



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA  
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

**LUCÉLIA BARBOSA DE QUEIRÓZ SILVA**

---

**Investigação da ocorrência do vírus chikungunya em gestantes com  
quadro exantemático em Goiânia-Goiás.**

---

**Goiânia  
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE  
TESES E  
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**      ☒ **Dissertação**      ☐ **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

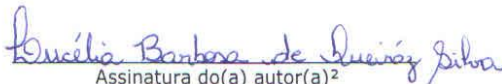
Nome completo do autor: LUCÉLIA BARBOSA DE QUEIRÓZ SILVA

Título do trabalho: INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM GESTANTES COM QUADRO EXANTEMÁTICO EM GOIÂNIA – GOIÁS.

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM      ☒ NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 13 / 11 / 18

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

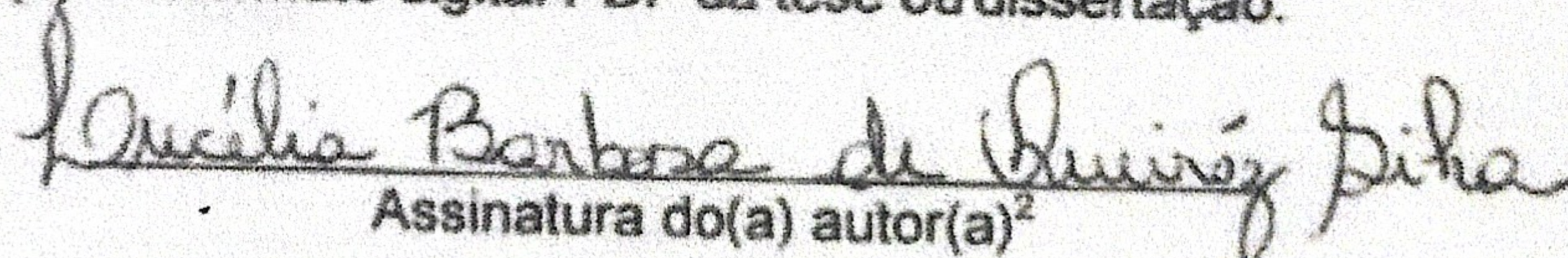
Nome completo do(a) autor(a): Lucélia Barbosa de Queiróz Silva.

Título do trabalho: Investigação da ocorrência do vírus chikungunya em gestantes com quadro exantemático em Goiânia – Goiás.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO<sup>1</sup>

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 05/06/2021

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

**LUCÉLIA BARBOSA DE QUEIRÓZ SILVA**

---

---

**Investigação da ocorrência do vírus chikungunya em gestantes com quadro exantemático em Goiânia-Goiás.**

---

---

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabíola Souza Fiaccadori.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria Christina de Rezende Féres.

**Goiânia  
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Barbosa de Queiróz Silva, Lucélia  
Investigação da ocorrência do vírus chikungunya em gestantes com  
quadro exantemático em Goiânia-Goiás. [manuscrito] / Lucélia  
Barbosa de Queiróz Silva. - 2018.  
xiii, 96 f.

Orientador: Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori; co-orientadora  
Dra. Valéria Christina de Rezende Féres.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto  
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós  
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2018.  
Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de  
figuras, lista de tabelas.

1. vírus chikungunya. 2. gestantes. 3. investigação sorológica. 4.  
investigação molecular. I. Souza Fiaccadori, Fabíola, orient. II. Título.

CDU 578

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO**

**Aluno (a): Lucélia Barbosa de Queiróz Silva.**

**Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabíola Souza Fiaccadori.**

**Coorientador(a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria Christina de Rezende Féres.**

**Membros:**

**1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Souza Fiaccadori**

**2. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro**

**3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Gonçalves da Fonseca**

**Data: 30/10/2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
 INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO  
 Rua 235, s/n – Setor Universitário - Goiânia/GO – CEP: 74.605-050  
 Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 – Fax: (62) 3209.6363 – e-mail: [ppgbrph@gmail.com](mailto:ppgbrph@gmail.com)



**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LUCÉLIA BARBOSA DE QUEIRÓZ SILVA** - Aos trinta dias do mês de outubro do ano de 2018 (30/10/2018), às 9:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. FABIOLA SOUZA FIACCADORI, SIMONE GONÇALVES DA FONSECA e MEGMAR APARECIDA DOS SANTOS CARNEIRO para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM GESTANTES COM QUADRO EXANTEMÁTICO EM GOIÂNIA-GOÍÁS”**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de **LUCÉLIA BARBOSA DE QUEIRÓZ SILVA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. FABIOLA SOUZA FIACCADORI, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori  
 Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca  
 Profa. Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro

**Aprovada / Reprovada**

Aprovada  
Aprovada  
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 20 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.  
 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori (IPTSP/UFG)  
 Profa. Dra. Simone Gonçalves da Fonseca (IPTSP/UFG)  
 Profa. Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro (IPTSP/UFG)  
 Secretário da Pós-Graduação:

**Assinatura**

Fiaccadori  
Simone G. Fonseca  
Megmar  
Secretário

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus, que me presenteou com a oportunidade de estudar nesta instituição, que me fortaleceu nos momentos de extrema fraqueza e que acima de tudo, sempre esteve ao meu lado em todos os segundos da minha vida.

A minha orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Souza Fiaccadori pela ajuda, orientação (de fato me orientou!) e amizade durante esses dois anos e seis meses. Obrigada por fazer parte dessa importante realização acadêmica! Tens minha admiração como pessoa e profissional! E a minha coorientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valéria Christina de Rezende Féres por contribuir de maneira efetiva na conclusão desse trabalho.

Agradeço à minha família que é minha base, pelo companheirismo de todos os momentos. Meus pais Edson e Fátima, obrigada pelo incentivo, meu irmão Luciano pela torcida e por toda ajuda!

Ao meu esposo Marcos e meus filhos Isadora e Marcos Vinícius pela paciência e ajuda quando muitas vezes pensei que não conseguiria e hoje me encontro vencendo uma importante etapa da minha vida.

À minha banca de qualificação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Alves Dias de Matos e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lílían Carla Carneiro por todas as contribuições para melhorar a compreensão desse trabalho.

A prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Menira e nossa técnica Dr<sup>a</sup>. Fernanda por todo carinho, auxílio e por todos bons momentos, conversas e risos (foram muitos!).

Aos colegas do laboratório de Virologia - LABVICC (IPTSP-UFG) por todos os momentos de alegria compartilhados: Amanda, Brunno, Déborah, Gabriela, Izabela, Juliana, Géssyka, João Paulo Silva, João Paulo Gomes, Paulo Henrique, Pedro, Raíssa e Thaynara.

Às amigas Nathânia, Thairiny e Tâmera por toda ajuda compartilhada e pela amizade sincera que levarei por toda vida.

