



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE



Dissertação de Mestrado

**Caracterização das lesões orais e da resposta imunológica local
durante infecção aguda por Chikungunya Vírus**

Paula Milena Melo Casais

Salvador (Bahia), 2019

Melo Casais, Paula Milena
Caracterização das lesões orais e da resposta
imunológica local durante infecção aguda por
Chikungunya Vírus / Paula Milena Melo Casais. --
Salvador, 2019.
65 f. : il

Orientadora: Viviane Sampaio Boaventura de
Oliveira.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em
Ciências da Saúde) -- Universidade Federal da Bahia,
Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina,
2019.

1. Chikungunya. 2. Manifestações Oraís. 3. Saliva.
I. Sampaio Boaventura de Oliveira, Viviane. II.
Titulo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE



**Caracterização das lesões orais e da resposta imunológica local
durante infecção aguda por Chikungunya Vírus**

Paula Milena Melo Casais

Orientadora: Viviane Boaventura

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2019

COMISSAO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Prof. DSc. Viviane Boaventura. Pós-doutora em Patologia Experimental Humana (Fundação Oswaldo Cruz/Universidade Federal da Bahia) – Presidente;
- Profa. DSc. Ceuci de Lima Xavier Nunes. Doutora em Medicina Interna (Universidade Federal da Bahia);
- Prof. DSc. Cristina Ribeiro Barros Cardoso. Doutora em Imunologia Básica e Aplicada (Universidade de São Paulo);

Membro Suplente:

- Prof. DSc, Natália Machado Tavares, Doutora em Patologia Experimental Humana (Fundação Oswaldo Cruz/Universidade Federal da Bahia).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo amor incondicional, zelo e por me conduzir nessa trajetória, permitindo que eu alcançasse meus objetivos, conforme sua vontade. Agradeço aos meus pais e irmã, pelo amor, apoio, incentivo e dedicação para que eu pudesse obter a melhor formação possível e crescesse cada vez mais profissionalmente e como ser humano. À Luiz, pelo amor, carinho e por sempre me apoiar nessa jornada. Aos meus familiares e amigos, pelo constante incentivo e apoio. Agradecimento especial à minha orientadora Dra. Viviane Boaventura, pelo apoio, dedicação, disponibilidade, constantes ensinamentos e pela confiança depositada em mim. Ao Dr. Ricardo Khouri, pela colaboração para o desenvolvimento desta pesquisa, apoio e ensinamentos durante o mestrado. Aos colegas do Programa de Pós Graduação, pelo companheirismo, amizade e cumplicidade durante os 2 anos de formação. Aos colegas do grupo de pesquisa, pelo aprendizado compartilhado, convivência e amizades estabelecidas. Aos colegas do laboratório LEITV da FIOCRUZ-IGM, pelo suporte para a realização das análises da pesquisa, pela compreensão e orientações durante o curso. À Universidade Federal do Ceará e ao Dr. Luciano Pamplona, pelo suporte para a realização da pesquisa. Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia pela oportunidade de cursar o Mestrado, anseio existente desde à graduação, e aos professores do curso, pelos ensinamentos e orientações. À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pelo fomento à ciência, tecnologia e inovação. À CAPES pelo fomento à pesquisa e desenvolvimento da ciência brasileira. Por fim, agradeço a todos que contribuíram para que eu chegasse à tão almejada formação de Mestre.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	8
ÍNDICE DE SIGLAS OU ABREVIATURAS.....	9
RESUMO	11
II. OBJETIVOS	13
III. INTRODUÇÃO.....	14
IV. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
IV.1. Fisiopatogênese da Chikungunya.....	16
IV.2. Quadro clínico na fase aguda	16
IV.2.1. Lesões tegumentares e de mucosa oral na fase aguda da Chikungunya.....	17
IV.3. Quadro Clínico na Fase subaguda e Crônica da CHIKD.....	18
IV.4. Diagnóstico	19
IV.5. Tratamento	21
IV.6. Resposta Imune ao CHIKV	22
V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	26
V.1. Desenho do estudo e população	26
V.2. Ética	26
V.3. Coleta de dados e processamento de amostras	27
V.4. Isolamento de RNA, PCR em Tempo Real , Sorologia (ELISA), avaliação da expressão gênica de mRNA de citocinas e quimiocinas.....	27
V.5. Análise estatística.....	30
VI. RESULTADOS	30
VI.1. Seleção dos pacientes com CHIKD	31
VI.2. Diagnóstico laboratorial dos pacientes via RT-qPCR de amostras de sangue, urina e saliva, e sorologia	31
VI.3. Características clínicas e epidemiológica dos pacientes com diagnóstico conclusivo de CHIKD, baseado na presença de lesões orais.....	32
VI.4. Sinais, sintomas e localização das lesões orais nos pacientes com CHIKD.....	33
VI.5. Apresentação clínica das lesões orais identificadas nos pacientes com CHIKD.....	34
VI.6. Associação entre as lesões orais e as manifestações sistêmicas	35
VI.7. Análise da expressão de citocinas , quimiocinas e RNA viral na saliva dos pacientes, de acordo com a presença da lesão oral	35
VII. DISCUSSÃO	37
VIII. CONCLUSÕES	44
IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO	45
SUMMARY	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO 1	54
ANEXO 2	57
ANEXO 3	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da seleção dos pacientes com suspeita clínica de arbovirose aguda. Pacientes foram submetidos a avaliação clínica-laboratorial com análise da cavidade oral, e reavaliados para persistência dos sintomas, após 3 a 5 meses.....	31
Figura 2. Diagnóstico dos 105 casos de CHIKD, através das técnicas de ELISA e RT-qPCR.....	32
Figura 3. Manifestações clínicas orais de 32 pacientes com	33
Figura 4. Local da lesão oral de 32 pacientes com infecção aguda por Chikungunya vírus.....	34
Figura 5. Aspecto clínico e localização das lesões orais em pacientes com CHIKD.....	34
Figura 6. Heatmap com sinais e sintomas de Chikungunya na fase aguda de acordo com a presença (vermelho) ou ausência (azul) de lesão oral.	35
Figura 7. Heatmap da análise da expressão de citocinas, quimiocinas e RNA viral na saliva de pacientes com e sem lesão oral.....	36

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e epidemiológicas dos 105 pacientes com Chikungunya, de acordo com a presença da lesão oral	32
--	----

ÍNDICE DE SIGLAS OU ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroides
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention)
CHIKD	Doença Chikungunya
CHIKV	Vírus Chikungunya
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
DENV	Vírus da Dengue
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECSA	East/Central/South African
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HPV	Papiloma vírus humano
HSV-1	Herpes vírus simples tipo 1
IBMP	Instituto de biologia molecular do Paraná
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IIQ	Intervalo interquartil
IL-10	Interleucina 10 (<i>interleukin 10</i>)
IL-12	Interleucina 12 (<i>interleukin 12</i>)
IL-12	Interleucina 12 (<i>interleukin 12</i>)
IL-13	Interleucina 13 (<i>interleukin 13</i>)
IL-15	Interleucina 15 (<i>interleukin 15</i>)
IL-1RA	Antagonista do receptor de interleucina-1 (<i>interleukin-1 receptor antagonist</i>)
IL-1β	Interleucina 1 beta (<i>interleukin 1 β</i>)
IL-4	Interleucina 4 (<i>interleukin 4</i>)
IL-6	Interleucina 6 (<i>interleukin 6</i>)
IL-7	Interleucina 7 (<i>interleukin 7</i>)
IL-8	Interleucina 8 (<i>interleukin 8</i>)
IP10	Interferon gamma-induced protein 10
Kit ZDC	Kit Zika, Dengue, Chikungunya
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NLRP3	Complexo protéico (Inflamassoma)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
RLRs	Retinoic acid-inducible gene-1 (<i>RIG-I</i>)-like receptors
RNA	Ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Reverse Transcription
RT-qPCR	Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SESAB	Secretaria de Saúde do Estado da Bahia
TA	Temperatura ambiente
TLR3	Toll like receptor 3

TLR7	<i>Toll like receptor 7</i>
TLR8	<i>Toll like receptor 8</i>
TLRs	<i>Toll like receptors</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral (<i>tumor necrosis factor</i>)
ZIKV	Vírus da Zika

RESUMO

Introdução: A Chikungunya é uma doença causada pelo alphavírus Chikungunya (CHIKV), transmitido por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. Além de febre e artrite, a doença Chikungunya (CHIKD) pode levar ao aparecimento de lesões orais. **Objetivo:** Caracterizar a lesão oral na infecção aguda por CHIKV, relacionando com a presença de vírus e resposta imune na saliva. **Metodologia:** Estudo de corte transversal com 228 pacientes recrutados nos municípios de Campo Formoso, Itabuna, Senhor do Bonfim e Maranguape (Ceará) entre março de 2016 a junho de 2017. Pacientes com suspeita de infecção aguda por arbovírus foram submetidos a avaliação clínica por médico otorrinolaringologista e odontólogo, com preenchimento de um questionário contendo sinais e sintomas da doença, incluindo dados sobre as lesões orais. O diagnóstico da infecção pelo CHIKV foi confirmado por PCR positivo em amostra de urina, sangue e/ou saliva ou a presença de IgM sérica específica. Adicionalmente, a expressão de quimiocinas e citocinas IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL2 e CXCL10 em amostras de saliva foi determinada por RT-qPCR. A distribuição das variáveis foi testada a partir do teste de Kolmogorov Smirnov e os testes não paramétricos, em relação ao desfecho, foram os de qui quadrado, teste exato de Fisher e Mann Whitney. **Resultados:** Dos 204 pacientes avaliados, 105 foram diagnosticados exclusivamente como CHIKD e tinham tempo de doença menor que 10 dias no momento da avaliação. Lesões orais foram detectadas em 36 (34%) casos, sendo mais frequentes em mulheres (OR = 3,2). Na maioria dos pacientes as lesões eram dolorosas (n=23, 72%) causando dificuldade de alimentação (n=19, 59%). Os principais sítios acometidos foram a língua (n= 14, 44%), gengivas (n=14, 44%) e lábios (n=12, 37,5%) mas também foram encontradas na mucosa jugal (n=7, 22%). As lesões da mucosa apresentaram-se como úlceras arredondadas com margens circunscritas e halo-eritematoso (n=12, 37,5%) ou regiões edemato-eritematosas na gengiva marginal (n=2, 3%). Os pacientes com CHIKD que apresentavam lesão

bucal exibiram mais frequentemente sintomas sistêmicos de rash, prurido, mialgia, edema e dor retroocular ($p < 0,05$). Em uma análise de regressão logística ordinal, houve associação entre a presença da lesão oral e rash cutâneo (OR = 7,817 $p < 0,05$). CHIKV foi detectado na saliva de 13% dos indivíduos avaliados. Houve uma correlação positiva entre a presença do RNA viral e a expressão de IL-1 β na saliva ($p=0,01$), mas não houve associação entre presença de lesão oral e vírus detectável na saliva. **Conclusões:** As lesões orais são frequentes na fase aguda da CHIKD, especialmente em pacientes com quadro clínico mais exuberante e contribuem para a morbidade da doença. O aparecimento da lesão não está relacionado a presença do vírus ou a secreção de mediadores inflamatórios na saliva, mas o vírus na saliva parece induzir resposta pró-inflamatória na cavidade oral.

Palavras-chave: 1. Chikungunya; 2. Manifestações orais; 3. Saliva.

II. OBJETIVOS

PRINCIPAL

Descrever a manifestação oral da CHIKD, relacionando com o quadro sistêmico, a presença do vírus na saliva e a resposta imune local.

ESPECÍFICOS

1. Avaliar a frequência e características de lesões orais em pacientes com infecção aguda por CHIKV.
2. Correlacionar a presença de lesão oral com sintomas sistêmicos.
3. Relacionar a ocorrência de lesão oral com a presença de vírus e com a resposta imune na saliva.

III. INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV), membro do gênero *Alphavirus* e da família *Togaviridae*, é um RNA vírus, transmitido para humanos pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (PIALOUX et al., 2007). O CHIKV foi isolado e descrito inicialmente na Tanzânia em 1952, durante uma epidemia no planalto de Makonde, na província do sul de Tanganyika, a leste da África. Inicialmente, a doença apresentava características indistinguíveis da dengue, porém não havia relatos de dengue na região ou casos de epidemias semelhantes. Diante da intensidade das dores articulares, que leva o paciente a deambular curvado, em posição antálgica, a doença foi denominada Chikungunya, termo que significa “andar curvado” na língua maconde (ROBINSON, 1995).

Posteriormente à descoberta do CHIKV, pequenos surtos foram observados no continente asiático, na Tailândia, nos anos 50 e 60, seguidos pelos surtos na Índia, entre 1960 e 1969 (HALSTEAD et al., 1969; MYERS et al., 1967). A doença estendeu-se para regiões da Europa e para arquipélago do Pacífico e as Américas a partir de 2004 (PETERSEN e POWERS, 2016). Entretanto, números de casos mais expressivos da doença ocorreram a partir de 2005, na Ásia e na Ilha de La Réunion, localizada no Oceano Índico. Nessa última, foram registrados cerca de 266.000 casos suspeitos, incluindo formas graves da doença, consideradas incomuns, como meningoencefalite (RENAULT et al., 2007; GERARDIN et al., 2008). Detectou-se também, pela primeira vez, a possibilidade de transmissão materno-infantil no período perinatal, com elevada taxa de morbidade (RAMFUL et al., 2007), apesar de não haver registro de malformações fetais relacionadas a doença.

No Brasil, os primeiros casos de doença Chikungunya (CHIKD) ocorreram em 2014, na cidade do Oiapoque, no Amapá e no município de Feira de Santana, na Bahia (BRITO, 2017). De acordo com o Boletim epidemiológico publicado pela Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, observou-se a confirmação de 303.208 casos de CHIKD no Brasil,

entre os anos de 2016 e 2017, período correspondente à coleta de dados do atual estudo. A região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência de casos prováveis de Febre Chikungunya, com registro de 377.267 casos, seguido pela região Sudeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2017b; 2018). Na Bahia, neste mesmo período, foram confirmados 10.611 casos, com destaque para as macrorregiões Sul e Extremo-Sul (SESAB, 2016; 2017).

