cardiovascular involvement and manifestations of systemic Chikungunya virus infection: a systematic review. **F1000Res** . 2017, 6: 390.
- ALVA-URCIA C. et al. Emerging and reemerging arboviruses: A new threat in Eastern Peru. **PLoS ONE**, 2017, 12(11): e0187897.
- AMARAL JK, SCHOEN RT. A case report of Chikungunya fever, rheumatoid arthritis and Felty's syndrome. **Reumatologia e Terapia** . 2018; 5 (1): 293-301. doi: 10.1007 / s40744-018-0103-9.
- AMARAL JK et al. The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. **Viruses**. 2019;11(3):289. AMDEKAR S. et al. Chikungunya virus-induced arthritis: role of host and viral factors in the pathogenesis. **Viral Immunol.**, 2017, 30, 691–702. 10.1089/vim.2017.0052
- ANDRADE D.C., et al. Chronic pain associated with the Chikungunya Fever: long lasting burden of an acute illness. **BMC Infect Dis**. 2010;10:31.
- ARROYO-ÁVILA M. et al. Clinical Manifestations Associated with Involvement of Peripheral Articulation in Patients with Chikungunya Acute Virus Infection. **Am J Trop Med Hyg** . 2017; 96 (4): 916-921.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA I. et al. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed Res Int** 2013.
- AZEREDO E.L. et al. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. **PLOS Currents Outbreaks**. 2018. Feb 15 .
- AZEVEDO, R.S.S.; OLIVEIRA C.S.; VASCONCELOS P.F.C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, [s.l.], v. 49, p.1-6, 2015.
- BANDEIRA A.C.; CAMPOS G.S. ROCHA V.F. et al. Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **IDCases**. 2016;6:100-103.
- BANK A.M. et al. Myeloradiculopathy associated with chikungunya virus infection. **Journal NeuroVirology**, 2015;s13365-015-0372-9.
- BARROS, E.L.T. **Caracterização molecular de Chikungunya virus e investigação dos arbovírus Dengue virus e Mayaro virus no Estado do Piauí**. Março de 2018. Dissertação – Universidade Federal do Piauí.
- BEDOUI Y., et al. Immunomodulatory drug methotrexate used to treat patients with chronic inflammatory rheumatism post-chikungunya does not impair the synovial antiviral and bone repair responses. **Plos Negl. Trop. Dis.**, 2018; 12(8): e0006634.
- BERGSTRA S.A. et al. Similar short-term clinical response to high-dose versus low-dose methotrexate in monotherapy and combination therapy in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther**. 2017;19(1):258.

- BONIFAY T. et al. Atypical and severe manifestations of chikungunya virus infection in French Guiana: A hospital-based study. **PLoS ONE**, 2018, 13(12): e0207406.
- BOUQUILLARD E. et al. Rheumatic manifestations associated with Chikungunya virus infection: A study of 307 patients with 32-month follow-up (RHUMATOCHIK study). **Joint Bone Spine**. 2018 Mar;85(2):207-210.
- BOZZA F.A. et al. Differential Shedding and Antibody Kinetics of Zika and Chikungunya Viruses, Brazil. **Emerg Infect Dis**. 2019;25(2):311-315. BRITO C.A.A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 2017 Set-Out;50(5):585-589.
- BRONZONI, R. V. M. et al. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.
- BROWN R.S., WAN J.J., KIELIAN M. The Alphavirus Exit Pathway: What We Know and What We Wish We Knew. *Viruses*. 2018;10(2):89. Published 2018 Feb 22. doi:10.3390/v10020089
- BURT F.J et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **Lancet Infect Dis** 17 : e107 - e117 . 10.1016 / s1473-3099 (16) 30385-1, 2017.
- BURT F.J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**. 2012 Feb 18;379(9816):662-71.
- CARDOSO, FD et al . Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016-17 in Piauí State, Northeast Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo , v. 61, e57, 2019 .
- CDC. Chikungunya clinical evaluation & disease (2014) CDC Web site. Available at: <https://www.cdc.gov/chikungunya/hc/clinicalevaluation.html>. Accessed Jan 5, 2018.
- CHANCEY C et al. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. **Biomed Res Int**. 2015.
- CHEN W-H. et al. Characterization and epitope mapping of Dengue virus type 1 specific monoclonal antibodies. **Virology Journal**. 2017.
- CHEVILLON C. et al. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends Microbiol*. 2008;16(2):80–88.
- CHIA P.Y. et al. Chikungunya fever: A review of a re-emerging mosquito-borne infectious disease and the current status. **Current research** 20:486-492, 2010.
- COFFEY L.L. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol**. 2013;8(2):155–176.
- CONWAY M.J. et al. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu. Rev. Virol*. 2014. 1:71–88.
- COUDERC T. et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS Pathog**. 2008;4(2):e29.