À querida Thais pela amizade, carinho, companheirismo e momentos vividos no mestrado juntas!! Obrigada por ceder parte do seu tempo para me socorrer e por sempre me dizer “Vai dar tudo certo!!”.

Ao programa de pós-graduação Biologia da Relação Parasito-hospedeiro (PPGBRPH) pela oportunidade.

Aos meus colegas do Colégio da Polícia Militar Manoel Vilaverde pelo carinho e por muitas vezes me dizerem a frase: “você vai conseguir”!

Às gestantes que participaram e permitiram a realização desse estudo.

## SUMÁRIO

---

|                                        |             |
|----------------------------------------|-------------|
| <b>FIGURAS</b>                         | <b>IX</b>   |
| <b>QUADROS E TABELAS</b>               | <b>X</b>    |
| <b>ANEXOS</b>                          | <b>X</b>    |
| <b>SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS</b> | <b>XI</b>   |
| <b>RESUMO</b>                          | <b>XIII</b> |
| <b>ABSTRACT</b>                        | <b>XIV</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                    | <b>15</b>   |
| 1.1 Histórico                          | 15          |
| 1.2 Classificação do CHIKV             | 16          |
| 1.3 Partícula viral                    | 18          |
| 1.4 Organização Proteica               | 19          |
| 1.4.1 Proteínas não estruturais        | 19          |
| 1.4.2 Proteínas estruturais            | 21          |
| 1.5 Replicação Viral                   | 23          |
| 1.6 Vetor e ciclo biológico            | 26          |
| 1.7 CHIKV e gestantes                  | 29          |
| 1.8 Patogênese da infecção             | 32          |
| 1.9 Manifestações clínicas             | 33          |
| 1.10 Diagnóstico Laboratorial          | 35          |
| 1.11 Prevenção e Controle              | 36          |
| 1.12 Epidemiologia                     | 38          |
| 1.12.1 Epidemiologia Molecular         | 38          |
| 1.12.2 Distribuição Geográfica         | 39          |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b>                 | <b>45</b>   |
| <b>3 OBJETIVOS</b>                     | <b>46</b>   |
| <b>4 METODOLOGIA</b>                   | <b>47</b>   |
| 4.1 Delineamento e População do Estudo | 47          |
| 4.2 Coleta e processamento de amostras | 48          |
| 4.3 Investigação Sorológica            | 49          |
| 4.4 Investigação Molecular             | 50          |
| 4.4.1 Extração do RNA viral            | 50          |
| 4.4.2 RT-qPCR                          | 50          |

|     |                              |           |
|-----|------------------------------|-----------|
| 4.5 | Avaliação e Análise de dados | 52        |
| 5   | <b>RESULTADOS</b>            | <b>53</b> |
| 6   | <b>DISCUSSÃO</b>             | <b>59</b> |
| 7   | <b>CONCLUSÃO</b>             | <b>64</b> |
|     | <b>REFERÊNCIAS</b>           | <b>65</b> |
|     | <b>ANEXOS</b>                | <b>80</b> |

## LISTA DE FIGURAS

---

|                   |                                                                                                                                                                 |           |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1:</b>  | A) Figura esquemática representativa da partícula do vírus chikungunya. B) Partículas do vírus chikungunya visualizadas por microscopia eletrônica direta (ME). | <b>18</b> |
| <b>Figura 2:</b>  | Esquema da Organização genômica do CHIKV evidenciando as ORF's e as proteínas sintetizadas.                                                                     | <b>19</b> |
| <b>Figura 3:</b>  | Figura esquemática do heterodímero p62 (E2-E3) – E1 mostrando seus respectivos domínios.                                                                        | <b>22</b> |
| <b>Figura 4:</b>  | Ciclo replicativo de CHIKV em células de mamíferos.                                                                                                             | <b>25</b> |
| <b>Figura 5:</b>  | Replicação de CHIKV em células VERO.                                                                                                                            | <b>26</b> |
| <b>Figura 6:</b>  | Vetores de CHIKV. A) Fêmea de <i>A. albopictus</i> na pele de um hospedeiro. B) <i>A. aegypti</i> principal vetor de CHIKV no Brasil.                           | <b>28</b> |
| <b>Figura 7:</b>  | Esquema mostrando o período de incubação extrínseco e intrínseco de CHIKV.                                                                                      | <b>29</b> |
| <b>Figura 8:</b>  | Fluxograma de materiais e métodos                                                                                                                               | <b>51</b> |
| <b>Figura 9:</b>  | Distribuição da data do início dos sintomas (exantema) por trimestre anual.                                                                                     | <b>54</b> |
| <b>Figura 10:</b> | Linha do tempo mostrando os principais eventos do caso 1.                                                                                                       | <b>57</b> |
| <b>Figura 11:</b> | Linha do tempo mostrando os principais eventos do caso 2.                                                                                                       | <b>58</b> |

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

|                  |                                                                                                                                  |           |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Quadro 1:</b> | Relatos de caso de transmissão perinatal de CHIKV.                                                                               | <b>31</b> |
| <b>Quadro 2:</b> | Características gerais dos estudos de identificação e caracterização de CHIKV.                                                   | <b>42</b> |
| <b>Quadro 3:</b> | Oligonucleotídeos e sonda utilizados para a RT-PCR em tempo real.                                                                | <b>51</b> |
| <b>Tabela 1:</b> | Características da população estudada.                                                                                           | <b>53</b> |
| <b>Tabela 2:</b> | Positividade para os marcadores de infecção pelo vírus chikungunya (sorológico e molecular) em relação ao trimestre gestacional. | <b>55</b> |

## LISTA DE ANEXOS

---

|                 |                                                                                           |           |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Anexo 1:</b> | Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa UFG                                                | <b>80</b> |
| <b>Anexo 2:</b> | Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) para gestantes menores de dezoito anos.  | <b>85</b> |
| <b>Anexo 3:</b> | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os responsáveis.                   | <b>89</b> |
| <b>Anexo 4:</b> | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para gestantes maiores de dezoito anos. | <b>93</b> |