No Ceará, até julho de 2017, o Sinan registrou 50.570 suspeitas de Chikungunya, sendo 49.000 em Fortaleza e 1.570 de residentes em outros municípios (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE FORTALEZA, 2017).

Diante disso, desde a descoberta do vírus, observa-se uma expansão dos casos da CHIKD, com surtos de pequena e grande expressividade em distintas regiões geográficas, com a presença de três genótipos diferentes, denominados: da África Ocidental, da África do Leste/Centro/Sul (ECSA) e o asiático (WEAVER, 2015). Na África, observa-se um ciclo silvestre do vírus, envolvendo primatas não humanos e habitações florestais, já no genótipo asiático, um ciclo de transmissão silvestre não foi identificado (HIGGS & VANLANDINGHAM, 2015). No Brasil, há circulação do ECSA e asiático (RODRIGUES, 2017). De acordo com Nunes et al. (2015), a presença desses dois genótipos no Brasil sugere que aproximadamente 94% da população brasileira possui risco de infecção por CHIKV.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1. Fisiopatogênese da Chikungunya

A transmissão do CHIKV ocorre através da picada do mosquito infectado. Nessa infecção, há um período de incubação de 2 a 6 dias, quando surge um quadro clínico exuberante de sinais e sintomas que pode comprometer a qualidade de vida do paciente (CUNHA & TRINTA, 2017). Na infecção por CHIKV há inicialmente replicação do vírus nos leucócitos, fígado e baço e posterior disseminação através da microvasculatura e sistema linfático, alcançando locais do corpo como articulações, músculos e ossos (COURDEC et al., 2008; ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013). A viremia induz uma resposta imune aguda nos indivíduos infectados, os quais desenvolvem sintomas clínicos gerais e processo inflamatório local, atingindo tendões e articulações, com remissão espontânea em 2 a 4 semanas. Entretanto, algumas articulações podem permanecer inflamadas por meses ou até anos, com evolução para o reumatismo crônico (SIMON et al, 2015). Além disso, há o relato da presença do RNA viral e citocinas no líquido sinovial em um paciente com artrite crônica, sugerindo que o desenvolvimento da lesão pode ser decorrente da presença de células da resposta imune, encontradas na sinóvia, e da disseminação do vírus, inclusive nas articulações (HOAROU et al., 2010). A CHIKD pode apresentar três fases: aguda, subaguda e crônica, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2011).

IV. 2. Quadro clínico na fase aguda

Na fase aguda, sintomática em 80 a 97% dos casos, com duração de até 21 dias, há uma elevada carga viral associada à febre alta de início súbito, poliartalgia (dor em múltiplas articulações) que afeta regiões como joelhos, tornozelos, ombros, cotovelos, pulsos e falanges (RAMACHANDRAN et al., 2012). A poliartralgia pode estar associada a edema intenso e, comumente, afeta as articulações dos membros de forma simétrica e bilateral (CUNHA &

TRINTA et al., 2017). O quadro de artrite pode comprometer significativamente a mobilidade e frequentemente, impede de desenvolver atividades laborais. Ocorrem ainda mialgia, cefaleia (dor de cabeça), rash cutâneo maculopapular, principalmente em tronco e extremidades, prurido, dor retro-ocular, vômitos, adinamia, fadiga, linfadenopatia generalizada, astenia, fotofobia, diarreia, dor abdominal (MARQUES, 2017). Podem ser observadas anormalidades hematológicas como leucopenia com linfopenia e trombocitopenia moderada (THIBERVILLE et al., 2013). Complicações também foram descritas como manifestações hemorrágicas, miocardite, meningoencefalite (CASTRO et al., 2016), além da descompensação de doenças cardíacas, respiratórias, renais, sistêmicas e metabólicas, manifestações oculares, como uveíte, desidratação, tromboembolia e perda de autonomia (MOHAN et al., 2010; SIMON et al, 2015). Entretanto, podem ocorrer infecções assintomáticas, as quais variam de acordo com a epidemia, faixa etária e genótipo circulante (CUNHA & TRINTA, 2017).

Desse modo, a fase aguda da CHIKD caracteriza-se por manifestações clínicas sistêmicas exuberantes típicas de patologia causada por arbovírus. Lesões mucosas também foram descritas na CHIKD e podem afetar a mucosa oral, genital e conjuntiva. (SIMON et al., 2015).

IV. 2.1. Lesões tegumentares e de mucosa oral na fase aguda da Chikungunya

Na infecção pelo CHIKV, comumente são observadas erupções maculopapulares. Porém outras formas de manifestações cutâneas são relatadas. Recentemente, lesões pruríticas e equimóticas em adultos, em região de tronco e flexores dos membros, além de bolhas subepidérmicas e lesões que se assemelham à necrólise epidérmica tóxica têm sido observadas (PAKRAN et al., 2011). Kumar et al. (2017) demonstraram também a presença de vários tipos de pigmentação, localizadas principalmente no nariz, face, tronco, pescoço e palmas, além de lesões purpúricas, vesículas e bolhas.

Poucos relatos de lesões orais foram descritas na fase aguda da CHIKD. As manifestações orais foram descritas em 2,9% a 95% dos pacientes com CHIKV, em 8 estudos que avaliaram entre 75 e 354 indivíduos. Estes estudos foram realizados em sua maioria na Índia (7/8), país que vivenciou surto desta arbovirose nos anos 60 e 70 e apresentou ressurgimento da doença depois de 40 anos (KANNAN et al., 2009; SURYAWANSHI et al., 2009; SINGARAJU et al., 2010; RIYAZ et al., 2010; BHAT et al., 2011). Dentre as manifestações, podem ocorrer lesão aftosa, estomatite, úlcera, erupção vesículo bolhosa e sangramento gengival as quais contribuem para a morbidade da CHIKD (SURYAWANSHI et al., 2009; KATTI et al., 2011). Entretanto, a relação entre as lesões orais e os sintomas sistêmicos da CHIKD bem como a resposta imune na saliva não é conhecida (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). Assim, apesar de pouco investigadas, as lesões orais fazem parte das manifestações clínicas da fase agudas da CHIKD.

IV.3. Quadro Clínico na Fase subaguda e Crônica da CHIKD

Diferente de outras arboviroses como Dengue e Zika, a doença pode evoluir para a fase subaguda, que dura de 21 dias até 3 meses (OPAS, 2011). Nessa fase, que ocorre em cerca de 50% dos pacientes, a mialgia e artralgia podem persistir. Ocorre quadro inflamatório frequente, incluindo exacerbação favorecidas pelo frio nas regiões previamente acometidas na fase aguda, com desenvolvimento de bursite e tenossinovite hipertrófica subaguda em mãos associada a rigidez matinal (MARQUES, 2017). Este período está associado à descompensação de artropatia degenerativa ou traumática preexistente, como no caso da osteoartrite ou tendinite, além de eventos locais como dor neuropática. Diante disso, a ausência de tratamento anti-inflamatório, estresse físico excessivo ou até mesmo um repouso articular completo e prolongado pode ter um efeito deletério na recuperação clínica, nesta fase. São observados ainda astenia e distúrbios neuropsicológicos. Nesse estágio, não há mais episódios de febre (SIMON et al., 2015; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; BRASIL, 2017a)

A doença tende a progredir para a cura sem deixar sequelas, de maneira espontânea ou posteriormente à terapia. Entretanto, pode haver a persistência dos sintomas articulares ou agravamento (SIMON et al., 2015). Em torno de 40 a 75% dos pacientes evoluem para a fase crônica (GÉRARDIN et al., 2011; CASTRO et al., 2016), com relatos de até 95% (WEAVER & LECUIT et al., 2015), caracterizada por sintomas persistentes semelhantes aos observados no estágio pós-agudo, como dores musculares e articulares, com comportamento flutuante, sendo descritas como poliartrite com dores e rigidez matinais. Estas manifestações, são simétricas e afetam múltiplas regiões, principalmente os dedos das mãos e dos pés, tenossinovite afetando punhos e tornozelos, além da exacerbação da dor em articulações previamente lesadas, dores neuropáticas, desordens de memória, do sono e depressão (MOHAN et al., 2010; SIMON et al., 2011; SCHILTE et al., 2013; WAYMOUTH et al., 2013). De acordo com o estudo de Manimunda et al (2010), os sinais e sintomas mais observados durante o 10º mês de acompanhamento de 200 pacientes com CHIKD, foram observados dores nas articulações, fadiga, sensação de formigamento e dormência das extremidades (em 6% dos pacientes). Além disso, após exame de ressonância magnética em um subgrupo, foi possível observar derrame articular, erosão óssea, edema da medula óssea e espessamento sinovial. Nas fase subaguda e crônica não foram observados relatos de lesões orais.

Desse modo, apesar da CHIKD diferenciar-se de outras arboviroses como Zika e Dengue por ser trifásica, os sinais e sintomas na fase aguda são indistinguíveis e o diagnóstico conclusivo deve basear-se em exames laboratoriais.

IV. 4. Diagnóstico

Como estratégia diagnóstica da infecção pelo CHIKV, inclui-se a avaliação clínica, com identificação dos sintomas sugestivos de arbovirose, como febre de início abrupto, artralgia e rash cutâneo (SISSOKO et al., 2009). Esses sintomas são inespecíficos e podem estar presentes

em outras arboviroses. Dessa forma, os testes laboratoriais com técnicas moleculares e sorológicas são essenciais para o diagnóstico diferencial na fase aguda (CASTRO et al., 2016; BRASIL, 2017a).

A detecção do vírus nas amostras é realizada através do RT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction) e RT-qPCR (Real Time RT-PCR). RT-PCR é o método de escolha para detecção e confirmação precoce do vírus, entretanto o RT-qPCR tem demonstrado maior rapidez, confiabilidade, baixo risco de contaminação e elevada sensibilidade e especificidade na detecção do RNA do CHIKV (PARIDA et al., 2008; WANG et al., 2016; ESPOSITO et al., 2017). Ambas as técnicas permitem um diagnóstico precoce do RNA viral nas amostras de sangue coletado, na fase aguda da doença, de um a sete dias após o início dos sintomas (PRAT et al., 2014; JOHNSON et al., 2016; BRASIL, 2017a).

O teste molecular para detecção dos arbovírus pode ser feito em amostra de sangue, saliva e urina, entre outros. O soro sanguíneo é o principal meio utilizado para detecção do CHIKV ou do RNA viral (JOHNSON et al., 2016). A saliva também pode ser utilizada para detecção do RNA viral. Musso et al (2016), durante a primeira semana do início dos sintomas, detectaram vírus na saliva de 21 dos 36 pacientes avaliados. Entretanto, a taxa de detecção no sangue é significativamente maior em comparação à saliva (teste exato de Fisher $p = 0.008$). Desse modo, deve-se priorizar as amostras de sangue. Amostras de urina parecem não ampliar a janela de detecção do RNA do vírus Chikungunya, entretanto na urina é possível detectar outros arbovírus como o ZIKV (MUSSO et al., 2016; Mead et al, 2018).

A partir dos primeiros dias de doença, anticorpos específicos podem ser detectados no soro de pacientes infectados. Para a pesquisa de anticorpos IgM e IgG contra o CHIKV, após o 5º dia do início dos sintomas, são utilizadas as técnicas sorológicas como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e imunofluorescência indireta, além do teste rápido através do método de imunocromatografia (PIALOUX et al., 2007; SIMON et al., 2008). A sensibilidade do ELISA é baixa para a maioria dos pacientes na fase aguda da CHIKD, a qual incluem os 5

primeiros dias (KASHYAP et al., 2009). Para a obtenção de um melhor desempenho, o ELISA deve ser realizado entre o 7º e 10º dia, para detecção de anticorpos IgM, e entre o 10º e 14º dia para detecção de IgG, com a sensibilidade oscilando entre 85% e 98% e a especificidade acima de 90% (MARQUES et al., 2017; WAYMOUTH et al., 2013).

A confirmação diagnóstica através de exames laboratoriais não é realizada na rotina em situações de epidemia, entretanto, é essencial na conduta e tratamento dos casos com complicações.

IV. 5. Tratamento

Assim como para outras arboviroses, o tratamento da CHIKD é sintomático. Deve-se avaliar a presença de comorbidades, como diabetes e hipertensão arterial, as quais podem ser descompensadas devido à infecção pelo CHIKV na fase aguda. A ingestão de líquidos para evitar a desidratação e o repouso absoluto, combinados com o uso de fármacos para o alívio de sintomas, são as principais orientações na abordagem dos pacientes (CUNHA & TRINTA, 2017).

O uso de analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides (AINES) para controle de dores e processo inflamatório, como artrite, são as terapias medicamentosas utilizadas para manejo da dor nos pacientes com infecção confirmada por CHIKV. Na fase aguda, o uso de corticosteroides é controverso, pois alguns autores acreditam que estes poderiam suprimir o sistema imunológico, exacerbando a doença (THARMARAJAH et al., 2017). Outros entretanto, propõem o uso combinado de anti-inflamatórios não esteroidais com corticosteroides, para alívio da dor artrítica na fase aguda da CHIKD e melhora na qualidade de vida (PADMAKUMAR et al., 2009). Atenção especial deve ser dada para a exclusão de coinfeção com o DENV, no qual o uso de anti-inflamatórios é proscrito.

Além da terapêutica medicamentosa, o desenvolvimento de vacinas contra o CHIKV apresenta-se como uma forma promissora de controle efetivo da disseminação do arbovírus.