DA SILVA JUNIOR V.J. et al. Perspectives on the zika outbreak: herd immunity, antibody-dependent breeding and vaccine. **Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo**. 2017; 59: e21.

DELGADO-ENCISO I. et al. Smoking and female sex as key risk factors associated with severe arthralgia in acute and chronic phases of Chikungunya virus infection. **Exp Ther Med**. 2017;15(3):2634-2642.

DONALISIO, M. R. et al. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, p. 10–15, 2017.

DORLÉANS F., et al. Outbreak of Chikungunya in the French Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe: Findings from a Hospital-Based Surveillance System (2013-2015). **Am J Trop Med Hyg**. 2018;98(6):1819-1825.

DUVIGNAUD A., et al. Rheumatism and chronic fatigue, the two facets of post-chikungunya disease: the TELECHIK cohort study on Reunion Island. **Epidemiol Infect** . 2018; 146 (5): 633-641.

ECONOMOPOULOU A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiol Infect**. 2009;137(4):534–41.

ELFERT KA et al.. Chikungunya Virus Infection-related Rhabdomyolysis: A Case Report. **Cureus**. 2019;11(2):e4036.

ERASUMUS JH. et al. Uma Vacina Contra Febre Chikungunya Utilizando uma Plataforma de Vírus Específica para Insetos. **Medicina natural**, 2017; 23 (2): 192-199. doi: 10.1038 / nm.4253.

ESSACKJEE K. et al. Prevalence of and risk factors for chronic arthralgia and rheumatoid-like polyarthritis more than 2 years after infection with chikungunya virus. **Postgrad Med J**. 2013;89:440–447.

FERREIRA GP et al. Dengue virus 3 clinical isolates show different patterns of virulence in experimental mice infection. **Microbes Infect**.12(7):546-54, 2010.FIGUEIREDO LT. Emergent arboviroses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, 2007; 40:224-229.

FORRESTER N.L. et al. A filogenia em escala genômica do gênero Alphavirus sugere uma origem marinha **J Virol** 86 2729–2738 10.1128 / JVI.05591-11, 2012.

FRED A. et al. Individual and contextual risk factors for chikungunya virus infection: the cross-sectional population-based study of SEROCHIK. **Epidemiol Infect**. 2018.

FRITZELL C. et al. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. **PLoS Negl Trop Dis**, 2018, 12(7): e0006533.

GALÁN-HUERTA K.A. et al. Molecular and Clinical Characterization of Chikungunya Virus Infections in Southeast Mexico. **Viruses**. 2018;10(5):248. Published 2018 May 9. doi:10.3390/v10050248

GANESAN V.K. et al. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses**. 2017;9(12):368. Published 2017 Dec 1. doi:10.3390/v9120368

GARCÊS, T. C. C. C. **Caracterização molecular de Dengue vírus circulantes e investigação de Flavivírus emergentes no Estado do Piauí**. 2016. 93f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2016.

GARMASHOVA N. et al. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *J Virol*. 2006;80:5686–5696.

GÉRARDIN P. et al. Predictors of chikungunya rheumatism: a prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:R9.

GÉRARDIN P., et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Med*. 2008;5(3):e60.