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

|        |                                                                                                 |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| °C     | Grau Celsius                                                                                    |
| μL     | Microlitro                                                                                      |
| CDC    | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)   |
| CHIKV  | Vírus chikungunya                                                                               |
| CPV I  | Vacúolos Citopáticos I                                                                          |
| CPV II | Vacúolos Citopáticos II                                                                         |
| DENV   | Vírus dengue                                                                                    |
| DNA    | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)                                        |
| ECSA   | <i>East, Central and South African</i> (Oeste, Central e Sul Africano)                          |
| ELISA  | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i><br>(Ensaio imunoenzimático ligado à enzima)            |
| FAM    | Corante reporter 6-carboxifluoresceína                                                          |
| ICTV   | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia Viral) |
| IFN    | Interferon                                                                                      |
| IgG    | Imunoglobulina de classe G                                                                      |
| IgM    | Imunoglobulina de classe M                                                                      |
| IL     | Interleucina                                                                                    |
| IOL    | <i>Indian Ocean Lineage</i> (Linhagem do Oceano Índico)                                         |
| Kb     | Quilobases                                                                                      |
| MAYV   | Vírus mayaro                                                                                    |
| NSP's  | <i>Non Structural Proteins</i> (Proteínas não estruturais)                                      |
| ONNV   | Vírus o'nyong-nyong                                                                             |

|      |                                                                              |
|------|------------------------------------------------------------------------------|
| ORF  | <i>Open Reading Frame</i> (Região de leitura aberta)                         |
| PAHO | <i>Pan American Health Organization</i> (Organização Pan Americana de saúde) |
| RNA  | <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucleico)                                 |
| RpRd | RNA polimerase RNA dependente                                                |
| RRV  | <i>Ross river virus</i> (vírus rio ross)                                     |
| SFV  | <i>Semliki forest virus</i> (virus floresta semliki)                         |
| SINV | Vírus sindbis                                                                |
| WA   | <i>West African</i> (Oeste africano)                                         |
| WHO  | <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)              |

---

## RESUMO

---

O vírus chikungunya (CHIKV) é um alfavírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* associado a uma infecção caracterizada por febre, mialgia, exantema e artralgia persistente. Em 2014 com a chegada do vírus zika ao Brasil e sua associação com transmissão vertical e consequentes quadros de microcefalia em recém-nascidos, muitos questionamentos foram postulados a respeito da transmissão de outros arbovírus. Neste contexto, diversos estudos apontam para a transmissão perinatal de CHIKV com quadros de encefalites em neonatos. Diante destes fatos, o presente estudo objetivou investigar a ocorrência do CHIKV em gestantes exantemáticas, no município de Goiânia, no período de janeiro de 2017 a julho de 2018. A população de estudo foi constituída por 70 gestantes, das quais foram coletadas amostras de sangue que foram submetidas à pesquisa dos marcadores sorológicos IgM/IgG utilizando kit comercial, bem como a detecção do RNA viral através da RT-qPCR. Foi identificado um índice de soroprevalência para CHIKV de 2,8%. Das gestantes investigadas, foi identificado um caso de positividade para marcador IgG isolado (Caso 1) e outro apresentou positividade combinada (IgM-IgG-RNA) (Caso 2), sendo descrito em ambos o quadro sintomático no primeiro trimestre gestacional. Nestes casos, os recém-nascidos foram positivos apenas para o marcador IgG. Este constitui o primeiro estudo a investigar a ocorrência de CHIKV no estado de Goiás, tendo demonstrado uma baixa circulação do CHIKV em nossa região, em especial na população gestante. As informações obtidas reforçam a importância de estudos nesta população, visando melhor conhecimento do perfil desta infecção em gestantes, bem como contribuir na compreensão de aspectos associados a patogenia deste agente.

**Palavras-chave:** vírus chikungunya, gestantes, investigação sorológica, investigação molecular.

## ABSTRACT

---

The chikungunya vírus (CHIKV) is an alphavirus transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes* associated with an infection characterized by fever, myalgia, rash and persistent arthralgia. In 2014 with the arrival of the zika virus in Brazil and its association with vertical transmission and consequent microcephaly in newborns, many questions were postulated regarding the transmission of other arboviruses. In this context, several studies point to the perinatal transmission of CHIKV with encephalitis in neonates. In view of these facts, the present study aimed to investigate the occurrence of chikungunya virus in exanthematic pregnant women, in the city of Goiânia, from January 2017 to July 2018. The study population consisted of 70 pregnant women, from which samples were collected which were subjected to the screening of IgM / IgG serological markers using commercial kit, as well as the detection of viral RNA through RT-qPCR. A CHIKV seroprevalence index of 2.8% was identified. Of the pregnant women investigated, a case of positive IgG marker was identified (Case 1) and another showed positive positivity (IgM-IgG-RNA) (Case 2), being described in both cases the symptomatic picture in the first gestational trimester. In these cases, the newborns were positive only for the IgG marker. This is the first study to investigate the occurrence of CHIKV in the state of Goiás, showing a low circulation of CHIKV in our region, especially in the pregnant population. The information obtained reinforces the importance of studies in this population, in order to better understand the profile of this infection in pregnant women, as well as to contribute to the understanding of aspects associated with the pathogeny of this agent.

**Key words:** Chikungunya virus, pregnant women, serological investigation and molecular investigation.

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Histórico

Em 1779, na cidade de Batavia, atual Jacarta na Indonésia, foi descrita uma epidemia com sintomas de febre alta e artralgia intensa, a qual inicialmente foi associada ao vírus dengue pelo médico David Bylon. Entretanto, investigações posteriores indicaram ter sido este o primeiro surto de infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV) (Ng & Hapuarachchi. 2010, Ali ou Alla & Combe. 2011, Acosta-Reyes et al. 2015).

Posteriormente, em 1820, casos de febre e artralgia foram relatados na África, no Caribe e na Índia. Em 1853 e 1871, em Calcutá (Índia), Miammar e Java (Indonésia), ocorreram epidemias onde 75% da população apresentou sintomas como cefaleia, febre, prostração e dores nos membros. Surto semelhante foi novamente descrito na Índia em 1923 e, até o início do século XX, diferentes surtos isolados foram supostamente associados ao vírus chikungunya (Carey. 1971, Ng & Hapuarachchi. 2010).

Todavia, em 1952 ocorreu o primeiro registro oficial desta nova doença, pelo Dr. Marion C. Robinson, do Hospital Universitário Missão para a África Central, a partir de surto ocorrido em várias aldeias no Planalto Makonde, sul da província de Tanganyika, atual Tanzânia (Lumsden 1955, Robinson, 1955). Nestes pacientes, o principal sintoma clínico observado foi a presença de dores articulares de início súbito e com a característica de longa permanência, impossibilitando a locomoção em muitos portadores. Assim, a doença ficou conhecida com o termo *chikungunya*, que na língua makonde, significa “aquele que se dobra”, “o que se dobra” ou “impedido de caminhar” devido à intensidade da sintomatologia (Robinson. 1955, Voss. 2010, Acosta-Reyes et al. 2015). A ausência de adenopatia assim como de dor retro-orbital ao mover os olhos constituíram dados importantes, auxiliando na distinção destes quadros da infecção pelo vírus dengue (Robinson. 1955, Carey. 1971).

O isolamento do agente ocorreu no Instituto de Virologia de Entebbe, Uganda, em 1953 (Graham. 2016), com amostras provenientes de casos do distrito de Newala, Tanzânia (Ross. 1956). Na Ásia, o vírus foi isolado pela primeira vez em

1960, em Bangkok (Tailândia) (Zeller et al. 2016). Posteriormente, diversas localidades asiáticas sofreram com epidemias de febre chikungunya (Hammon et al. 1960, Ng & Hapuarachchi. 2010).