Apesar da existência de várias tecnologias para desenvolver as vacinas, que gerariam altos níveis de anticorpos e forneceria imunidade duradoura, ainda não há uma vacina licenciada disponível (WEAVER et al., 2012). Entretanto, há pesquisas em desenvolvimento. Em um estudo duplo-cego controlado por placebo, em fase 2, a vacina de vírus atenuado de Chikungunya foi segura, produzindo efeitos colaterais bem tolerados, como artralgia transitória em 8% dos 59 voluntários, e foi altamente imunogênica. Desse modo, trata-se de uma vacina promissora em indivíduos que não tiveram contato prévio ao *alphavírus* (EDELMAN et al., 2000; POWERS, 2017).

A despeito da terapêutica sintomática, a CHIKD apresenta uma elevada taxa de morbidade tanto na fase aguda quanto na subaguda e crônica. A doença pode afetar as atividades da vida diária dos indivíduos, levando à incapacidade e redução da produtividade (BRASIL, 2017a). O comprometimento da qualidade de vida, evidente na fase crônica, pode advir desde a fase aguda, quando a doença tem sua expressão clínica mais exuberante. A doença compromete os domínios físico e emocional, sendo considerada altamente debilitante. No início da doença, a morbidade causada pela infecção afeta a capacidade de vestir-se, levantar-se da cama ou ir ao banheiro. Na fase crônica, o comprometimento musculoesquelético persiste, afetando a mobilidade e aumentando a dependência de outras pessoas. Em relação aos aspectos emocionais, a perspectiva de que a doença pode permanecer por um longo período ocasiona ansiedade, estresse e falta de esperança (ELSINGA et al., 2017). Nesses casos pode ser necessário o uso de drogas para tratamento da ansiedade e depressão.

Desse modo, observa-se que a CHIKD ocasiona uma intensa morbidade relacionada aos sinais e sintomas induzidos pela infecção viral. A manifestação clínica relaciona-se ao processo inflamatório deflagrado pela presença do vírus e pelos mecanismos imunológicos de defesa.

IV. 6. Resposta Imune ao CHIKV

Na resposta imune inata ao CHIKV, monócitos, fibroblastos e outras células, ao serem infectadas pelo vírus, desencadeiam uma cascata de sinalização que leva à ativação de interferons tipo I (IFNs) e à transcrição de citocinas e quimiocinas que são rapidamente produzidas e controlam a replicação viral. Observa-se a produção de IFN- α e de IFN- γ , em níveis variados, na primeira semana de infecção e nos primeiros três dias de sintomas, na maioria dos pacientes, respectivamente (HER et al., 2010; SCHWARTZ et al., 2010; WAUQUIER et al., 2011, CHOW et al., 2011). Além disso, há produção de IL-12, também nos estágios precoces da fase aguda da infecção (TENG et al., 2011).

Estas citocinas são produzidas a partir do reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos pelos receptores de reconhecimento padrão, tais como os receptores do tipo Toll (TLRs) e receptores induzíveis por ácido retinóico (RLRs). Na CHIKD, os receptores potenciais incluem TLR3, o qual reconhece RNA de fita dupla; TLR7 e TLR8, os quais são ativados por RNA de fita simples e RLRs (SCHWARTZ et al., 2010; TENG et al., 2011). Por fim, as células infectadas colaboram com a disseminação viral em órgãos como músculos e articulações, deflagrando o espectro de sinais e sintomas da CHIKD (SCHWARTZ et al., 2010).

Na ativação da resposta imune adaptativa, os antígenos virais são apresentados às células T e B naive as quais se proliferam e se diferenciam em células efetoras, desempenhando suas funções contra o vírus e também são processados pelas células dendríticas e posteriormente apresentados aos órgãos linfoides secundários (TENG et al., 2011). De acordo com Borgherini et al. (2007), na infecção pelo CHIKV, observa-se uma linfopenia aguda, com redução de linfócitos B e T circulantes em 80% dos indivíduos avaliados. Este quadro não é ocasionado por ação do vírus nessas células, pois não há infecção de linfócitos B e T pelo CHIKV. Entretanto, acredita-se que os Interferons do tipo I induzem a migração desses linfócitos para os tecidos, além da morte celular destes, ocasionando a linfopenia (KAMPHUIS et al., 2006). Elevados níveis de CXCL10, CCL2 e IL-6 podem ser detectados na fase aguda da infecção pelo CHIKV, havendo, entretanto, uma redução progressiva à medida que os pacientes convalescem.

Esses altos níveis de CXCL10, CCL2 e IL-6 na fase aguda indicam o início da imunidade adaptativa de células T. Destaca-se também a citocina CXCL10 como um possível biomarcador de severidade da CHIKD, sendo detectado, significativamente, em pacientes com sintomas moderados a severos (KELVIN et al., 2011).

Observa-se incremento dos níveis de IL-1 β , citocina envolvida na imunopatogênese de patologias artríticas, em associação a um nível elevado de severidade da CHIKD e potencialmente envolvida no incremento da artralgia da doença (DINARELLO, 1996; NG et al., 2009). Entretanto, Kelvin et al., (2011), abordaram que a expressão de distintas citocinas, dentre elas a IL-1 β , estão em níveis reduzidos nos estágios iniciais da doença e aumentam sua expressão à medida que os pacientes se recuperaram da fase aguda. Do mesmo modo, Nayak et al. (2017) avaliaram a expressão de citocinas pró-inflamatórias derivadas de macrófagos e descobriram um incremento na secreção de TNF e IL-6 durante a infecção pelo CHIKV. A indução de outras citocinas e quimiocinas, como IFN- α , IL-1Ra, IL-4, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15 também estão significativamente aumentadas em pacientes com CHIKD, em sangue periférico, na fase aguda (mediana de 4 dias após o início da doença) (CHOW et al., 2011). Entretanto, observaram que os níveis de IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, fator de necrose tumoral - α e fator de crescimento endotelial vascular estavam abaixo do limite de detecção na maioria dos pacientes em todas as 4 coletas realizadas no estudo (4 dias, 10 dias, 4-6 semanas e 2-3 meses após o início dos sintomas) (CHOW et al., 2011, NAKAY et al., 2017). Conforme observado, para algumas citocinas, como a IL-12, os níveis séricos apresentam resultados conflitantes no mesmo estudo, variando de altos níveis a valores baixos na fase aguda da doença, em diferentes pacientes, e no caso da IL-1 β , também há expressão em níveis variados, em distintos estudos (DINARELLO, 1996; NG et al., 2009, KELVIN et al., 2011).

Não há estudos avaliando a resposta imune na saliva de pacientes durante a infecção aguda por CHIKV e pouco se conhece sobre o comprometimento da mucosa oral na infecção por CHIKV. No presente estudo pretende-se descrever as características das manifestações

clínicas orais, correlacionando-as com o quadro sistêmico e resposta imune na saliva, na fase aguda da infecção pelo CHIKV.

V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1. Desenho do estudo e população

Trata-se de um estudo de corte transversal, no qual foram incluídos 204 indivíduos com suspeita de infecção aguda por arbovírus. Os pacientes foram recrutados diretamente em pequenas comunidades rurais ou durante atendimento em Unidades de Saúde dos municípios de Campo Formoso, Senhor do Bonfim, Itabuna, Vitória da Conquista (Bahia) e Maranguape (Ceará), de março de 2016 a junho 2017, durante surto de arbovirose. A pesquisa foi realizada em dois tempos: na fase aguda, com menos de 10 dias de início dos sintomas e 3 a 5 meses após o início do sintomas, para avaliação da persistência da artralgia (n=93 pacientes). Foram incluídos todos os indivíduos com suspeita de arbovirose (presença de erupção maculopapular e/ou febre associada a pelo menos dois sintomas: coceira na pele, artrite, artralgia, cefaleia, mialgia e dor retroocular).

Foram excluídos pacientes com diagnóstico prévio de imunodeficiência, em uso crônico de imunossupressores; com um ou mais sintomas de infecção das vias aéreas superiores, como coriza, espirros, rinorréia e obstrução nasal. Os indivíduos foram submetidos a uma avaliação clínica com preenchimento de questionário com dados clínicos e epidemiológicos. Além da avaliação clínica sistêmica, foi realizado exame intrabucal por Cirurgiã Dentista e/ou Otorrinolaringologista, no qual avaliou-se a presença de dor, lesão na boca, seu aspecto (úlceras, sangramento, vesícula, edema, hiperemia), sua localização (ANEXO 1). Após avaliação clínica, foram coletadas amostras de sangue, urina e saliva para avaliação diagnóstica. Foram excluídos os pacientes com infecção concomitante de Dengue e Zika vírus.

V.2. Ética

As investigações clínicas foram conduzidas de acordo com os princípios contidos na Declaração de Helsinque. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da

Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia. Número: 1.657.324 (ANEXO 2). O Consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes ou responsáveis legais no estudo (ANEXO 3).

V.3. Coleta de dados e processamento de amostras

Foram coletados através de punção venosa periférica, 20 ml de sangue em tubos contendo heparina (BD Vacutainer) e 4 ml em tubos contendo EDTA (BD Vacutainer). Essas amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com temperatura entre 20-25 °C, as quais foram conduzidas ao laboratório para processamento em até 24 horas. Também foram coletadas amostras de saliva nas regiões do assoalho bucal e mucosa jugal, utilizando swab oral estéril (Labor Import), e amostras de urina em coletor, sendo ambas as amostras acondicionadas em gelo seco até o transporte ao laboratório, onde foram armazenadas a -80 °C até sua utilização.

As amostras coletadas em tubos contendo EDTA foram centrifugadas a 450g a 4°C por 15 minutos para obtenção do plasma que foi armazenado a -80 °C até o uso.

V.4. Isolamento de RNA, PCR em Tempo Real, Sorologia (ELISA), avaliação da expressão gênica de mRNA de citocinas e quimiocinas

O RNA viral foi isolado a partir de amostras de plasma, urina e saliva utilizando QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN). Inicialmente foi adicionado 140 µl de cada amostra, separadamente, para o microtubo de 1,5 mL contendo tampão AVL, com posterior aplicação do vórtex por 5 segundos. Realizou-se a incubação por 10 minutos, em temperatura ambiente (TA) e aplicação de vórtex e spin. Adicionou-se 560 µl de etanol grau molecular, seguida por nova aplicação de vórtex. Após transferência da solução (até 630 µl) para a coluna acoplada ao tubo coletor e centrifugação de 13000 xg por 1 minuto (TA), foi feito o descarte do material do tubo coletor e repetição dos dois últimos procedimentos, na mesma coluna, com tubo coletor

até que toda amostra fosse processada. Em seguida descartou-se o tubo coletor e a coluna foi posicionada em um novo tubo. Foi adicionado 500 µl de Buffer AW1 à coluna, seguida por sequências de centrifugação de 13000 xg por 1 minuto (TA) alternadas pela adição de 500 µl de Buffer AW2 à coluna e 50 µl de RNase-free water no centro da coluna. Por fim, foi realizada a incubação por 1 minuto (TA), centrifugação de 13000 xg por 1 minuto (TA) e armazenamento em -80°C.

A amplificação foi realizada através de PCR em tempo real utilizando o kit ZDC Molecular Kit (IBMP) e a confirmação com CDC Trioplex Real-time RT-PCR Assay (CDC) para cada uma das arboviroses (Chikungunya, Dengue e Zika). Para a realização do ensaio Trioplex RT-PCR em tempo real, foi calculado o volume dos componentes e em seguida misturados em um microtubo 1,5 ml estéril (calculado com 10% a mais de volume), com volume final da reação de 25 µl. Posteriormente aplicou-se vórtex e spin ao mix e dispensação de 15 µl do mix em cada poço da placa de qPCR, com envolvimento da placa em papel alumínio para evitar contato com a luz. Mapeou-se a placa de qPCR, utilizando em posteriormente o equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems, seguindo a reação abaixo:

SuperScript III			
Thermocycling Conditions			
STAGE 1	STAGE 2	STAGE 3 STEP 1	STAGE 3 STEP 2
30 min	2 min	15 sec	1 min
55°C	95°C	95°C	60°C
1 rep		1 rep	
45 cycles			

Os ensaios de ELISA (sorologia) para Chikungunya, Dengue e Zika foram realizados com kits para detecção de IgM (Euroimmun, Lübeck, Alemanha). Para a realização do ensaio de ELISA para detecção de IgM anti-Chikungunya, executou-se inicialmente a incubação das amostras, a qual consistiu na dispensação de 100µl do calibrador e de amostras diluídas dos pacientes na microplaca, uso de película protetora sobre a microplaca e incubação por 1 hora,

a 37 °C em câmara umidificada. Em seguida foi realizada a incubação do conjugado, a qual houve a remoção da película protetora, lavagem da placa por 3 vezes com 450µl de tampão de lavagem, dispensação de 100µl do conjugado enzimático (anti-IgM humano marcado com peroxidase) em cada poço da microplaca, finalizando com a cobertura da microplaca com película protetora e incubação por 30 minutos (TA). Posteriormente foi realizada a incubação do substrato, na qual foi removida a película protetora, realizou-se a lavagem da placa por 3 vezes com 450µl de tampão de lavagem, dispensação de 100µl da solução substrato/cromógeno em cada um dos poços da microplaca, cobertura da microplaca com a película protetora, incubação por 15 minutos (TA). Em seguida foi realizada a parada da reação, na qual houve remoção da película protetora, dispensação de 100µl de solução de parada em cada um dos poços da microplaca, manutenção da placa em repouso à temperatura ambiente por 1 minuto. Por fim, realizou-se a medição fotométrica da intensidade de cor e o cálculo dos resultados (valores acima do cut-off indicado foram considerados como positivos, e valores abaixo como negativos).