GIRY C. et al. Better detection of genus-specific Alphavirus using a TaqMan® generic assay. *Microbiology BMC*. 2017; 17: 164. doi: 10.1186 / s12866-017-1080-9.

GUBLER D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.*, 2002, 33: 330–342.

GUBLER DJ, VASILAKIS N. The Arboviruses: Quo Vadis? Preparation. 2016

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews – Microbiology*, v. 8, p. 7-16, 2010.

HOSSAIN M.S. Surto de Chikungunya em Bangladesh: perfil clínico, impacto econômico e qualidade de vida durante a fase aguda da doença. *PLOS*, 2017.

HUITS R. et al. Chikungunya virus infection in Aruba: Diagnosis, clinical features and predictors of post-chikungunya chronic polyarthralgia. *PLoS One*. 2018;13(4):e0196630.

HYDE J.L. et al. The 5' and 3' ends of alphavirus-non-coding RNAs are non-functional. *Virus scan*. 2015; 206: 99-107. doi: 10.1016 / j.virusres.2015.01.016.

IOOS S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect*. 2014;44(7):302-7.

IRANPOUR M. et al. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication pathogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol 18, ed.1, 2016.

JAVELLE E. et al. Specific management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006-2012. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003603.

JIN J, et al. Neutralizing Monoclonal Antibodies Block Chikungunya Virus Entry and Release by Targeting an Epitope Critical to Viral Pathogenesis. *Cell Rep*. 2015;13(11):2553-2564.

JOHNSON N. et al. Rapid molecular detection methods for arboviruses of livestock of importance to northern Europe. *J. Biomed Biotechnol.*, 2012.

JOHNSON, B. W. et al. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 95(1), pp. 182–192, 2016.

- KAFETZOPOULOU L.E. et al. Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples. **Euro Surveill.** 2018;23(50):1800228.
- KHATRI H et al. A Case Report on Chikungunya Virus-Associated Encephalomyelitis. **Case Rep Infect Dis.** 2018;2018:8904753.
- KUMAR C. V. M. N. et al. Molecular characterization of Chikungunya virus from Andhra Pradesh, India and phylogenetic relationship with Central African isolates. **Indian Journal of Medical Research**, v.126, p. 534-40, 2007.
- LANGSJOEN R.M., et al. Virological and clinical molecular characteristics of a Chikungunya fever outbreak in La Romana, Dominican Republic, 2014. **PLoS Negl Trop Dis** . 2016; 10 (12): e0005189.Publicado 2016 Dez 28. doi: 10.1371 / journal.pntd.0005189
- LAURRIEU S. Factors associated with persistence of arthralgia among chikungunya virus-infected travellers: Report of 42 French cases. **Journal of Clinical Virology**, 47(1), 85–88, 2010
- LEVI LI, VIGNUZZI M. Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threatment. **Microorganisms.** 2019;7(5):133.
- LIANG, G. et al. Factors responsible for the emergence of arboviroses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerging Microbes and Infections*, v. 4, n. 18, p. 1-5, 2015.
- LIMA-CÂMARA, T. N. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. **Rev Saúde Pública** 2016;50:36.
- LOPES, N. et al. General characteristics and epidemiology of the emergent arboviruses in Brazil. **Pan-Amazonian Health Magazine**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.
- LUDLOW M. et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. **Acta Neuropathol.** 2015;131(2):159-184.
- LUM, F. M.; Ng, L. F. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Res.**, 2015,120, 165–174. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.06.009
- MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *BioMed Research International*, v. 2015, n. 1, p. 1-8, 2015.
- MARTINEZ M.G. et al. Intercellular Extensions are Induced by Alphavirus Structural Proteins and Mediation Virus Transmission. **PLoS Pathog** 12 (12): e1006061, 2016.
- MEHTA R. et al. The neurological complications of *chikungunya virus*. A systematic review. **Rev. Med. Virol.** 2018; 28(3); e 1978.
- MINER J.J. et al. Chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol.** 2015;67(5):1214-1220.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. **Chikungunya: manejo clínico.** Brasília (DF); 2017; 48(45).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika. Semana 45, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika. Semana 46, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika. Semana 12, 2019.