Entre 1960 e 2007, diversos surtos foram registrados em diferentes países da África e sudeste da Ásia (Schwartz & Albert. 2010). Apesar de possuir registros bem documentados dos casos, acredita-se que o real número de indivíduos infectados pelo CHIKV, particularmente nas epidemias de 2005 a 2007, constitua apenas uma estimativa em função da ausência de vigilância sorológica com confirmação laboratorial da maioria dos indivíduos infectados (Power & Longue. 2007).

Na ilha francesa La Reunión, situada no Oceano Índico, entre março de 2005 a janeiro de 2006, foram notificados 10.750 casos suspeitos da infecção com 2.424 casos confirmados em laboratório. Ligon (2006) considerou esta epidemia de La Reunión como a de maior impacto na região, na qual um em cada 10 habitantes teria sido infectado.

Na Europa, a partir de 2005, casos importados foram confirmados na França, Itália e Espanha os quais foram justificados devido ao aumento do número de turistas e as extensas alterações climáticas (Rezza et al. 2007, Kurcharz & Cebula-Byrska, 2012). Em 2013, um surto de febre chikungunya afetou inúmeras ilhas do Caribe, por ser uma região de intenso turismo, entre elas Saint Martin e Guadalupe. Posteriormente, em 2014, casos autóctones da doença foram relatados em dezesseis localidades caribenhas. Nas Américas, a alta prevalência do mosquito vetor favoreceu a dispersão viral, que ocorreu de maneira intensa e rápida, com casos desde o sul da Flórida (EUA) até o Brasil (Cauchemez et al, 2014).

No Brasil, onde a circulação de diversos outros arbovírus já foi relatada, a introdução de CHIKV em 2014 tornou-se um grande problema de saúde pública, considerando a grande população do vetor e presença de indivíduos susceptíveis, constituindo risco importante para o estabelecimento de epidemias (Souza et al. 2017).

## **1.2 Classificação do CHIKV**

O vírus chikungunya (CHIKV) é um arbovírus (*arthropode borne virus*) classificado na família *Togaviridae*, a qual compreende os gêneros *Rubivirus*, com o

vírus da Rubéola como membro e *Alphavirus*, com cerca de 31 espécies descritas entre elas o CHIKV (ICTV, 2017). Embora estes gêneros compartilhem semelhanças na organização do genoma e características estruturais, possuem estratégias de replicação e montagem viral distintas. O gênero *Alphavirus* possui uma ampla distribuição geográfica com relatos de vírus isolados provenientes de todos continentes, exceto Antártida (Strauss et al. 1994, Powers et al. 2001).

Membros do gênero *Alphavirus* são naturalmente transmitidos a hospedeiros vertebrados susceptíveis através da picada de vetores artrópodes (Strauss et al. 1994, Forrester et al. 2011). Contudo, determinados alfavírus podem parasitar peixes marinhos e elefantes, cuja transmissão não ocorre por vetor (Villoing et al. 2000, Forrester et al. 2011). Incluídos no gênero *Alphavirus*, estão vírus de interesse para saúde humana tais como: *Chikungunya* (CHIKV), *O'nyong-nyong* (ONNV), *Mayaro* (MAYV), *Ross River* (RRV) e *Sindbis* (SINV) reconhecido como protótipo do gênero, entre outros (Powers et al. 2000; ICTV, 2017).

Estes vírus foram classificados em oito complexos antigênicos, com base na avaliação de sítios específicos presentes na proteína C e na glicoproteína E1. Desta forma, um complexo antigênico compreende membros de um sorogrupo estritamente relacionado, com base na similaridade antigênica e/ou genética, proporcionando reatividade cruzada entre os membros por compartilharem sítios antigênicos comuns. O vírus chikungunya pertence ao complexo antigênico do vírus *semliki forest* (SFV) os quais compartilham epítomos similares na glicoproteína E1 (ICTV. 2015, Griffin. 2013).

De acordo com Kucharz & Byrska (2012), os vírus deste gênero podem ainda ser classificados filogeograficamente em dois grupos: *Alphavirus* do Novo Mundo também caracterizados por possuírem tropismo por neurônios, levando os portadores a quadros de encefalite e *Alphavirus* do Velho Mundo que causam predominantemente poliartrites e exantema.

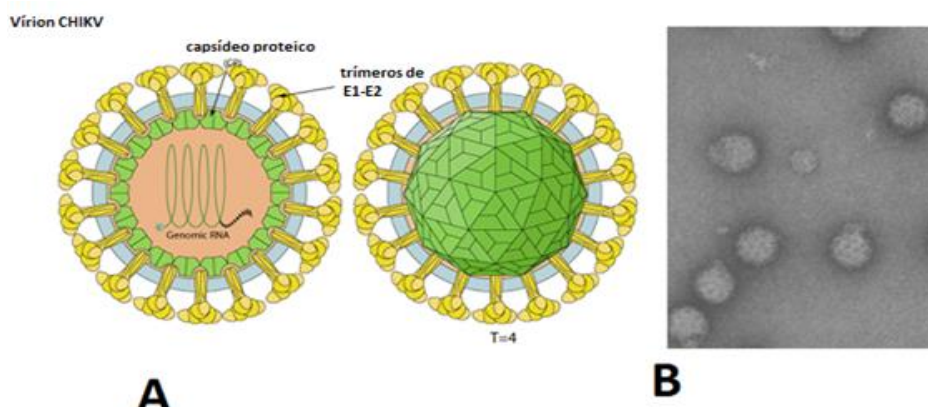
Filogeneticamente, o CHIKV possui três linhagens ou genótipos distintos e bem caracterizados, denominados asiático (*Asian*), africano-ocidental (*West African - WA*) e leste-central-sul africano (*East, Central and South African - ECSA*) (Powers et al. 2000, Chen et al. 2013). Esta classificação tem como base a variabilidade observada em sequências localizadas no gene E que codifica a glicoproteína E1 localizada no envelope. Algumas mutações em específico, presentes nos genótipos

ECSA e asiático, facilitaram sua dispersão rápida atingindo proporções e virulências atípicas (Parola et al. 2006, Volk et al. 2010, Sy et al. 2016).

A linhagem ECSA subdivide-se em uma linhagem denominada Oceano Índico (IOL) (Ng & Hapuarachchi. 2010). A estirpe IOL é caracterizada pela presença de uma substituição de alanina por valina na posição 226 da proteína E1. Tal mutação foi de extrema importância para adaptação do vírus ao vetor *Aedes albopictus* favorecendo sua dispersão ( Ng & Hapuarachchi et al. 2010, Chen et al. 2013). Alguns fatores contribuíram para a dispersão das linhagens epidêmicas de CHIKV, por exemplo, as mutações e transmissão homem-vetor-homem o que tornou a transmissão urbana mais eficiente (Volk et al. 2010, Chen et al. 2016).