Para expressão gênica dos transcritos de mRNA das citocinas e quimiocinas CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, IL-1 β , TNF- α e IL-6 foi realizada síntese do DNA complementar, utilizando a enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. Para amplificação foi utilizado o kit TaqMan Gene Expression Assay (FAM) (ThermoFisher Scientific). Inicialmente foram selecionados os marcadores IL-1 β , IL-6, TNF α , CCL2, CXCL10, acondicionados em -20°C. Em tubos de microcentrífuga estéril de 1,5 mL para cada amostra foi realizada a pipetagem do mix de reação de PCR de 20 µl, composta por 10 µl de TaqMix, 1 µl do marcador, 5 µl de água e 4 µl da amostra. Os tubos foram tampados, invertidos várias vezes para misturar e centrifugados brevemente. A placa foi selecionada e o mix foi transferido para cada poço da placa de reação. Posteriormente, selou-se a placa com uma tampa apropriada e esta foi brevemente centrifugada. Em seguida, a placa foi

colocada no equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems, após sua identificação (cDNA_arbovírus). Por fim, realizou-se a análise dos resultados.

V.5. Análise estatística

A distribuição das variáveis categóricas e quantitativas foram avaliadas a partir do teste de Kolmogorov Smirnov, sendo as variáveis categóricas expressas pelas frequências relativas e absolutas e as contínuas por mediana e intervalo interquartil (IIQ).

Os testes univariados em relação ao desfecho foram os testes estatísticos não paramétricos qui quadrado e teste exato de Fisher, para variáveis categóricas, e Mann Whitney para contínuas. Numa análise secundária, foi utilizada regressão logística com as variáveis que apresentaram $p < 0,01$ na análise univariada. Valores de p considerados estatisticamente significantes foram aqueles inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

Os testes estatísticos foram realizados através do *software* *SSPS* 13.0 e a construção dos gráficos de barra e heatmap pelo *software* *Graphpad Prism* versão 7.0

VI. RESULTADOS

VI.1. Seleção dos pacientes com CHIKD

Foram coletadas 204 amostras de sangue, saliva e urina de pacientes com suspeita de arboviroses com menos de 10 dias de evolução. Desses, 105 apresentaram positividade apenas para Chikungunya no RT-qPCR e/ou IgM, sendo que 36 deles apresentaram lesões orais. Após 3 a 5 meses de início dos sintomas, 93 pacientes foram reavaliados e 62 apresentaram persistência de sintomas de artropatia (Figura 1).

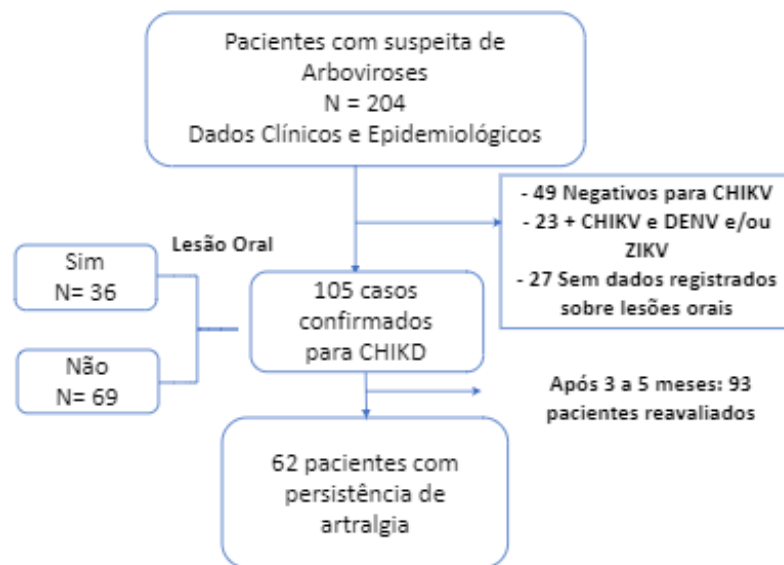


Figura 1. Fluxograma da seleção dos pacientes com suspeita clínica de arboviroses aguda. Pacientes foram submetidos a avaliação clínica-laboratorial com análise da cavidade oral, e reavaliados para persistência dos sintomas, após 3 a 5 meses.

VI.2. Diagnóstico laboratorial dos pacientes via RTq-PCR, de amostras de sangue, urina e saliva, e sorologia

Dos 105 pacientes com CHIKD, cerca de 40% apresentaram positividade nos testes de ELISA ou de RT-qPCR e aproximadamente 20% testaram positivo nos dois métodos. Das amostras positivas no RT-qPCR, a maioria foi detectada no plasma. Apenas dois casos foram positivos exclusivamente na saliva (Figura 2)

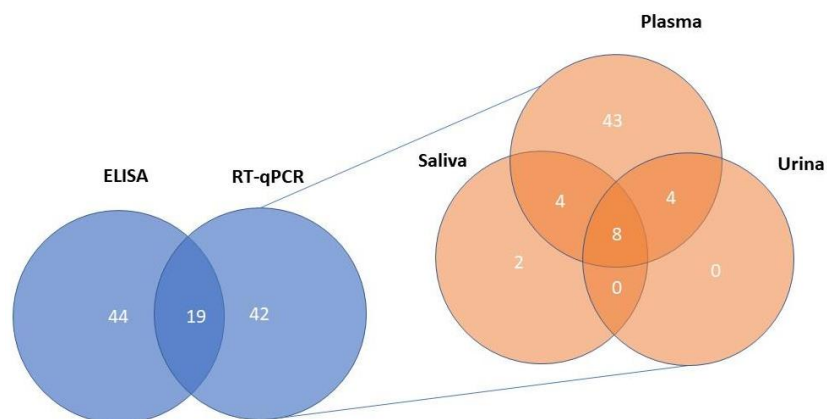


Figura 2. Diagnóstico dos 105 casos de CHIKD, através das técnicas de ELISA e RT-qPCR

VI.3. Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com diagnóstico conclusivo de CHIKD, baseado na presença de lesões orais

As lesões orais foram observadas em 34% dos pacientes com CHIKD, sendo mais frequente no sexo feminino (Odds Ratio – OR- 3,2, $p < 0,05$). As lesões surgiram em uma mediana de 5 dias após o início dos sintomas e tiveram duração mediana de 3 dias (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas e epidemiológicas dos 105 pacientes com Chikungunya, de acordo com a presença da lesão oral

	Lesão Oral		p*
	SIM n=36 (34%)	NÃO n= 69 (66%)	
Sexo Feminino - n (%)	28 (77,8)	36 (52,2)	0,01
Idade em anos – mediana (IIQ)	47 (28 - 57)	42 (27 - 60)	0,95
Duração da lesão oral em dias [†] - mediana (IIQ)	3 (2 - 4,75)	NA	NA
Tempo de doença até desenvolvimento da lesão oral, em dias– mediana (IIQ)	5 (2 – 7)	NA	NA
Persistência de artralgia de 3 a 5 meses [‡] - (%)	71%	65%	0,534

* Teste de U Mann-Whitney , † n = 13 , ‡ n = 93

(IIQ)= Intervalo interquartil

VI.4. Sinais, sintomas e localização das lesões orais nos pacientes com CHIKD

Foram avaliados dados de sinais e sintomas e localização das lesões orais de 32 dos 36 pacientes com CHIKD. A maioria dos pacientes com CHIKD apresentaram dor na boca (72%) e dificuldade de alimentar-se (59%), e cerca de 16% apresentaram sangramento. As lesões tinham aspecto de úlceras orais em cerca de metade dos casos, mas também foram observadas vesículas e edema (Figura 3). As lesões orais ocorreram em diferentes sítios da boca, com maior frequência na língua, gengiva e lábios (Figura 4).

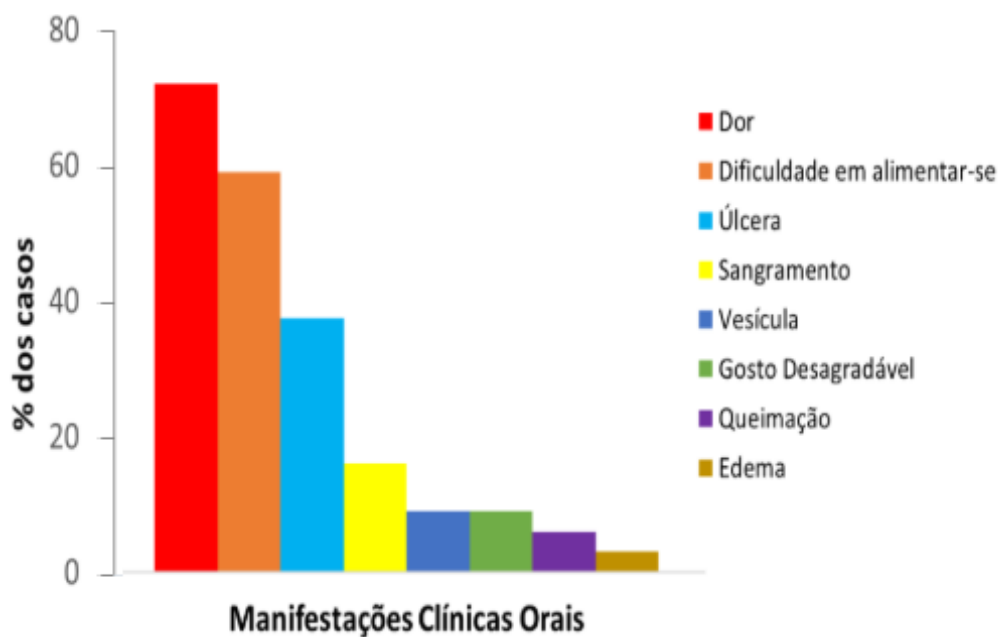


Figura 3. Manifestações clínicas orais de 32 pacientes com CHIKD aguda

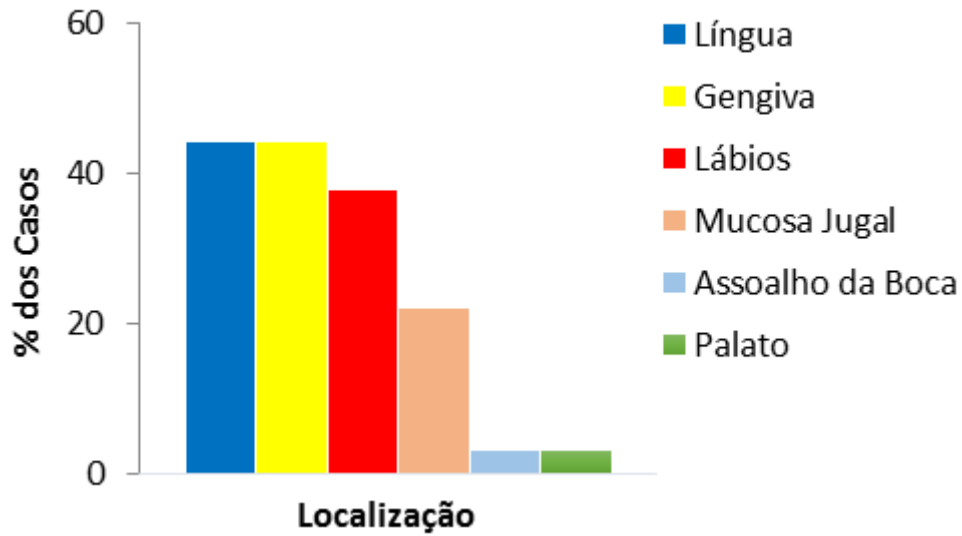


Figura 4. Local da lesão oral de 32 pacientes com infecção aguda por Chikungunya Vírus

VI.5. Apresentação clínica das lesões orais identificadas nos pacientes com CHIKD

As lesões da mucosa foram clinicamente caracterizadas como úlceras arredondadas com margens circunscritas e halo-eritematoso, além da presença de regiões edematosas e eritematosas na gengiva marginal (Figura 5).

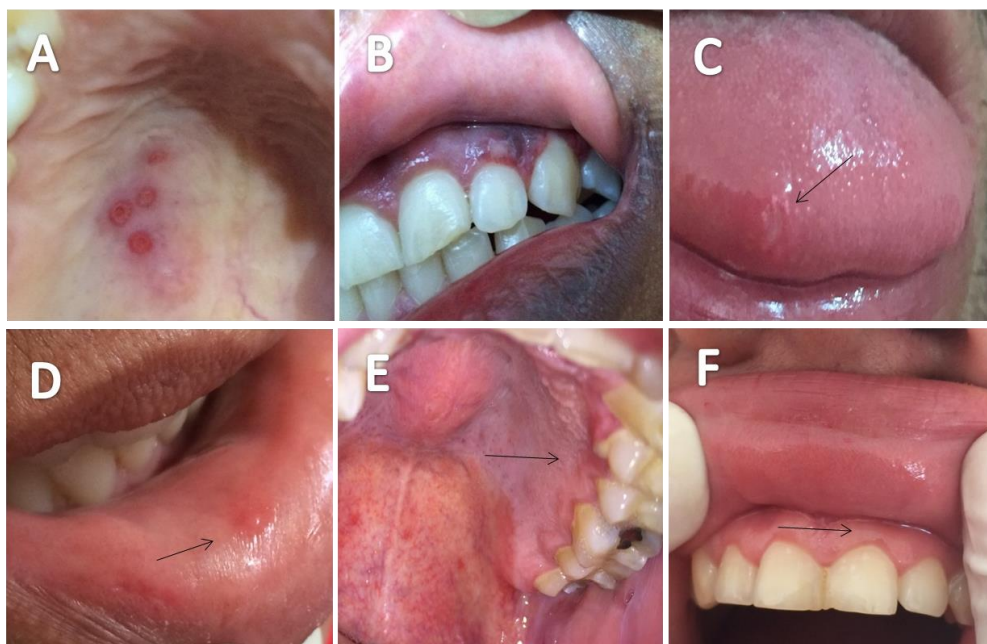


Figura 5. Aspecto clínico e localização das lesões orais em pacientes com CHIKD. A-C) Lesões ulceradas arredondadas, com margens circunscritas e halo-eritematoso, em regiões de palato duro (A),

gingiva marginal na vestibular do incisivo lateral superior esquerdo (B), língua (C), e lesão vesículo-bolhosa em lábio superior (D). E-F) Regiões edematosas e eritematosas em gengiva marginal lingual dos pré molares superiores esquerdos (E), e vestibular do incisivo superior esquerdo (F).