MOHAN A. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian J Dermatol.** 2010;55(1):54-63.

NASAR F., et al. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012;109(36):14622-7.

NASCI R.S. Movement of Chikungunya virus into the Western Hemisphere. **Emerg Infect Dis** 2014; 20:1394-5.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2015.

OKABAYASHI T. et al. Detection of Chikungunya Virus Antigen by a Novel Rapid Immunochromatographic Test. **Journal of Clinical Microbiology.** Jan 2015, 53 (2) 382-388.

Pan American Health Organization. **Information for healthcare professionals – Chikungunya fever**, Washington (DC); 2014.

PATTERSON J. et al. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **Western Journal of Emergency Medicine.** 2016; 17 (6): 671-679.

PEELING R.W.; ARTSOB H.; PELEGRINO J.L. Evaluation of diagnosis tests: dengue. **Nat Rev Microbiol.** 2010 Dec;8(12 Suppl):S30-8

PORTER, K. R. et al. A serological study of Chikungunya Virus transmission in Yogyakarta, Indonesia: evidence for the first outbreak since 1982. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 35, n. 2, p. 408-415, 2004.

POWERS A.M. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. **Clin Microbiol Rev.** 2017;31(1):e00104-16.

RAHIM A.A. et al. Disability with persistent pain following an epidemic of Chikungunya in rural South India. **The Journal of Rheumatology**, December 2015, jrheum.141609.

RAJAPAKSE S. RODRIGO, S.; RAJAPAKSE A. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2010, 104(2), 89–96.

- RAVIDRAN V.; ALIAS G. Efficacy of combination DMARD therapy vs. hydroxychloroquine monotherapy in chronic persistent chikungunya arthritis: a 24-week randomized controlled open label study. **Clinical Rheumatology**, 36(6), 1335–1340, 2016.
- RODRIGUEZ-MORALES A.J. et al. How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? **Rheumatol Int** 2015;35:2091–4.
- RONCA S.E.; DINELEY K.T.; PAESSLER S. Neurological Sequelae Resulting from Encephalitic Alphavirus Infection. **Front Microbiol.** 2016;7:959. Published 2016 Jun 20. doi:10.3389/fmicb.2016.00959.
- ROOSENHOFF R. et al. The pathogenesis of chronic chikungunya: evolving concepts. *Future Virol* 2016; 11: 61-77.
- ROTH A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections: an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. **Euro Surveill.** 2016, 19(41).
- RUPP J.C. et al. ' síntese Alphavirus ARN e funções de proteínas não-estruturais. *Journal of General Virology* , 96 / 9 : 2483-500, 2015.
- RUST R.S. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol.* 2012 Sep;19(3):130-51.
- SALIMI H. et al. Arbovírus encefalíticos: emergência, apresentação clínica e neuropatogênese. **Neuroterapêutica.** 2016; 13 : 514-534.
- SANTOS, L. S. **Vigilância epidemiológica e análise molecular do Dengue vírus no Piauí: busca de sorotipos circulantes.** 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2013.
- SCHWARTZ O. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Microbiol.** 2010;8:491–500 10.1038/nrmicro2368.
- SILVA L.A., DERMODY T.S. Vírus Chikungunya: epidemiology, replication, disease mechanisms and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation.** 2017; 127 (3): 737-749. doi: 10.1172 / JCI84417.
- SIMON F. et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). Novembro de 2014. **Med Mal Infect.** 2015; 45 ( 7 ): 243-63. 10.1016 / j.medmal.2015.05.007.
- SISSOKO D., et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Negl Trop Dis.** 2009;3(3):e389.
- STAPLEFORD K.A. et al. Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. **PLoS Negl Trop Dis,** 2016, 10(1): e0004402.
- TANABE I.S.B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Front Cell Infect Microbiol .**2018, 8: 345.

TANG, K.F; OOI, E.E. Diagnosis of dengue: na update. **Expert Rev. Anti Infect. Ther**, v. 10, n. 8, p. 895–907, 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/Central/South african genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerging Infectious Disease*, v. 21, n. 5, p. 906-8, 2015.