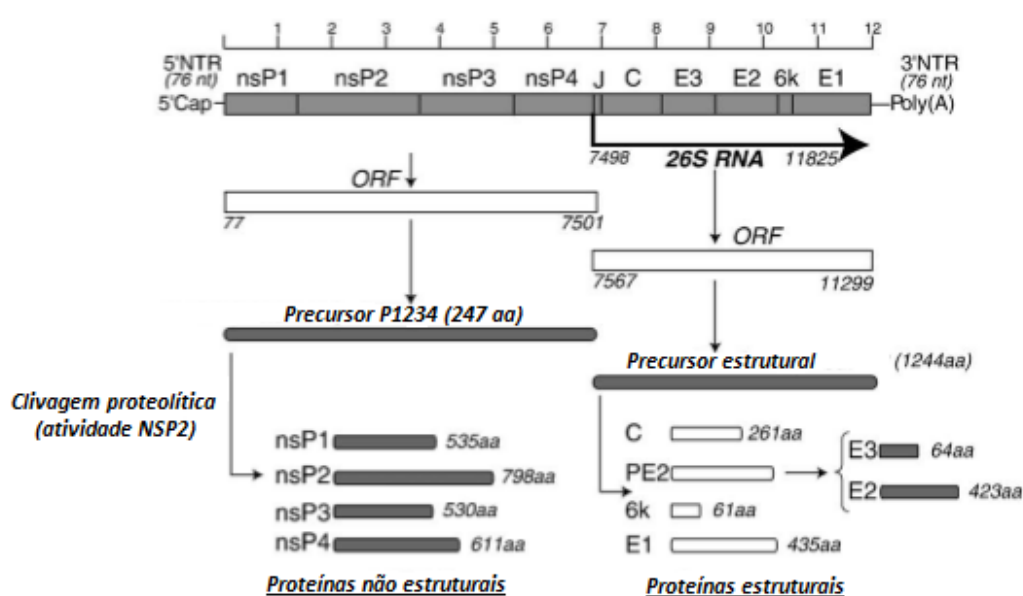
### 1.3 Partícula Viral

A partícula do CHIKV possui aproximadamente de 60 a 70 nanômetros (nm) de diâmetro (Figura 1). Apresenta morfologia esférica com nucleocapsídeo icosaédrico composto por monômeros da proteína C (Kucharz & Cebula-Byrska, 2012). O envelope viral consiste em uma bicamada composta por lipídios derivados da membrana plasmática da célula hospedeira onde encontram-se heterodímeros das glicoproteínas E1 e E2 (Straus et al. 1994). E1 medeia a fusão do envelope viral permitindo a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma e E2 permite o brotamento de vírions na membrana plasmática (Akahata et al. 2010, Voss et al. 2010).



**Figura 1.** A) Figura esquemática representativa da partícula do vírus chikungunya evidenciando os heterodímeros E1 e E2 no envelope lipoproteico (Fonte: Viralzone 2017 - adaptado). B) Partículas do vírus chikungunya visualizadas por microscopia eletrônica direta (ME) (Simizu et al, 1984).

O genoma do CHIKV é composto por uma única molécula de RNA (ssRNA), polaridade positiva, com cerca de 11,8 quilobases (Figura 2). Possui duas regiões de leitura aberta (ORF - *Open Reading Frame*) separadas por uma sequência não codificante curta. A extremidade 5' é “capeada” (5'cap) e codifica proteínas não estruturais (NSP1 a NSP4), enquanto a 3' é poliadenilada, controlada por um RNA subgenômico, e codifica proteínas estruturais (C, E1, E2, 6K, E3) (Forrester et al. 2011). O genoma apresenta-se disposto da seguinte forma: 5'cap-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-(região de junção)-C-E3-E2-6K-E1-poliA 3' (Khan et al. 2002; Solignat et al. 2009).



**Figura 2:** Esquema da organização genômica de CHIKV evidenciando as ORF'S e as proteínas sintetizadas (Solignat et al. 2009 com modificações).

## 1.4 Organização proteica

### 1.4.1 Proteínas não estruturais

As proteínas não estruturais (NSP's) de CHIKV são codificadas por uma ORF com cerca de 7424 nucleotídeos iniciada por um ATG na posição 77/79 a partir do RNA viral e encerrada por uma TAG na posição 7499/7501. O RNA genômico é capeado e traduzido diretamente numa poliproteína não estrutural denominada P1234

a qual sofre um processo de clivagem para produção de P123 e NSP4 que exerce a função de RNA polimerase RNA dependente (Bourai et al. 2012). P1234 codifica um precursor poliproteico de 2474 aminoácidos denominado NSP123 que sintetiza as diferentes NSP's (Solignat et al. 2009).

A NSP1, com 535 aminoácidos, atua como metiltransferase e guanililtransferase envolvida no capeamento do RNA viral de cadeia positiva (RNA+) (Salonem et al. 2003). Este capeamento é vital para a replicação do RNA pois o protege de ser degradado pelas RNAases da célula hospedeira (Feibelman et al. 2016). Também, NSP1 é necessária para a ligação do complexo de replicação viral às membranas citoplasmáticas de células infectadas (Bourai et al. 2012).

Nos alfavírus, NSP2 está associada ao controle do metabolismo de células infectadas, estando presente não apenas nos complexos replicativos mas distribuída no citoplasma e núcleo de tais células, sendo capaz de aumentar o efeito citopático e interromper o crescimento celular (Garmashova et al. 2006). No CHIKV esta proteína de 798 aminoácidos tem função de helicase e protease, desenvolvendo papel importante na clivagem da poliproteína (Solignat et al. 2009).

NSP3 possui 530 aminoácidos e dois domínios distintos, um N-terminal que é conservado entre os alfavírus e um C-terminal que varia em sequência e comprimento nesses vírus (Pehrson et al. 1998, Solignat et al. 2009). Embora sua atividade não seja completamente compreendida, estudos de análise mutacional revelaram que a ação de NSP3 em alfavírus é necessária para a síntese de RNA's: cadeia negativa (RNA-) e subgenômico 26S, atuando como um cofator essencial de NSP4, demonstrando ainda papel relevante na modulação da patogenicidade em camundongos (Jose et al. 2009, Park & Griffin. 2009, Bourai et al. 2012).

Desempenhando a função de RNA polimerase RNA dependente (RpRd), encontra-se a proteína NSP4 com 611 aminoácidos (Solignat et al. 2009). Possui uma região C-terminal homóloga com outras RpRd e uma N-terminal a qual contém uma pequena região onde a estrutura primária não conservada interage com outras NSP's particularmente NSP1, que juntas, atuam no complexo de replicação (Jose et al. 2009; Kumar et al. 2015).

### 1.4.2 Proteínas estruturais

A ORF (região de leitura aberta) que codifica as proteínas estruturais é composta por 3735 nucleotídeos com início na posição 7567 e término na posição 11299. Esta ORF codifica uma poliproteína de 1244 aminoácidos, a qual, por ação de proteases virais, sofre clivagens sucessivas dando origem às proteínas estruturais C, PE2 (E3 e E2), 6K e E1 (Solignat et al. 2009).