VI.6. Associação entre as lesões orais e as manifestações sistêmicas nos pacientes com CHIKD

A presença de lesão oral esteve associada a outras manifestações sistêmicas na fase aguda da doença, como rash cutâneo, prurido, mialgia, edema e dor retro-ocular ($p < 0,05$). Em uma análise de regressão logística ordinal, na qual as variáveis com significância estatística foram testadas em uma análise multivariada, apenas o rash apresentou significância estatística em relação à presença de lesão oral (Odds Ratio - OR - 7.817, $p=0,01$), ou seja, a lesão oral apresentou maior probabilidade de ocorrência em indivíduos com rash maculopapular (Figura 6).

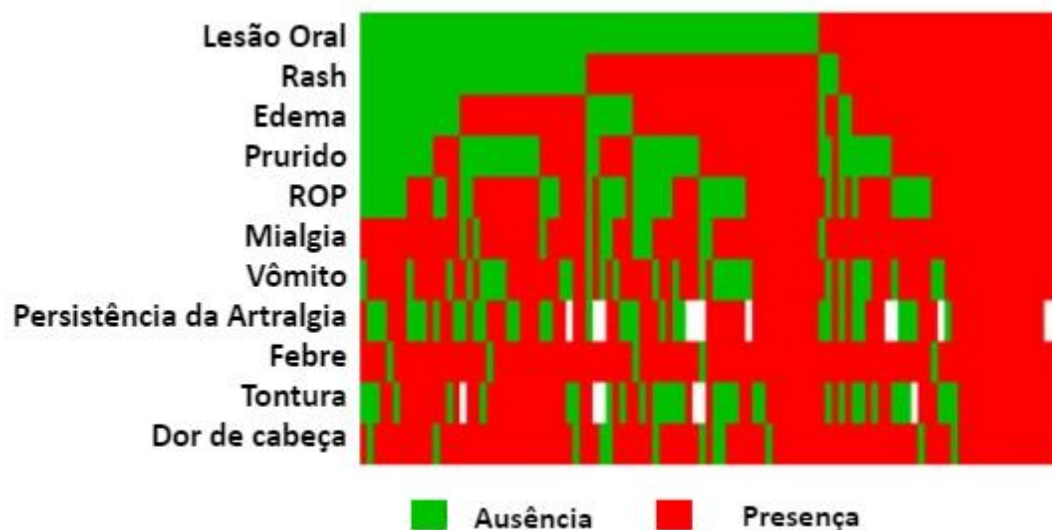


Figura 6. Heatmap com sinais e sintomas de Chikungunya na fase aguda de acordo com a presença (vermelho) ou ausência (verde) de lesão oral dos 105 pacientes avaliados. Aplicou-se teste qui quadrado para avaliar a associação entre as variáveis relacionadas aos sintomas sistêmicos com a variável lesão oral. Rash, edema, prurido, dor retroocular e mialgia apresentaram significância estatística em relação à presença de lesão oral ($p < 0,05$). Rash apresentou valor de $p < 0,01$ e Odds ratio=7,817 em análise de regressão logística.

VI.7. Análise da expressão de citocinas, quimiocinas e RNA viral na saliva dos pacientes, de acordo com a presença da lesão oral

A resposta imune local nos indivíduos com lesão oral foi avaliada através da quantificação de citocinas e quimiocinas nas amostras de saliva (Figura 7).

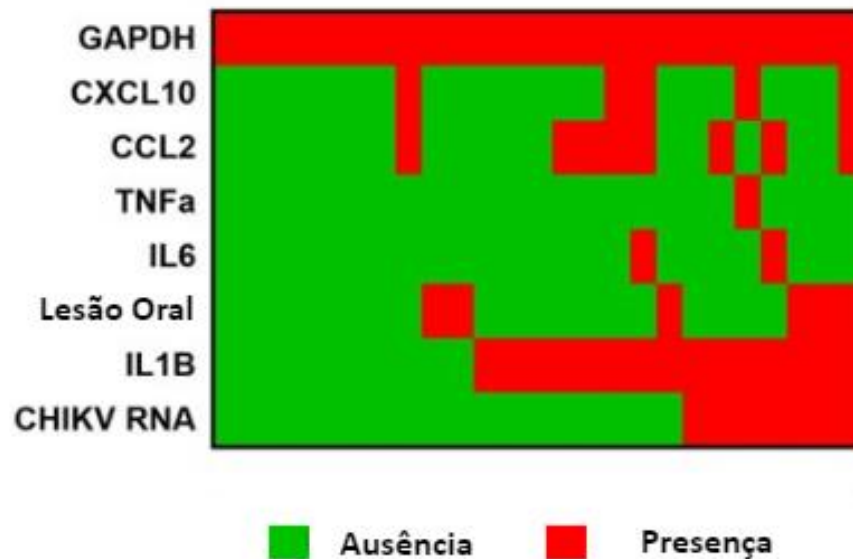


Figura 7. Heatmap da análise da expressão de citocinas, quimiocinas e RNA viral da saliva de pacientes com e sem lesão oral. Em verde destacam-se as ausências e em vermelho as presenças. saliva. Amostras de saliva de 25 pacientes (6 pacientes com lesões orais e 19 sem lesões orais), foram submetidas a RT-qPCR para realização destas detecções. Teste exato de Fischer foi realizado para avaliar a associação estatística entre as citocinas e quimiocinas com lesão orais e RNA viral.

Amostra de saliva de 6 pacientes com lesão oral (todos com lesão ulcerada, localizadas principalmente na língua e na gengiva) foram testadas para avaliar a presença de IL-1 β , IL-6, TNFa, CCL2, CXCL10 e do vírus. Não houve relação entre a presença de lesão oral e de RNA viral. Dos 19 casos sem lesão oral, 21% tinham vírus na saliva, enquanto dos 6 casos com lesão oral, 50% detectaram CHIKV na saliva. Entretanto, observou-se que dos 7 casos positivos para o vírus, 7 apresentaram IL-1 β detectável na saliva ($p < 0,05$). No total de 25 amostras de saliva de pacientes com CHIKD aguda, o vírus foi detectado em 7. Todos os 7 tinham IL-1 β detectável na amostra. As demais citocinas e quimiocinas avaliadas, IL-6, TNFa, CCL2 e CXCL10, não apresentaram associação com a presença de RNA viral ou com a presença das manifestações oral.

VII. DISCUSSÃO

O diagnóstico da CHIKD foi realizado através das técnicas de ELISA e RT-qPCR, em amostras de sangue, saliva e urina. Nos estudos avaliados, os quais abordavam a presença de lesões orais na CHIKD, apesar da avaliação clínica, com critérios de inclusão e exclusão bem estabelecidos, os autores restringiram-se a avaliar amostras de sangue e utilizaram apenas técnicas sorológicas para diagnóstico (SURYAWANSHI et al., 2009; SINGARAJU et al., 2010; KUMAR et al., 2010; KATTI et al., 2011; KUMAR et al., 2017). Diante disso, pode-se observar que o presente estudo utilizou critérios de diagnóstico bem definidos, visando garantir a qualidade da pesquisa e sua reprodutibilidade. No presente estudo, o RNA viral na saliva foi identificado em apenas 13% dos casos de CHIKD, e em 2 casos exclusivamente na saliva, sugerindo que a saliva não foi considerada um meio ideal para a detecção do vírus. Musso et al. (2016) desenvolveram um estudo, o qual observou uma taxa de detecção do CHIKV de 86%, 58% e 8% em amostras de sangue, saliva e urina, respectivamente, após análise de RT-PCR. De acordo com os resultados obtidos, espécimes de saliva podem ser utilizados para a detecção do vírus apenas durante a primeira semana após o aparecimento dos sintomas, com menor sensibilidade em relação ao sangue. Não foi observada relação entre a presença do vírus na saliva e manifestações hemorrágicas no tecido gengival, contudo, o estudo enfatiza que não se pode excluir a hipótese de que a presença do vírus na saliva pode estar relacionada à contaminação da mesma pelo sangue advindo da gengivorragia. O presente estudo está de acordo com os dados apresentados por Musso e colaboradores, pois observamos uma taxa de detecção superior em amostras de soro (96%), em comparação à saliva (23%), na avaliação por RTq-PCR. Do mesmo modo, Gardner et al. (2015) analisaram 13 amostras de saliva de pacientes e notou-se que o mRNA do CHIKV foi detectado na saliva de 77% dos pacientes. Contudo, o sangramento gengival pode ter ocasionado a contaminação da saliva e ampliado a capacidade de detectar o vírus. Adicionalmente, o tamanho da amostra avaliada foi muito

pequena. Diante disso observa-se que a saliva não amplia significativamente a capacidade de detecção do CHIKV, podendo ser utilizada como um meio adicional para a detecção do vírus.

Neste estudo, manifestações orais foram observadas em cerca de um terço dos pacientes na fase aguda da infecção. Estudos prévios sobre lesões orais na CHIKD detectaram frequência de 2,9% a 95% casos. Dentre 354 pacientes indianos diagnosticados clinicamente com CHIKD, cerca de 20% apresentavam manifestações orais (KANNAN et al., 2009). Entretanto, no estudo de Singaraju et al. (2010), dentre os 112 pacientes examinados em hospitais da Índia mais de 90% apresentavam lesões orais. Essa ampla variação na frequência pode ser resultado de diferenças metodológicas e de critérios de seleção (SURYAWANSHI et al., 2009; SINGARAJU et al., 2010; KUMAR et al., 2010; KATTI et al., 2011; KUMAR et al., 2017). A frequência de lesão oral foi mais alta no estudo que avaliou pacientes provenientes de unidades hospitalares, que provavelmente apresentavam um quadro clínico mais exacerbado, enquanto nossa amostra é composta na maioria por indivíduos recrutados através de busca ativa em pequenos povoados. Adicionalmente, enquanto em outros estudos o teste diagnóstico foi realizado por sorologia, nós avaliamos amostras de sangue, urina e saliva para exclusão de outros arbovírus e acrescentamos o PCR para ampliar a capacidade de detecção dos casos de CHIKV, o que torna o diagnóstico mais preciso. Outra possibilidade é que esta discrepância na taxa de detecção de manifestações orais poderia ser atribuída às distintas linhagens circulantes do vírus. Entretanto, essa possibilidade é remota já que a maioria desses estudos com níveis variados de frequência de lesão oral foram realizados na Índia, onde circula o genótipo central/leste africano, o mesmo identificado no nordeste brasileiro (YERGOLKAR et al., 2006; NUNES et al., 2015; CHARLYS DA COSTA et al., 2017).

Observamos uma predileção do gênero feminino para o desenvolvimento de lesão oral (OR 3,2). Em um estudo no Distrito de Calicut, sul da Índia, manifestações cutâneas e na mucosa oral foram encontradas principalmente em mulheres (RIYAZ et al., 2010). Do mesmo modo, outros estudos ressaltaram que as mulheres foram mais afetadas quando comparadas aos

homens (KAUAR et al., 2008; KATTI et al., 2010). Distintamente, há poucos relatos que demonstrem que a proporção de homens com lesões orais e CHIKD seja superior ao de mulheres, como é evidenciado por Suryawanshi et al. (2009), que revelaram maior envolvimento do sexo masculino, com uma proporção de 2.3:1. Diante disso, é possível que fatores relacionados ao gênero influenciem no desenvolvimento de lesões orais na CHIKD. Há evidências que os hormônios sexuais podem modificar a apresentação clínica de doenças infecciosas. Brake & Lambert et al. (2005) demonstraram achados de significância clínica potencial, ao apresentarem evidências que o estrogênio, hormônio sexual feminino, colabora com o início, persistência e progressão maligna do câncer cervical, causada pelo papiloma vírus humano (HPV), em modelo de camundongo. Portanto, esses dados permitem-nos observar que tipo e concentrações de hormônios sexuais podem ter um impacto no desenvolvimento de patologias (GÜLSAH & PETRA et al., 2014).

Observamos que as lesões orais ocorreram precocemente na infecção por CHIKV. Essas manifestações foram observadas em média 5 dias após o início dos sintomas sistêmicos, com duração de 3 dias. Pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que descreve o momento em que essas lesões orais surgiram no curso da CHIKD. Para outras doenças infecciosas febris, como o sarampo, manchas de Koplik e úlceras nos lábios também ocorrem precocemente durante a infecção, precedendo inclusive as alterações cutâneas em 1 a 2 dias (NEVILLE, 2002; KATZ et al., 2003). Segundo Riyaz et al (2010), as lesões mucosas têm duração de 7 a 10 dias, com posterior remissão, sem sequelas. É possível que o acometimento da mucosa oral nessa infecção viral seja reflexo da ação direta dos vírus nesses tecidos. Uma ação direta de vírus causando lesão oral foi demonstrada na infecção por HPV em lesões de hiperplasia, carcinoma, papiloma e displasia (RIBEIRO et al., 2017). Na infecção por *herpes simplex* tipo 1 (HSV-1), o vírus foi implicado no desenvolvimento das lesões, sendo identificado em amostra de swab da mucosa bucal, no lábio inferior e no dorso da língua (DA SILVA et al., 2005; RAMCHANDANI et al, 2016). Desse modo, nos casos de CHIKD, é possível que a

disseminação precoce desse vírus favoreça o aparecimento das lesões em diversos sítios da cavidade oral. Porém, não observamos relação entre a presença do vírus na saliva e o desenvolvimento das lesões orais.