TORRES J.R., LEOPOLDO CODOVS G., CASTRO J.S., et al. Chikungunya fever: Atypical and lethal cases in the Western hemisphere: A Venezuelan experience. **IDCases**. 2014;2(1):6-10.

VALE, V. S. **Análise Molecular e Considerações Filogenéticas sobre o Dengue vírus**. 2015. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, 2015.

VIEIRA M.A.C.S. et al. Potential role of dengue virus, chikungunya virus and Zika virus in neurological diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** [online]. 2018, vol.113, n.11, e170538. Epub 29-Out-2018. ISSN 0074-0276.

WAYMOUTH, H. E.; ZOUTMAN, D. E.; TOWHEED, T. E. Chikungunya-related arthritis: case report and review of the literature. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 43, n. 2, p. 273-278, 2013.

WEAVER S.C.; LECUIT M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**. 2015;372:1231-9.

WHITE SK, et al. A new "American" subgroup of the African lineage Chikungunya virus, detected and isolated from mosquitoes collected in Haiti in 2016. Pimenta P, ed. **PLoS One** . 2018; 13 (5): e0196857. doi: 10.1371 / journal.pone.0196857.

WILDER-SMITH A. et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **Lancet Infect Dis.**, 2016.

WONG K.Z.; CHU J.J.H. The interaction of viral and host factors in Chikungunya virus infection: targets for antiviral strategies. **Virus**, 2018.

ZAID A. et al. Chikungunya arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms in Disease Management. **Arthritis Rheumatol**. 2018, 70 (4): 484-495.



## ANEXO I

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do projeto:**

"Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes no Estado do Piauí."

**Pesquisador responsável:**

Prof. Dr. Gustavo Portela Ferreira

Profa. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

Universidade Federal do Piauí – Campus Universitário de Parnaíba

Av. São Sebastião, 2819 – CEP 64202-020

Telefones: (86) 9482-1278/99203470 / 94013035

**Esclarecimentos**

Você está convidado a participar deste estudo e contribuir para o conhecimento dos arbovírus circulantes no estado bem como fatores do paciente (hospedeiro) que podem predispor a infecções pelos arbovírus. O paciente pode ser incluído no estudo se este apresenta sintomatologia da dengue/arbovirose e caso ocorra a realização de exames em instituição pública de saúde de Parnaíba. Caso você concorde com a participação (ou participação da criança), uma pequena porção de sangue será obtida, por punção venosa, e transportada imediatamente para o laboratório. O paciente será atendido no Serviço de saúde, mesmo que não concorde com a inclusão no estudo ou desista de participar a qualquer momento. Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão a sua disposição a qualquer momento da pesquisa. Você ou a criança não receberão qualquer remuneração pela participação.

Você poderá sentir desconforto durante a coleta de sangue mas os técnicos disponíveis para coleta são bem treinados e credenciados e utilizam todo o material estéril que provê segurança ao processo. Qualquer dúvida ou constrangimento que você tiver será esclarecida pelo pesquisador.

Os resultados desse estudo serão úteis para avaliarmos os sorotipos/genótipos virais circulantes na cidade de Parnaíba e estado do Piauí e quais condições relacionadas ao hospedeiro frente a Dengue que são encontradas na população do Piauí. Por se tratar de um estudo populacional, não há benefício direto para o participante. Somente no final do estudo poderemos concluir a participação de alguns fatores genéticos como causadores de uma maior gravidade de infecção. Você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, com os responsáveis pela pesquisa. Além disso, você também terá a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento e sua decisão não acarretará em qualquer prejuízo na continuidade do seu acompanhamento e tratamento. Se concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos

que requerido por lei ou por sua solicitação, somente o pesquisador, a equipe do estudo e representantes do Comitê de Ética terão acesso a suas informações para verificar as informações do estudo.