O capsídeo é formado por monômeros da proteína C (Kumar et al. 2015). Esta proteína possui 261 aminoácidos e peso molecular de 30 KDa (Solignat et al. 2009). Apresenta uma região N-terminal de função pouco conhecida e uma região C-terminal altamente conservada nos alfavírus com a principal função na formação dos vírions (Perera et al. 2001). A proteína C do capsídeo também se liga especificamente ao RNA genômico viral e acredita-se que esta ligação seja importante para o início da formação do nucleocapsídeo e possivelmente para o estímulo da síntese de RNA (Straus et al. 1994).

A infecção por CHIKV em células susceptíveis é mediada por duas glicoproteínas virais transmembranas, E1 e E2 (Voss et al. 2010). O envelope do vírion é formado pelos heterodímeros E1-E2, em que E2 reconhece e interage com os receptores do hospedeiro e E1 promove a fusão do envelope viral à membrana plasmática (Akahata et al. 2010).

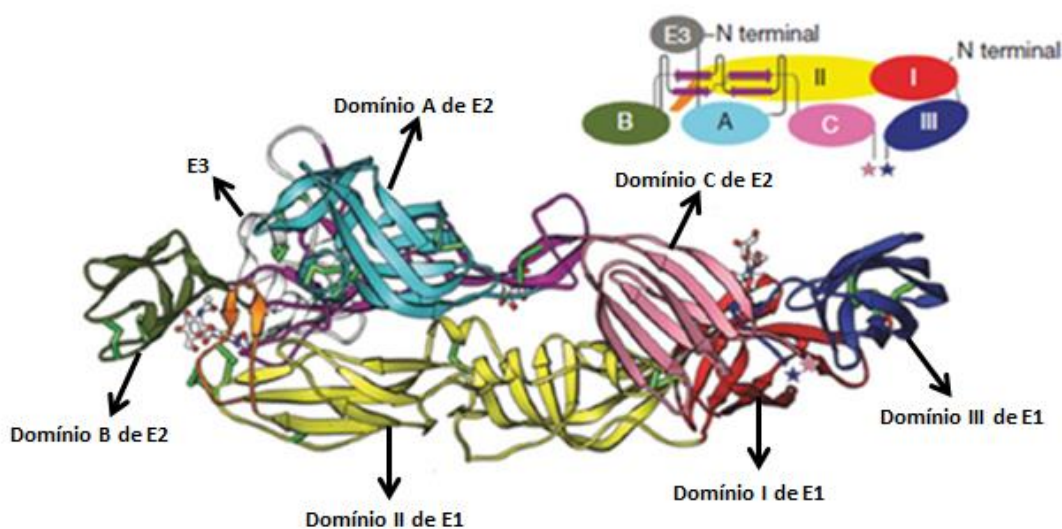
A proteína E1 dos alfavírus contém três  $\beta$ -domínios I, II e III (Jose et al. 2009) (Figura 3). O domínio I contém amina terminal e está espacialmente localizado entre os domínios II e III. A carboxila terminal encontra-se no domínio III e o peptídeo de fusão está na extremidade distal do domínio II sendo este responsável pela interação com E2 na formação de heterodímeros no envelope viral (Jose et al. 2009, Voss et al. 2010).

A glicoproteína E2 é subdividida em três domínios denominados A, B, e C. Os domínios A e B estão relacionados com a ligação do vírus às células-alvo embora o receptor que promova tal ligação ainda seja desconhecido, constituindo assim o principal epítipo antigênico e de neutralização. O domínio C situa-se mais próximo do capsídeo viral, sendo responsável pela montagem do capsídeo durante o processo de brotamento, com pouca interação com o sistema imune do hospedeiro (Weber et al. 2015). E1 e E2 são modificadas translacionalmente no retículo

endoplasmático e no complexo de Golgi antes de serem transportadas para a membrana plasmática da célula hospedeira (Kumar et al. 2015).

E3 de CHIKV consiste em uma proteína com 61 aminoácidos sendo um produto da clivagem da proteína precursora de E2 (pE2 ou p62) (Khan et al. 2002). E3 protege o heterodímero E2-E1 da fusão prematura com a membrana celular, além de ser importante estabilizadora do domínio A ao domínio B da proteína E2 (Li et al, 2010) (Figura 3).

A proteína 6K dos alfavírus é pequena e no ciclo replicativo do vírus não é totalmente compreendida. Contudo, em alguns alfavírus, como por exemplo SFV (*Semilike forest virus*) tal proteína funciona como sinalizadora para a inserção da proteína E1 na membrana do retículo endoplasmático. Tem-se sugerido que a proteína estrutural 6K é uma viroporina. As viroporinas são pequenas (50 a 120 aminoácidos) proteínas de membrana que aumentam a permeabilidade da membrana do envelope em células infectadas, afetam o processamento de glicoproteínas, transporte de proteínas através do RE e o brotamento dos vírions (Melton et al, 2002).



**Figura 3:** Figura esquemática do heterodímero p62(E2-E3)-E1 mostrando seus respectivos domínios. Fonte: Voss et al. 2010 com modificações.

## 1.5 Replicação viral

Ao serem transmitidos aos seus hospedeiros mamíferos os alfavírus geralmente se replicam em uma variedade de células como fibroblastos e miócitos. Os eventos gerais da replicação de CHIKV são comparados e baseados nos relatos observados em outros alfavírus como vírus semliki e sindbis (Sourisseaum et al. 2007; Solignat et al. 2009).