Em adição aos diversos sinais e sintomas sistêmicos que comprometem o estado geral do paciente na fase aguda da CHIKD, a presença de lesão oral causa grande desconforto. Podem ocorrer dores, edema e sangramento gengival pela presença de lesão aftosa, estomatite, úlcera, erupção vesículo bolhosa (SURYAWANSHI et al, 2009; KATTI et al., 2011; SACHDEVA e DUTTA, 2012). Além disso, essas lesões orais foram identificadas em vários sítios da cavidade oral dos pacientes com CHIKD, como na língua e gengiva. Singaraju etl. (2010), observaram lesões orais em lábio, língua e gengiva, entre os 112 pacientes com diagnóstico de CHIKD. Do mesmo modo, durante epidemia de Chikungunya na Índia, Kumar et al. (2010) reportaram a presença de manifestações orais em regiões do palato e assoalho da boca. As alterações na cavidade oral afetam a mastigação e a deglutição (TRANTOS, 2005; KANSKY et al., 2018), o que pode contribuir para a adinamia e fraqueza observados na fase inicial da doença. Assim, a presença de lesão oral contribui para a morbidade da CHIKD na fase aguda.

Os pacientes com lesões orais apresentaram um quadro sistêmico mais intenso, com prurido, mialgia, edema, dor retroocular e manifestações cutâneas. Lesão oral foi aproximadamente 7 vezes mais frequente entre indivíduos com rash maculopapular ($p < 0,01$). Bhat et al. (2011) desenvolveram um estudo cujo objetivo consistia em avaliar as manifestações muco cutâneas da CHIKD. Os autores identificaram o rash maculopapular como a manifestação mais comum, presente em 52% dos pacientes, seguido pela presença de úlceras na cavidade oral e outras regiões em 22,6% dos pacientes, estando ambos presentes simultaneamente em alguns pacientes. Segundo Kumar et al. (2017), a presença de lesões dolorosas orais e genitais, associadas à poliartralgia e alterações cutâneas, sugere CHIKD. Entretanto, não há relatos na literatura que justifiquem essa correlação. Suryawanshi et al. (2009), ao conduzirem um estudo para avaliar o perfil clínico de pacientes com CHIKD, observaram que 10% dos pacientes com

lesões orais, na forma de úlceras e gengivite, apresentavam febre e dores articulares, porém sem avaliação da significação estatística. A presença de todas essas manifestações sistêmicas pode ser consequência da viremia, como observado no estudo de Kelley et al. (2007), no qual examinaram a relação entre sintomas e carga viral inicial na infecção primária pelo HIV. Os autores concluíram que uma infecção primária mais sintomática está associada a uma carga viral inicial mais elevada. Entretanto, não foi possível quantificar a carga viral nesse estudo. Outros trabalhos devem ser realizados para determinar a relação entre os sintomas e a carga viral.

No presente estudo, foi observado que o aspecto clínico de úlceras e vesículas é semelhante ao observado em infecção primária pelo herpes vírus humano. O herpes vírus humano, em especial o herpes tipo 1 (HSV-1), são vírus de DNA que infectam células humanas (SANTOS et al., 2012), ocasionando lesões principalmente em regiões orais, caracterizadas por inúmeras vesículas que se rompem e originam lesões ulceradas, eritematosas e dolorosas (NEVILLE et al, 2004; NEWMAN et al., 2004). Quando ocorrem fatores deflagradores, como imunossupressão, exposição solar, radiação ultravioleta e ansiedade, o vírus pode ser reativado e ocasionar sintomas nos seus portadores (GELLER et al., 2012). Considerando a morbidade da infecção aguda pelo CHIKV, é possível que as lesões observadas nos pacientes sejam secundárias a infecção por *herpes simples*. Entretanto, não realizamos sorologia ou PCR para herpes pra investigar a possibilidade de co- infecção.

Além da possibilidade de um outro vírus causar lesão oral, a resposta imune local pode contribuir para o desenvolvimento das lesões. Analisamos então o papel da resposta imune como precursora das lesões orais. Contudo, foi observada ausência de relação entre as citocinas e quimiocinas avaliadas e o desenvolvimento dessas alterações bucais. Entretanto, uma correlação positiva entre a IL-1 β e o RNA viral foi detectada. Na literatura, não há descrição do perfil imunológico na saliva de pacientes com a CHIKD, porém, nota-se que a IL-1 β apresenta-se com níveis elevados em pacientes infectados pelo CHIKV e consiste de uma

citocina envolvida na imunopatogênese de muitas patologias artríticas, podendo mediar desse modo, o incremento da artralgia de maneira abrupta e persistente na CHIKD (DINARELLO, 1996). A produção de IL-1 β , decorrente da ativação de inflamassomas, como NLRP3, é explicada por alguns autores. Chen et al. (2017) destacam em seu estudo que o aumento da expressão de NLRP3, caspase-1, IL-1 β , por exemplo, ocasionam um pico de sintomas artríticos, além de gerar um curso mais intenso dos sintomas na fase aguda. Além disso, o estudo de Khurshid et al. (2018) reforçam a utilização IL-1 β como biomarcador salivar para diagnóstico precoce de câncer oral pois, esta citocina pode ser detectada em amostras de saliva. Todavia, nos estágios iniciais da doença podem ser observados níveis reduzidos de IL-1 β e, à medida que os pacientes se recuperaram da fase aguda, a expressão desta é aumentada (KELVIN et al., 2011). Estes dados podem sugerir que o surgimento das lesões orais na cavidade oral, nos estágios iniciais da lesão, juntamente com os demais sintomas sistêmicos, são decorrentes da expressão aumentada de IL-1 β , induzida pelo CHIKV. Além disso, são necessários mais estudos para investigar o papel da IL-1 β na CHIKD, diante dos dados contrapostos.

Diante do exposto, podem ser observadas algumas limitações inerentes ao estudo. Não foram realizadas biópsias das lesões, devido ao quadro clínico dos pacientes, com intensa morbidade. A análise das amostras de lesão permitiria avaliar a presença do CHIKV. Adicionalmente, não foi realizado o PCR para avaliar a presença do *herpes simplex*, aspecto que seria importante, diante das características similares entre as lesões de HSV-1 e as lesões na infecção pelo CHIKV. Outro fator limitante refere-se ao tempo de lesão oral, dado que corresponde a apenas 13 pacientes. Esse questionamento foi incluído apenas para os casos atendidos no Ceará, último local avaliado. Também devemos considerar o viés de memória relacionado à presença das manifestações orais anteriores à infecção pelo CHIKV, como o sangramento gengival. Os pacientes foram questionados sobre isso, entretanto, diante da morbidade na fase aguda, é possível que tenham notado a presença das lesões apenas neste momento. Outra limitação refere-se à ausência de dados clínicos sobre o aspecto da lesão oral

em 27 pacientes. Isso ocorreu porque a inclusão do exame oral na rotina de avaliação dos pacientes com arbovirose aguda, ocorreu tardiamente após o início do estudo.

Por fim, conclui-se que a manifestação oral é relativamente comum na fase aguda da infecção por CHIKV, e as lesões localizam-se em sítios variados da cavidade oral, aumentando a morbidade nessa fase da doença. Além disso, observa-se que a presença do CHIKV na saliva está associada a uma resposta pró inflamatória local, através da ativação da IL-1 β .

VIII. CONCLUSÕES

1. Manifestações orais são sintomas frequentes na fase aguda da Chikungunya.
2. As lesões orais estão presentes em distintos sítios orais, aumentando a morbidade durante a fase aguda da infecção pelo vírus.
3. Há uma correlação entre a presença de lesões orais e de rash maculopapular.
4. Há associação entre a presença do vírus na saliva e a ativação local de via de inflamação, mas não há relação com o desenvolvimento de lesão oral.

IX. PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Como perspectivas, nós pretendemos realizar PCR para o *herpes simplex* vírus tipo 1 (HSV-1) nas amostras de saliva, para avaliar se o precursor das lesões é de fato o CHIKV ou pode ser decorrente de uma infecção por HSV-1.

Ampliar os estudos de produção de citocina na saliva, através da inclusão de saliva de controles saudáveis, aumento do número de casos avaliados e estudo da expressão de moléculas da via do inflamassoma na saliva.

Por fim, a partir dos resultados que demonstraram que o vírus na saliva induz uma resposta pró-inflamatória local, pretendemos investigar o papel da IL-1 β no desenvolvimento da lesão oral pelo CHIKV e se a mesma está associada a uma maior severidade dos sintomas sistêmicos.

SUMMARY

Background: Chikungunya is a disease caused by the alphavirus Chikungunya (CHIKV), transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. In addition to fever and arthritis, Chikungunya disease (CHIKD) can lead to the appearance of oral lesions. **Objective:** To characterize the oral lesion in acute CHIKV infection, related to the presence of virus and immune response in saliva. **Methods:** Cross-sectional study with 204 patients enrolled in the municipalities of Campo Formoso, Itabuna, Senhor do Bonfim and Maranguape (Ceará) between March 2016 and June 2017. Patients suspected of acute arbovirus infection underwent clinical evaluation by physician otorhinolaryngologist and odontologist, with a questionnaire containing signs and symptoms of the disease, including data on oral lesions. The diagnosis of CHIKV infection was confirmed by positive PCR in urine, blood and / or saliva samples or the presence of specific serum IgM. In addition, the expression of chemokines and cytokines IL-1 β IL-6, TNF α , CCL2 e CXCL10 in saliva samples was determined by RT-qPCR. The distribution of the variables was tested using the Kolmogorov Smirnov test. The non-parametric tests, with respect to the outcome, were chi-square, Fisher's exact test and Mann Whitney's test **Results:** Of the 228 patients evaluated, 105 were diagnosed exclusively as CHIKD and had disease time of less than 10 days at the time of evaluation. Oral lesions were detected in 36 (34%) cases, being more frequent in women (OR = 3.2). In most patients the lesions were painful (n=23, 72%) causing difficulty in feeding (n=19, 59%). The main sites were tongue (n=14, 44%), gums (n=14, 44%) and lips (n=12, 37.5%) but also found in the jugal mucosa (n=7, 22%). Mucosal lesions presented as rounded ulcers with circumscribed margins and halo-erythematous (n=12, 37.5%) or edematous-erythematous regions in the marginal gingiva (n=2, 3%). Patients with CHIKD who presented with oral lesions showed more frequent systemic symptoms of rash, pruritus, myalgia, edema and retroocular pain ($p < 0.05$). In an analysis of ordinal logistic regression, there was an association between the presence of oral lesion and skin rash (OR = 7.817 $p < 0.05$). CHIKV was detected in the saliva of 13% of the evaluated individuals. There was a positive correlation between the presence of viral RNA and IL-1 β expression in saliva ($p = 0.01$), but there was no association between the presence of the oral lesion and detectable virus in the saliva. **Conclusions:** Oral lesions are frequent in the acute phase of CHIKD, especially in polysymptomatic patients and contribute to the morbidity of the disease. The appearance of the lesion is not related to the presence of the virus or the secretion of inflammatory mediators in the saliva, but the virus in the saliva seems to induce a pro-inflammatory response in the oral cavity.

Keywords: 1. Chikungunya fever; 2. Oral manifestations; 3. Saliva.

REFERÊNCIAS

1. ASSUNÇÃO-MIRANDA, I. et al. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. *BioMed Research International*, p. 1–11, 2013.
2. BANDYOPADHYAY, D. et al. Mucocutaneous manifestations of Chikungunya fever. *Indian J Dermatol*, v. 55, p. 64-7, 2010.
3. BHAT, R.M. et al. Mucocutaneous manifestations of chikungunya Fever: a study from an epidemic in coastal karnataka. *Indian J Dermatol*, v. 56, n. 3, p. 290-4, 2011.
4. BRAKE, T.; & LAMBERT, P.F. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 102, n. 7, p. 2490-5, 2005.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Chikungunya: manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, p. 65: II, 2017a.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. *Boletim epidemiológico*. Brasília, v.48, n,3, 2017b.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. *Boletim epidemiológico*. Brasília, v.49, n,2, 2018.
8. BRITO, Carlos Alexandre Antunes de. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 50, n. 5, p. 585-589, Sept. 2017.
9. CASTRO, Anita Perpetua Carvalho Rocha de, et al. Chikungunya: vision of the pain clinician. *Rev. dor*, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 299-302, 2016.
10. CHARLYS DA COSTA, A. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 23, n. 10, p. 1742–1744, 2017.
11. CHEN, W. et al. Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. *Nature Microbiology*, v. 2, n. 10, p. 1435–1445, 2017.
12. CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Infect. Dis*, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

13. COUDERC, T. et al. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLoS Pathogens*, v. 4, n.2, e29., 2008.
14. CUNHA, R. V. DA, & TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017.
15. DA SILVA, L. et al. Herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity of seropositive patients. *Oral Diseases*, v. 11, n. 1, p. 13–16, 2005.
16. DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, v. 87, p. 2095–2147, 1996.
17. DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n.3, e1446.
18. EDELMAN, R. et al. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *Am J Trop Med Hyg*, v. 62, p. 681–685, 2000.
19. ELSINGA, J. et al. Health-related impact on quality of life and coping strategies for chikungunya: A qualitative study in Curaçao. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 11, n. 10, 2017.
20. ESPOSITO, Danillo Lucas Alves et al. Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based approaches. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba*, v. 50, n. 4, p. 465-469, 2017 .
21. GARDNER, J. et al. Infectious Chikungunya Virus in the Saliva of Mice, Monkeys and Humans. *PLOS ONE*, v. 10, n. 10, e0139481, 2015.
22. GELLER, M.; SUCHMACHER, M. N.; RIBEIRO, M. G., et al. *Herpes Simples: Atualização Clínica, Epidemiológica e Terapêutica*. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v.24, n.4, p.260-266, 2012.
23. GERARDIN, P. et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Reunion Island outbreak by serosurveys: two methods for two critical times of the epidemic. *BMC Infect Dis*, v. 8, p. 99, 2008.
24. GÉRARDIN, P. et al. Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. *BMC Medicine*, v.9, n.1, 2011.
25. GÜLSAH G.; PETRA C.A. Sex, Immunity and Influenza, *The Journal of Infectious Diseases*, v. 209, n. 15, p. 93-99,2014.