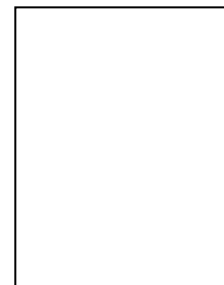
A realização desse projeto não terá custos aos voluntários. Além disso, fica garantida a manutenção de sigilo, por parte dos pesquisadores, sobre a identificação dos voluntários que decidirem colaborar com esse projeto de pesquisa.

Este documento será assinado em duas vias sendo uma de posse do participante e outra do pesquisador.

### **Consentimento da participação da pessoa como sujeito**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF nº \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo/participação do estudo "Identificação molecular de *Dengue virus* e outros arbovírus e prevalência de polimorfismos genéticos em pacientes no Estado do Piauí.", como sujeito. Fui suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo. Eu discuti com o Dr. Gustavo Portela Ferreira/ Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu acompanhamento/ assistência/tratamento neste Serviço.

Parnaíba, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_



Impressão digital

\_\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito ou responsável

.....

### **Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar**

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

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

Parnaíba, \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Gustavo Portela Ferreira

\_\_\_\_\_  
Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

#### **Observações complementares**

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato:

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPI

Campus Universitário Ministro Petrônio Portella - Bairro Ininga.

Pró Reitoria de Pesquisa - PROPESQ.

CEP: 64.049-550 - Teresina - PI.

## ANEXO II

## FORMULÁRIO PARA COLETA DE DADOS

DATA DO ATENDIMENTO: \_\_\_\_\_

NOME: \_\_\_\_\_

SEXO:  Masculino  FemininoDATA DE NASCIMENTO: 

NOME NA MÃE: \_\_\_\_\_

CEP: 

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

NÚMERO: \_\_\_\_\_

BAIRRO: \_\_\_\_\_

MUNICÍPIO: \_\_\_\_\_ UF:  Adulto  Criança (até 12 anos)  Idoso (acima de 60 anos)  Gestante  1º T  2º T  3º TInício dos sintomas  Febre há  dias.

## SINAIS E SINTOMAS PRESENTES

 Cefaleia  Artralgia  Náuseas  Dor retroorbitaria  Mialgia  Icterícia Prostração  Diarreia  Vômitos  Exantema com ou sem prurido Choro persistente/irritabilidade Manifestações hemorrágicas: gengivorragia - epistaxe - metrorragia - hematêmese - melena - hematúria - petéquias - equimoses Dor abdominal Outros

## COMORBIDADES/ DOENÇAS CRÔNICAS COEXISTENTES

 Hipertensão Arterial  Doença Hematológica \_\_\_\_\_ Diabetes Mellitus  Doença Cardiovascular \_\_\_\_\_ DPOC  Doença Autoimune  Insuficiência Renal  Doença ácido-péptica Hepatopatia  Anemia Falciforme Outras Não há comorbidades/doenças crônicas coexistentes.

## AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DE SINAIS DE CHOQUE/HEMORRAGIA GRAVE

 Comprometimento respiratório Hemorragia grave com ou sem sinais de choqueHemorragia presente  Não  Sim. Qual (is)?

- Conjuntival     Epistaxe     Gengivorragia     Petéquias     Equimose
- Metrorragia     Hematúria     Hematêmese     Melena     Hemoptoicos

Sinais de choque:

- Pulso rápido e fino     Extremidades frias     Pele pálida e úmida
- Enchimento capilar lento ( > 2 seg.)
- Pressão arterial convergente (PA diferencial < 20 mmHg)
- Hipotensão postural (queda > 30 mmHg)
- Não há presença de sinais de choque hipovolêmico/hemorragia grave

**ANEXO III**  
**QUESTIONÁRIO**  
**AValiação DE CRONICIDADE CHIKV**

DATA DO ATENDIMENTO:

NOME: \_\_\_\_\_

SEXO:  Masculino  Feminino Idade:

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

NÚMERO: \_\_\_\_\_

BAIRRO: \_\_\_\_\_

MUNICÍPIO: \_\_\_\_\_ UF:

Adulto  Criança (até 12 anos)  Idoso (acima de 60 anos)  Gestante  1º T  2º T  3º T