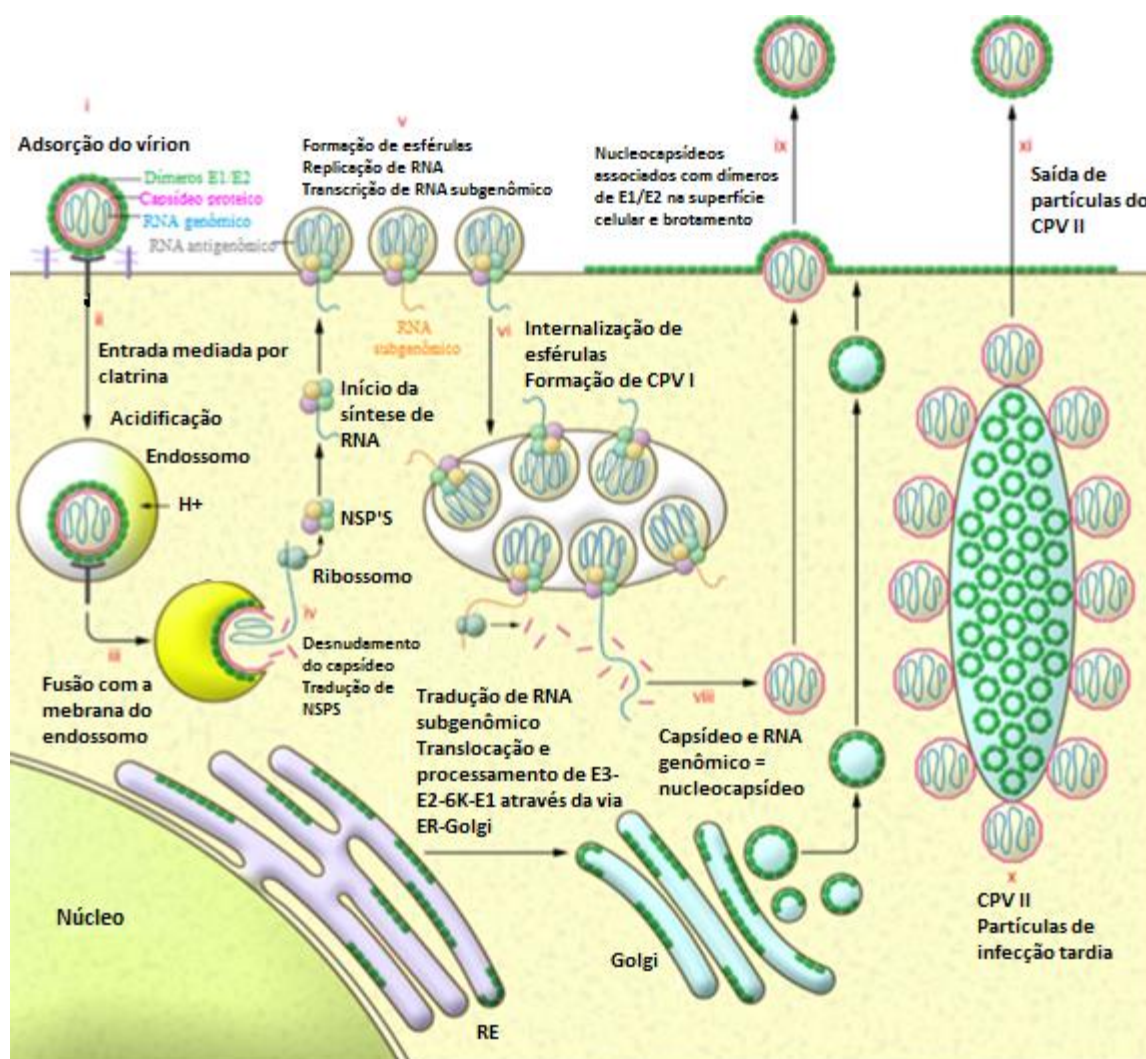
A função das proteínas do envelope nos alfavírus é favorecer a adsorção às células hospedeiras, todavia, para que ocorra tal processo é necessário que receptores de superfície de células susceptíveis sirvam como fatores de ligação (Kuhn. 2013, Silva & Dermody. 2017). Neste sentido, pesquisas mostram que os glicosaminoglicanos são carboidratos complexos presentes na superfície celular e matriz extracelular cuja interação com patógenos constitui a primeira linha de contato com a célula hospedeira ( Van Kooyk & Rabinovich, 2008; Kamhi et al, 2013).

A ligação às células hospedeiras é conduzida pela glicoproteína E2 desencadeando um processo de endocitose mediada por clatrin e dependente de colesterol, levando à internalização das partículas associadas aos receptores (Bernard et al. 2010; Van Dujil-Richter et al. 2015; Silva & Dermody. 2017). A acidificação endossomal provoca alterações conformacionais nas glicoproteínas virais promovendo a dissociação de E1 e consequente ativação da fusão do envelope viral à membrana endossomal, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma celular o qual desnuda-se dando início à replicação (Strauss et al. 1994; Solignat et al. 2009) (Figura 04).

O RNA de CHIKV é traduzido diretamente pelos ribossomos celulares produzindo uma poliproteína denominada P1234 que será clivada por proteases virais e celulares para originar P123 e NSP4. Estas juntamente com proteínas do hospedeiro formam um complexo de replicação viral precoce e de curta duração que sintetiza RNA de cadeia negativa (antigenômico) no interior de compartimentos denominados esférulas que se formam na membrana plasmática (Kujala et al. 2001; Utt et al. 2016). Este RNA antigenômico servirá como molde para a síntese de RNA genômico bem como a transcrição de mRNA subgenômico 26S que codificará poliproteínas estruturais (C-E3-E2-6K-E1) associadas ao retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Spuul et al. 2010) (Figura 4).

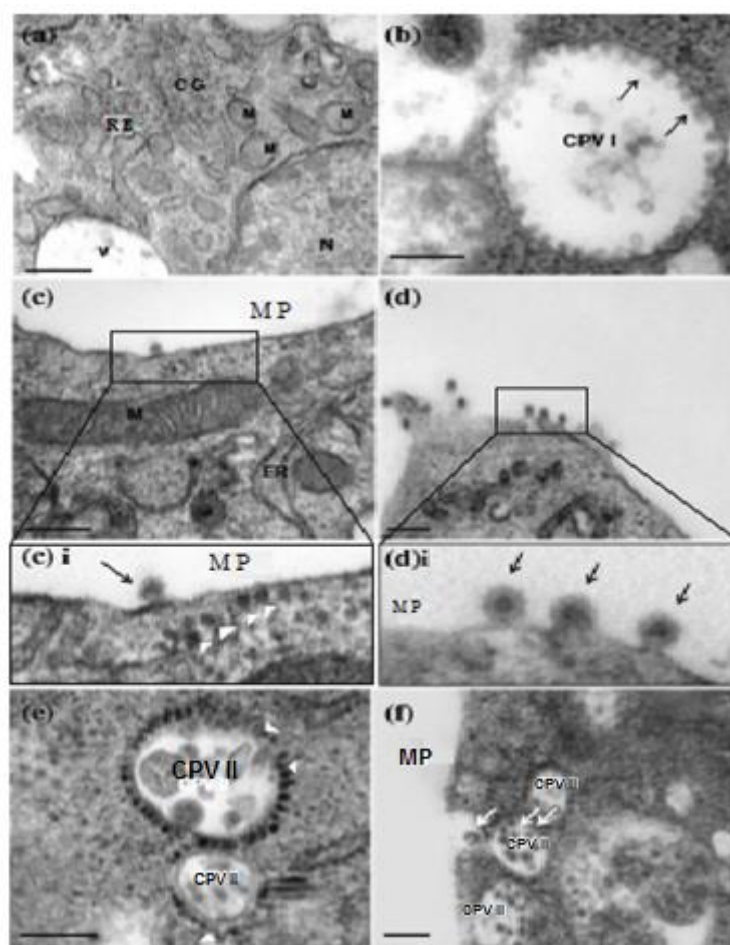
A poliproteína estrutural precursora sofre clivagem por enzimas virais e celulares, a primeira a ser processada e liberada é a proteína C, responsável pela formação do capsídeo. Este processo ocorre no citoplasma celular sendo dependente de sinais de encapsidação e de ligação ao RNA genômico sintetizado. A porção restante da poliproteína é direcionada para o retículo endoplasmático (RE) celular, onde as proteínas sofrem alterações conformacionais, clivagem e formação de heterodímeros. Por sinalização, migram para o complexo de Golgi onde os heterodímeros (E1-E2) serão fosforilados e reorientados para a superfície da membrana celular juntamente com a proteína 6K irão compor o envelope viral (Solignat et al. 2009, Metz et al. 2011).