26. HALSTEAD, S.B. et al. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *Am J Trop Med Hyg*, v.18, n.6, p. 997–1021, 1969.
27. HER, Z. et al. Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5903–5913, 2010.
28. HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v.15, n. 4, p. 231–40, 2015.
29. HOARAU, Jean-Jacques et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.
30. JOHNSON et al. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. *J Infect Dis*, v. 214, n. 5, p. S471–S474, 2016.
31. KAMPHUIS, E. et al. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. *Blood*, v. 108, n. 10, p. 3253–3261, 2006.
32. KANNAN, M. et al. A study on chikungunya outbreak during 2007 in Kerala, south India. *Indian J Med Res*, v. 129, p 311–315, 2009.
33. KASHYAP, R. S. et al. Diagnosis of Chikungunya Fever in an Indian Population by an Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Protocol Based on an Antigen Detection Assay: a Prospective Cohort Study. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 17, n. 2, p. 291–297, 2009
34. KATTI, R. et al. Impact of chikungunya virus infection on oral health status: An observational study. *Indian J Dent Res*, v. 22, p. 613, 2011.
35. KATZ, J. et al. Gingival and other oral manifestations in measles virus infection. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 30, n. 7, p. 665–668, 2003.
36. KAUR, P. et al. Chikungunya Outbreak, South India, 2006. *Emerg Infect Dis*, v. 14, p. 1623-5, 2008.
37. KELLEY, C. F. et al. The Relation Between Symptoms, Viral Load, and Viral Load Set Point in Primary HIV Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 45, n. 4, p. 445–448, 2007.
38. KELVIN, A. A. et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 8, e1279, 2011.

39. KUMAR, J. C. et al. Oral candidiasis in Chikungunya viral fever: a case report. *Cases J*, v. 3, p. 6, 2010.
40. KUMAR, R. et al. Cutaneous manifestations of chikungunya fever: Observations from an outbreak at a Tertiary Care Hospital in Southeast Rajasthan, India. *Indian Dermatol Online J*, v. 8, p. 336-42, 2017.
41. MANIMUNDA, S.P. et al. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 104, n. 6, p. 392-9, 2010.
42. MARQUES, C. D. L. et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 – Diagnosis and special situations. *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*, v. 57, p. 421–437, 2017;
43. MEAD, P. S. et al. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *New England Journal of Medicine*, v. 378, n. 15, p. 1377–1385, 2018.
44. MOHAN, A. et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of chikungunya fever: Lessons learned from the re-emerging epidemic. *Indian J Dermatol*, v. 55, p. 54-63, 2010.
45. MUSSO, D. et al. Detection of chikungunya virus in saliva and urine. *Virology Journal*, v. 13, n. 1, 2016.
46. MYERS R.M; CAREY, D.E. Concurrent isolation from patient of two arboviruses, Chikungunya and dengue type 2. *Science*, v. 157, n. 3794, p. 1307–8, 1967.
47. NAYAK, T. K. et al. Regulation of viral replication, apoptosis and pro-inflammatory responses by 17-AAG during Chikungunya virus infection in macrophages. *Viruses*, v. 9, p. 3, 2017.
48. NEVILLE, B.W. et al. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 2004; Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
49. NEWMAN, M.G. et al. *FA. Periodontia Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
50. NG, L.F. et al. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLoS One* 2009.
51. NUNES, M.R.T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Med*, v. 13, p. 102, 2015.
52. OPAS. *Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas*. Washington, D. 2011

53. PADMAKUMAR, B. et al. Comparative evaluation of four therapeutic regimes in chikungunya arthritis: a prospective randomized parallel-group study. *Indian J Rheumatol*, v. 4, p. 94-101, 2009.
54. PAKRAN, J. et al. Purpuric macules with vesiculobullous lesions: A novel manifestation of Chikungunya. *Int J Dermatol*, v. 50, p. 61–9, 2011.
55. PARIDA, M. et al. Rapid and real-time assays for detection and quantification of Chikungunya virus. *Future Virology*, v. 3, n. 2, p.179–192, 2008.
56. PETERSEN, L.R.; POWERS, A.M. Chikungunya: epidemiology [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, v.5, 2016.
57. PIALOUX G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis*, v. 7, n.5, p. 319-327, 2007.
58. PIALOUX, G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis*, v. 7, n. 5, p. 319-27, 2007.
59. POWERS, A.M. et al. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clin Microbiol Rev*, v. 31, n. 1, 2017.
60. PRAT, C. M. et al. Evaluation of Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, n. 12, p. 2129–2132, 2014. doi:10.3201/eid2012.141269
61. RAMACHANDRAN, V. et al. Impact of Chikungunya on health related quality of life Chennai, South India. *PLoS One*, v. 7, n. 12, e51519, 2012.
62. RAMCHANDANI, M. et al. Herpes Simplex Virus Type 1 Shedding in Tears and Nasal and Oral Mucosa of Healthy Adults. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 43, n. 12, p. 756–760, 2016.
63. RAMFUL, D. et al. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *Pediatr Infect Dis J*, v. 26, p. 811–5, 2007.
64. RENAULT, P. et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. *Am J Trop Med Hyg*, v. 77, p. 727–31, 2007.
65. RIBEIRO, Mariana Goveia Melo et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral mucosal lesions of patients at the Ambulatory of Oral Diagnosis of the Federal University of Sergipe, Northeastern Brazil. *J. Appl. Oral Sci.*, Bauru , v. 25, n. 1, p. 69-74, Feb. 2017. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572017000100069&lng=en&nrm=iso>. access on 12 Jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-77572016-0313>.

66. RIYAZ, N. et al. Cutaneous manifestations of Chikungunya during a recent epidemic in Calicut, north Kerala, South India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, v. 76, p. 671-76, 2010.
67. ROBINSON, M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v.49, p.28-32, 1955.
68. RODRIGUES, Cintia Damasceno dos Santos. Triagem de genótipos de arbovírus de importância clínico-epidemiológica no Brasil: Dengue 4, Chikungunya e Zika. 2017. 96 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017
69. SANTOS, Manuely Pereira de Moraes et al. Herpesvírus humano: tipos, manifestações orais e tratamento. *Odontol. Clín.-Cient. (Online)*, Recife, v. 11, n. 3, set. 2012.
70. SCHILTE, C. et al. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.
71. SCHWARTZ, O., & ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.
72. SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Coordenadoria de Vigilância em Saúde. Boletim Semanal da Febre de Chikungunya, Célula de Vigilância Epidemiológica, Centro de Informações Estratégicas de Vigilância em Saúde de Fortaleza, 2017.
73. SESAB. Boletim epidemiológico da arboviroses. Bahia, 2017. Boletim epidemiológico. Bahia, n.11, 2017.
74. SESAB. Situação epidemiológica das arboviroses. Bahia, 2016. Boletim epidemiológico. Bahia, n.19, 2016.
75. SIMON, F. et al. Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. *Med Clin North Am*, v. 92, n. 6, p. 1323-1343, 2008.
76. SIMON, F. et al. Société de pathologie infectieuse de langue française. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. *Med Mal Infect*, v. 45, p. 243-63, 2015.
77. SINGARAJU, Gowri Sankar et al. Oral Manifestations Of Chikungunya Fever In Clinically Diagnosed Chikungunya Cases (CDCG)-A Purposive Study. *Annals and Essences of dentistry*, v. 2, p. 25-9, 2010.
78. SISSOKO, D. et al. Post-Epidemic Chikungunya Disease on Reunion Island: Course of Rheumatic Manifestations and Associated Factors over a 15-Month Period. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 3, n. 3, e389, 2009.

79. SURYAWANSHI, S.D. et al. Clinical profile of chikungunya fever in patients in a tertiary care centre in Maharashtra. *Indian J Med Res*, v. 129, p. 438–41, 2009.
80. TENG, T.S. et al. Host response to Chikungunya virus and perspectives for immunebased therapies. *Future Virology*, v. 6, n. 8, p. 975–984, 2011.
81. THARMARAJAH, K. et al. Chikungunya: vaccines and therapeutics [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2017, 6(F1000 Faculty Rev):2114
82. THIBERVILLE, S.D. et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, v. 99, n.3, p. 345–370, 2013.
83. TRIANTOS D. Intra-oral findings and general health conditions among institutionalized and non-institutionalized elderly in Greece. *J Oral Pathol Med*, v. 34, p. 577–82, 2005.
84. WANG, S. M. et al Detection and Quantification of Chikungunya Virus by Real-Time RT-PCR Assay. *Chikungunya Virus*, p. 105–117, 2016.
85. WAUQUIER, N. et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 1, p. 115–123, 2011.
86. 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.
87. WEAVER, S. C. et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Review of Vaccines*, v. 11, n. 9, p. 1087–1101, 2012.
88. WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.
89. WEAVER, S.C.; FORRESTER, N.L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res*, v. 120, p. 32–9, 2015.
90. YERGOLKAR, P. et al. Chikungunya Outbreaks Caused by African Genotype, India. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 10, p. 1580–1583, 2006.

ANEXO 1

Ficha de ZIKA, CHIKV e DENV – AGUDO ≤ 10 DIAS

Nome – _____ Registro F _____

Data de nascimento - ____/____/____ Sexo- () masculino ()feminino

Tel casa – _____ Tel celular 1 _____

Endereço - _____

Agente comunitário- _____

Data do atendimento - ____/____/____

1. Em que data começaram os sintomas? ____/____/____

2. Quais os sintomas:

a. Febre

() sim. () não.

- Se sim, que data começou? ____/____/____

Que data teve pela última vez? ____/____/____

b. Rash cutâneo maculo-papular (manchas vermelhas)

() sim. () não.

Que data começou? ____/____/____

Que data teve pela última vez? ____/____/____

c. Dor nas articulações () sim. () não.

- Se sim, que articulações? () joelho () punho () calcanhar () mãos

() pés () ombros () coluna () DTM (

) outros _____

Que data começou? ____/____/____

Que data teve pela última vez? ____/____/____

Qual a intensidade ? () leve () moderada () severa

- Tem dificuldade de andar ? () sim () não

- Tem dificuldade de escovar os dentes ou pentear o cabelo? () sim () não

d. Edema (inchaço) nas articulações () sim. () não.

- Se sim, que articulações? () m. Superior () m inferior

() outros _____

Que data começou? ____/____/____

Que data teve pela última vez? ____/____/____

e. Coceira no corpo () sim. () não.

- Se sim, que data começou? _____/_____/_____

Que data teve pela última vez? _____/_____/_____

f. Dor por todo o corpo desde início dos sintomas? () sim. () não.

g. Dor de cabeça (Cefaléia) desde início dos sintomas? () sim. () não.

h. Dor atrás dos olhos desde inicio dos sintomas ?() sim. () não.

3. Tem alguém na sua casa que teve sintomas semelhantes há menos de 01 semana? () sim. () não. Se sim, quantos ()

Qual o parentesco? _____

4. Usou que medicamentos para tratar os sintomas? () sim. () não.

-Se sim, qual

(is): _____

5. Tem alguma outra doença/ problema de saúde?

() sim. () não.

Se sim, qual (is)? () DM () HAS () outras

Usa qual(is) medicamento(s)? _____

6. Tem náusea ou vômito? () sim. () não.

7. Tem íngua (adenopatia)?() sim. () não.

Se sim, onde? _____

- Se sim, que data começou? _____/_____/_____

8. Tem Queda de cabelo desde inicio dos sintomas?() sim. () não

9. Tem ou teve falta de apetite? () sim () não

10. Surgiu algum ferimento na boca? () sim. () não.

Se sim:

Que data começou? _____/_____/_____

Que data teve pela última vez? _____/_____/_____

Se sim, onde? () gengiva () língua () lábio () mucosa jugal /vestibular

() palato () outros _____

Tem dor? () sim. () não.

Qual aspecto/queixa : ()dor () Úlcera () Vesícula () hiperemia

()sangramento () inchaço () outros _____

Dificuldade de alimentação? () sim. () não

11. Estado de conservação dentária () sem alterações () fratura de unidade dentária ou prótese, caries, () outros

12. Tinha problemas na boca ou nos dentes antes da doença? () não

() sim. Qual? _____

13.. Perda auditiva?

() sim. () não

Se sim, como caracteriza?

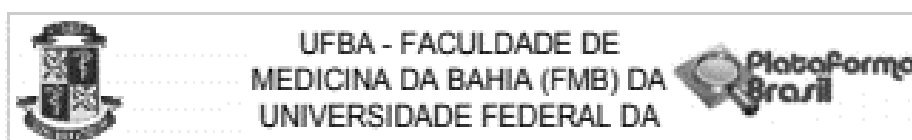
() leve () moderada () intensa ()

Ouvido D () ouvido E ()

Duração em dias ()

Já teve anteriormente esse sintoma e quando? _____

ANEXO 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Assinatura molecular na infecção por ZIKV

Pesquisador: Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56910516.3.0000.5577

Instituição Proponente: FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA

Patrocinador Principal: FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP

DADOS DO PARECER

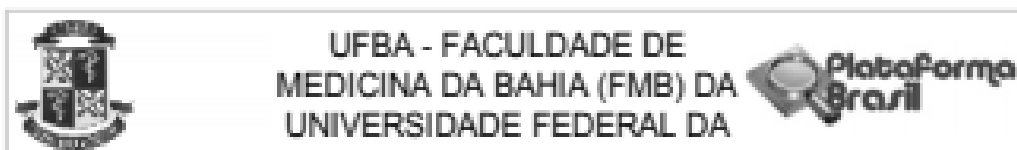
Número do Parecer: 1.657.324

Apresentação do Projeto:

Durante a epidemia de arboviroses no Brasil (ZIKV, DENV, CHIKV), um dos principais problemas é tentar distinguir os três possíveis agentes infecciosos durante a fase aguda de infecção. Na fase inicial não é possível realizar o diagnóstico diferencial considerando apenas os aspectos clínicos. A apresentação clínica clássica da infecção pelo ZIKV inclui febre, rash maculopapular, cefaléia, artralgia, artrite e mialgia. Esses sintomas são facilmente confundidos com os da infecção pelo DENV e CHIKV. Ademais, o ZIKV pertence à mesma família do DENV e do vírus da Febre Amarela, apresentando uma alta similaridade genotípica e fenotípica entre eles, dificultando o desenvolvimento de testes moleculares e imunológicos específicos com baixa reação cruzada entre flavivírus. Há a hipótese que existe uma assinatura biológica capaz de distinguir casos de DENV, CHIKV e ZIKV. Apesar de possuírem formas clínicas aguda muito similares essas três arboviroses apresentam fases crônicas distintas. O vírus CHIKV está fortemente associado à inflamações nas articulações, o vírus Zika está associado a doenças neurológicas e o vírus da dengue está associado a doenças hemorrágicas. Estes desfechos indicam a capacidade de infectar grupos celulares específicos e mecanismos patogênicos diferentes, justificando a investigação de assinaturas moleculares particulares a cada arbovírose.