Data da coleta: \_\_\_\_\_ Primeiro contato: \_\_\_\_\_

Segundo Contato: \_\_\_\_\_ Atual: \_\_\_\_\_

**SINTOMAS E DADOS CLÍNICOS DE FASE CRÔNICA**

1. Tempo de duração dos sintomas (semanas ou meses): \_\_\_\_\_

2. Rigidez matinal (>30 min): Sim  Não

3. Quantifique Principais membros/sítios anatômicos/articulações acometido (a) s:

Dedos das mãos  Mãos  Punhos  Cotovelos  Ombros

Quadril  Joelhos  Tornozelos  Pés  Dedos dos pés

Dores na coluna: cervical  Torácica  Lombar

3.1 - Outros membros/articulações acometidos \_\_\_\_\_

4. Intensidade da artralgia: Fraca  Moderada  Forte

5. Padrão de acometimento articular: simétrico  assimétrico

6. Presença de edema/inchaço nos membros ou articulações: não  sim

Quais membros \_\_\_\_\_

6.1 - Edema com vermelhidão: sim  \_\_\_\_\_  
 não

6.2 - Edema com calor sobre a articulação: sim  \_\_\_\_\_  
 Não

7. Dormência nos membros: sim  \_\_\_\_\_  
 não

8. Outros sintomas Clínicos: mialgia  manifestações cutâneas/ coceira/ vermelhidão

déficit de concentração  depressão

### 9. Presença de Comorbidades

9.1. Hipertensão arterial

Usa medicação  \_\_\_\_\_

9.2. Diabetes

Usa medicação  \_\_\_\_\_

9.3. Doenças reumáticas Prévias

Usa medicação  \_\_\_\_\_

9.4. Doenças autoimunes

Usa medicação  \_\_\_\_\_

9.5. Obesidade                       Peso \_\_\_\_\_      Altura \_\_\_\_\_

Usa medicação  \_\_\_\_\_

9.6. Outras comorbidades

Usa medicação  \_\_\_\_\_

### 10. Duração e Recorrência

Queixas: Permanente       Recidivante

10.a - Na média, quantos dias você passou sem dores?

\_\_\_\_\_

10.b - Quantos períodos sem dores você teve nas últimas 12 semanas?

\_\_\_\_\_

10.c - Quantos desses períodos duraram mais que 1 mês?

\_\_\_\_\_

11. Limitação dos movimentos articulares ao realizar atividades cotidianas: sim  não

12. Houve necessidade de afastamento nos últimos 3 meses de suas atividades usuais (trabalho, escola, serviço doméstico) devido a dor? \_\_\_\_\_ dias

13. Segue algum tratamento medicamentoso para combater as dores ocasionadas por CHIKV:

sim  não

\_\_\_\_\_

## APENDICE I

### Artigo

**Título:** Peripheral polyneuropathy associated with *Chikungunya virus* infection

### Autores:

Vanessa P. Silva<sup>1</sup>, Dacylla S. Costa<sup>1</sup>, Vania C.C.V.L. Carvalho<sup>2</sup>, Tereza C.C.S. Garcês<sup>3</sup>, Emanuela L.T. Barros<sup>1</sup>, Jefferson S. Oliveira<sup>1</sup>, Anna C.T.C. Pereira<sup>1</sup>, Gustavo P. Ferreira<sup>1</sup>

### Afiliação:

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms and Plants, Federal University of Piauí, Parnaíba, Brazil. Campus Ministro Reis Velloso -CMRV

<sup>2</sup>Department of Medicine, Federal University of Piauí, Parnaíba, Brazil. Campus Ministro Reis Velloso -CMRV

<sup>3</sup>Department of Medicine, Faculty of Human Sciences, Exact and health of Piauí, Parnaíba, Brazil.

### Autor para correspondência:

**Gustavo Portela Ferreira**, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Microorganisms and Plants, Federal University of Piauí, Parnaíba, Brazil – Phone: +558699920-3470 – e-mail: [gtvpf@ufpi.edu.br](mailto:gtvpf@ufpi.edu.br).