Trata-se de um estudo de corte transversal observacional onde de 300 participantes com quadro

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO **CEP:** 40.026-010
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 **Fax:** (71)3283-5567 **E-mail:** cepfmb@ufba.br



Continuação do Formos: 1.667.026

agudo de arbovirose admitidos em Unidades de saúde de Campo Formoso, Senhor do Bonfim, Itabuna e Vitória da Conquista e 50 indivíduos participantes saudáveis provenientes dessas regiões sem história de doença exantemática ou febre nos últimos 6 meses serão obtidos dados clínico-epidemiológicos e amostras de urina, sangue e saliva. Serão coletados 18 ml de sangue total em heparina e 3ml em EDTA, amostra de urina e saliva por swab oral. As amostras de sangue serão acondicionadas em gelo seco e armazenadas em freezers a -80C até a extração do RNA. Após a separação em gradiente de ficol, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) serão congeladas em nitrogênio líquido até utilização nos ensaios de microarranjo, citometria de fluxo e nanostring. Aliquotas de plasma serão armazenadas para análise de marcadores sorológicos solúveis. Extração do RNA e PCR em tempo Real - Serão coletadas amostras de plasmas em tubos de EDTA para o diagnóstico molecular na Fiocruz- Bahia.

Objetivo da Pesquisa:

PRIMÁRIO

Caracterizar e prever o valor diagnóstico da assinatura transcriptômica nas células do sangue periférico de pacientes infectados com ZIKV durante a fase aguda de infecção.

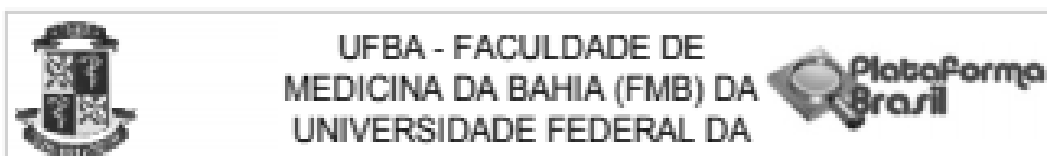
SECUNDÁRIO:

1. Realizar ensaios de microarranjos de células mononucleares de sangue periférico de pacientes infectados com ZIKV, CHIKV ou DENV com diagnóstico clínico e laboratorial;
2. Descrever o perfil fenotípico de células mononucleares de sangue periférico de pacientes infectados com ZIKV, CHIKV ou DENV com diagnóstico clínico e laboratorial;
3. Identificar biomarcadores plasmáticos solúveis de pacientes infectados com ZIKV, CHIKV ou DENV com diagnóstico clínico e laboratorial;
4. Desenvolver um kit de diagnóstico para arboviroses combinando a detecção do material genético viral e de moléculas humanas expressas específicas para cada arbovirose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
 Bairro: PELOURINHO CEP: 40.026-010
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-5584 Fax: (71)3283-5567 E-mail: cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.667.328

"Há possibilidade de quebra de confidencialidade na revisão de prontuários. Para evitar esse risco, a identidade dos indivíduos será preservada através de codificação em banco de dados para identificação de cada sujeito da pesquisa. Adicionalmente, os dados serão manipulados apenas pela equipe de pesquisa, a qual se compromete a utilizá-los exclusivamente para a pesquisa sem divulgar nomes ou quaisquer dados que identifique o participante. Há risco também da formação de pequeno hematoma no local da punção venosa para coleta das amostras de sangue. Para evitar acidentes de punção venosa, o procedimento será realizado por profissionais capacitados e experientes em sua execução."

BENEFÍCIOS

"Os indivíduos não receberão qualquer tipo de benefício para participar do estudo. Os resultados do estudo podem contribuir, entretanto, para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e preventivas para o controle da infecção pelo vírus Zika."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional que tem como objetivo identificar as diferentes assinaturas moleculares e de resposta à agressão viral para as diversas arboviroses prevalentes na Bahia. Bem argumentado. **ÉTICO.**

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: contém justificativa, objetivos, procedimentos, desconfortos e riscos, manutenção do sigilo e da privacidade plena liberdade de recusar-se a participar, benefícios esperados, endereço do cep para dúvidas. **ADEQUADO.**

ORÇAMENTO: R\$ 705.000,00. FINED –ADEQUADO.

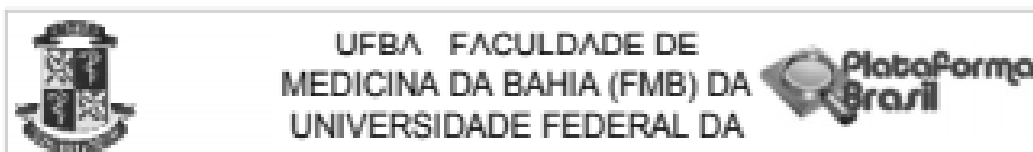
Cronograma: ADEQUADO.

Carta de confidencialidade dos participantes: anexada do assistente Vitor Rigaud. Um projeto desta envergadura parece estar carente de mais colaboradores. ADEQUADA.

Contrapartida da instituição: parcamente anotada. ADEQUADA.

Cartas de anuências: anexadas anuências das instituições (Senhor do Bonfim, Vitória da Conquista,

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n	CEP: 40.026-010
Bairro: PELOURINHO	
UF: BA	Município: SALVADOR
Telefone: (71) 3283-5564	Fax: (71) 3283-5567
	E-mail: cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.667.334

Itabuna e Campo Formoso - ADEQUADAS) que participarão coletando as amostras. A instituição onde os procedimentos de laboratório (FioCruz-Salvador) serão realizados. ADEQUADA.

Recomendações:

O TCLE contém o LOGO da FioCruz, o investigador principal, porém apesar de ser da FioCruz submete e aprova projeto pela Faculdade de Medicina da Bahia, sugere-se adequar.

O TCLE está em 2 páginas: sugere-se que transforme em uma página somente para que fique clara a assinatura do compromisso completo; ou frente e verso.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

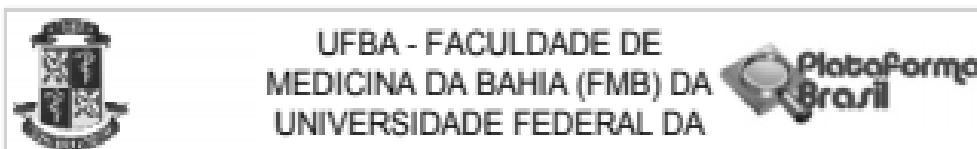
-O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. 466/12 CNS/MS) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

-O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. 466/12 CNS/MS), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata. No cronograma, observar que o início do estudo somente poderá ser realizado após aprovação pelo CEP, conforme compromisso do pesquisador com a resolução 466/12 CNS/MS.

-O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.

-Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
 Bairro: PELOURINHO CEP: 40.026-010
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-5564 Fax: (71)3283-5567 E-mail: cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.667.204

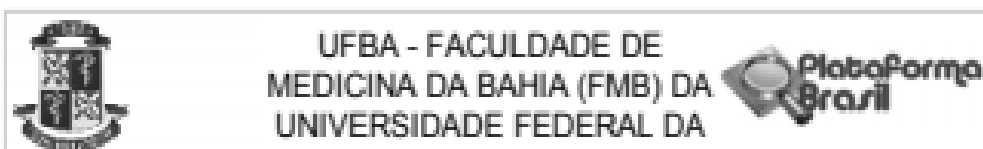
-Relatórios PARCIAIS devem ser apresentados ao CEP SEMESTRALMENTE e FINAL na conclusão do projeto.

-Assegurar aos participantes da pesquisa os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa (466/12 CNS/MS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_707927.pdf	31/07/2016 13:11:47		Aceito
Outros	carta_anuencia_assinado.pdf	31/07/2016 13:04:40	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	termo_confidencialidade_assinado.pdf	31/07/2016 13:03:15	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_zikama_v3.doc	31/07/2016 13:01:59	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_itabuna.pdf	09/06/2016 22:06:25	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_conquista.pdf	09/06/2016 22:05:25	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_campoformoso.pdf	09/06/2016 22:04:48	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_bonfim.pdf	09/06/2016 22:04:11	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	TCUD_zika_assinado.docx	09/06/2016 22:03:02	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ta_zikama.doc	08/06/2016 20:19:21	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_zikama_v2.doc	08/06/2016 19:36:38	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_zikam_ass.pdf	06/05/2016 09:35:16	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado	projeto_zikama.docx	04/05/2016	Victor Nóbrega	Aceito

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
 Bairro: PELOURINHO CEP: 40.026-010
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71) 3283-5564 Fax: (71) 3283-5567 E-mail: capim@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.667.324

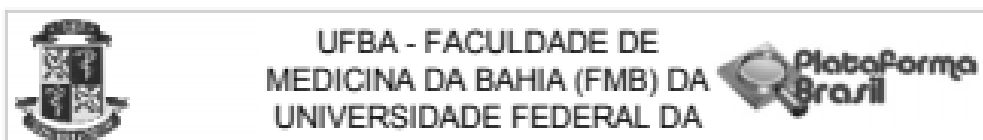
-Relatórios PARCIAIS devem ser apresentados ao CEP SEMESTRALMENTE e FINAL na conclusão do projeto.

-Assegurar aos participantes da pesquisa os benefícios resultantes do projeto, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa (466/12 CNS/MS).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_707927.pdf	31/07/2016 13:11:47		Aceito
Outros	carta_anuenciaassinado.pdf	31/07/2016 13:04:40	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	termo_confidencialidadeassinado.pdf	31/07/2016 13:03:15	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_zikama_v3.doc	31/07/2016 13:01:59	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_itabuna.pdf	09/06/2016 22:06:25	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_conquista.pdf	09/06/2016 22:05:25	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_campoformoso.pdf	09/06/2016 22:04:48	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	anuencia_bonfim.pdf	09/06/2016 22:04:11	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	TCUO_zika_assinado.docx	09/06/2016 22:03:02	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ta_zikama.doc	06/06/2016 20:19:21	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_zikama_v2.doc	06/06/2016 19:36:38	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_zikam_ass.pdf	06/05/2016 09:35:16	Victor Nóbrega Rigaud de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado	projeto_zikama.docx	04/05/2016	Victor Nóbrega	Aceito

Endereço: Largo do Tanque de Jesus, s/n
 Bairro: PELOURINHO CEP: 40.026-010
 UF: BA Município: SALVADOR
 Telefone: (71)3283-5564 Fax: (71)3283-5567 E-mail: cepfmb@ufba.br



Continuação do Parecer: 1.667.324

/ Brochura investidor	projeto_zikama.docx	12:30:09	Rigaud de Oliveira	Aceito
Outros	ficha.pdf	03/05/2016 22:59:26	Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 01 de Agosto de 2016

Assinado por:
Eduardo Martins Netto
(Coordenador)

Endereço: Largo do Terreiro de Jesus, s/n
Bairro: PELOURINHO CEP: 40.026-010
UF: BA Município: SALVADOR
Telefone: (71)3283-5564 Fax: (71)3283-5567 E-mail: cexfmb@ufba.br

ANEXO 3

Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos _____ (nome do paciente), residente à _____, a participar do estudo “Assinatura molecular na infecção por ZIKV; Características e potencial diagnóstico. Investigar a interação do microorganismo-hospedeiro” que é uma pesquisa e que tem por objetivo caracterizar e prever o valor diagnóstico de moléculas presentes no sangue periférico na identificação da infecção por ZIKA vírus durante a fase aguda de infecção. A participação neste estudo é voluntária e não remunerada e não haverá qualquer prejuízo no seu acompanhamento ou tratamento caso não queira participar. Os possíveis riscos ao paciente são aqueles associados ao processo de coleta de sangue, que incluem pequeno hematoma no local da coleta. Você responderá a um questionário com perguntas sobre a sua doença. Está prevista a utilização de uma amostra de urina, saliva e sangue para exame diagnóstico da infecção por Zika, Chikungunya e dengue. Os resultados serão considerados confidenciais e divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a sua identificação individual. Os resultados do presente estudo poderão ajudar a criar um novo método diagnóstico para essas doenças. Caso tenha alguma dúvida, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com a Dr^a Viviane Boaventura através do telefone – (71) 2203-8303 ou 9619-4245, no endereço do Rua Waldemar Falcão, 121, Nazaré, Candeal, Brotas, CEP – 40.296-710, Salvador-Bahia, ou pelo endereço eletrônico: vsboaventura@gmail.com.

Endereço do Comitê de Ética: Largo do Terreiro de Jesus, Pelourinho, CEP – 40.026-010. Salvador- Bahia, ou pelo endereço eletrônico: cepfmb@ufba.br.

Os resultados dos exames realizados para a confirmação diagnóstica serão disponibilizados ao paciente e encaminhados a secretaria de saúde do município.

A sua participação neste estudo é voluntária e você está livre para recusar participar ou se retirar em qualquer época após seu início sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que deverá receber.

Se você leu, entendeu e concorda em participar, assine este termo em duas vias, uma lhe será entregue e a outra ficará com a pesquisadora

Ass. e RG do Voluntário

Ass. e CRM do Médico

Ass: Testemunhas (no caso impressão datiloscópica)

_____, ____ / ____ / ____

Local e data