As nucleocápsides contendo o RNA genômico migram do citoplasma para a membrana plasmática e, por interação com o domínio citoplasmático de E2, induzem o brotamento levando à aquisição do envelope viral contendo as glicoproteínas E1 e E2 (Figura 4). Durante a progressão da infecção os vírions maduros são dispostos em fila na periferia da célula para posterior brotamento (Chen et al. 2013).



**Figura 4:** Representação esquemática do ciclo replicativo de CHIKV em células de mamíferos. Fonte: Silva & Dermody, 2017 (com modificações).

Chen e colaboradores em seus experimentos com células C6/36 observaram a formação inicial de vacúolos citopáticos I (CPV I) os quais correspondem aos complexos de replicação onde ocorre a síntese de RNA viral na infecção precoce (até 10 horas após a infecção). À medida que ocorre o progresso da infecção, os CPV I são substituídos por complexos de vacúolos citopáticos II (CPV II), os quais são menores que os anteriores. Estes CPV II exercem um papel de vesícula de exocitose, mais precisamente um vacúolo para liberação de partículas de CHIKV na infecção tardia, sendo um meio de liberação rápida antes da morte celular (Chen et al. 2013) (Figura 5).



**Figura 5:** Replicação de CHIKV em células vero. A) Alteração no complexo de Golgi e retículo endoplasmático. B) Presença de esférulas e a formação do CPV I. C e D) Brotamento de vírus na infecção precoce. E e F) Análise ultraestrutural de infecção tardia de CHIKV em células vero evidenciando CPV II. Fonte: Chen et al. 2013.

## 1.6 Vetor e ciclo biológico

A expansão do transporte aéreo mundial e o comércio marítimo facilitaram a dispersão de insetos vetores de doenças, permitindo que estes pudessem percorrer grandes distâncias em curtos períodos de tempo. Adaptaram-se ao ambiente doméstico e se estabilizaram em novas áreas, sendo assim, mosquitos do gênero *Aedes* (*Stegomyia*) possuem uma eficácia cada vez mais abrangente na transmissão de arbovírus (Charrel et al. 2007).

O CHIKV é mantido na natureza por meio de dois ciclos de transmissão, o enzoótico (selvagem) e o epidêmico (urbano) (Volk et al. 2010). O ciclo enzoótico,

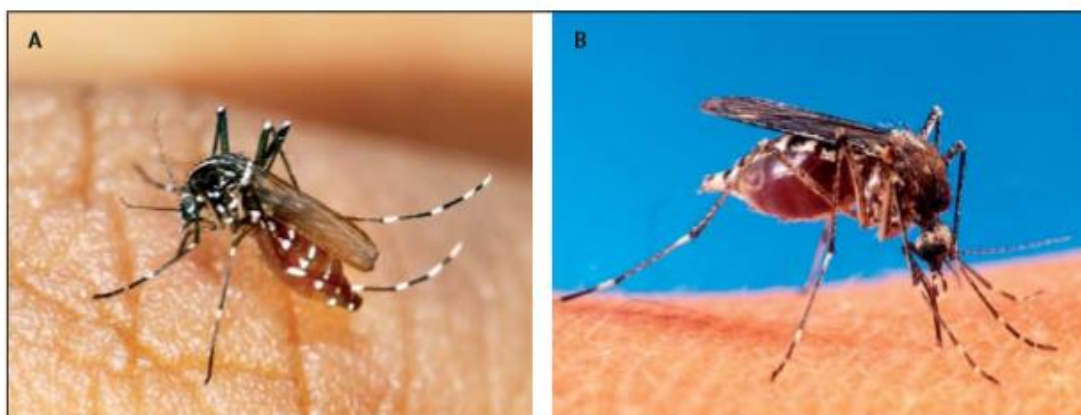
descrito em ambientes de florestas africanas envolve principalmente primatas não-humanos, pequenos mamíferos e espécies do gênero *Aedes* característicos destes ambientes, tais como *Ae. furcifer*, *Ae. taylori* e *Ae. africanus* (Vazeille et al. 2007). No ciclo urbano, melhor caracterizado por surtos no continente asiático, ocorre a transmissão homem-mosquito-homem, onde o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus* constituem os principais vetores associados (Figura 6) (Laras et al. 2005).

*Aedes albopictus* é considerado um importante vetor por se concentrar não somente em regiões tropicais, mas também em regiões temperadas. Tem sido identificado em pelo menos doze países da Europa e parte significativa dos Estados Unidos (Tsetsarkim et al. 2007; Schuwartz & Albert. 2010; Kurcharz & Byrska. 2012). É um transmissor competente para o vírus *chikungunya* pois sua distribuição se expandiu substituindo *Aedes aegypti* em muitas localidades (Vazeille et al. 2007, Schuwartz et al. 2010). Diversos fatores contribuíram para essa efetiva dispersão: capacidade de sobreviver em ambientes rurais e urbanos, tempo de vida relativamente maior comparado ao *Aedes aegypti* (4-8 semanas), possui um raio de voo entre 400 a 600 metros e pode infectar tanto animais como seres humanos (Pialoux et al. 2007; Schuwartz et al. 2010).

Na ilha de La Reunión, Tsetsarkim e colaboradores confirmaram em seus experimentos que a mutação E1-A226V observada no genótipo ECSA resultou num melhor *fitness* do vírus no que diz respeito à infecciosidade no intestino médio e disseminação para as glândulas salivares. Tal mutação foi suficiente para modificar a infectividade viral nesse vetor, não exercendo qualquer efeito sobre a replicação em *A. aegypti* (Tsetsarkim et al. 2007).

*Ae. aegypti* possui hábitos domésticos e peridomésticos tipicamente urbanos e densamente povoados, ocorre na África, Ásia e Américas. No Brasil ocorre em todos os estados, sendo sua eficiente proliferação ligada às condições climáticas favoráveis do país, crescimento urbano mal planejado e pouca colaboração da sociedade no combate aos criadouros (Lourenço-de-Oliveira et al. 2004). Somente as fêmeas são antropófilas, com preferencia por humanos a outras espécies animais e necessitam do sangue para a produção de ovos, intensificando a hematofagia após a fecundação. Três dias após o repasto sanguíneo procuram então um local adequado para ovipor (BRASIL(a), 2017). Os ovos de *Ae. aegypti* resistem a desidratação e temperatura elevada, mantendo-se viáveis por longos períodos, de sete meses a um

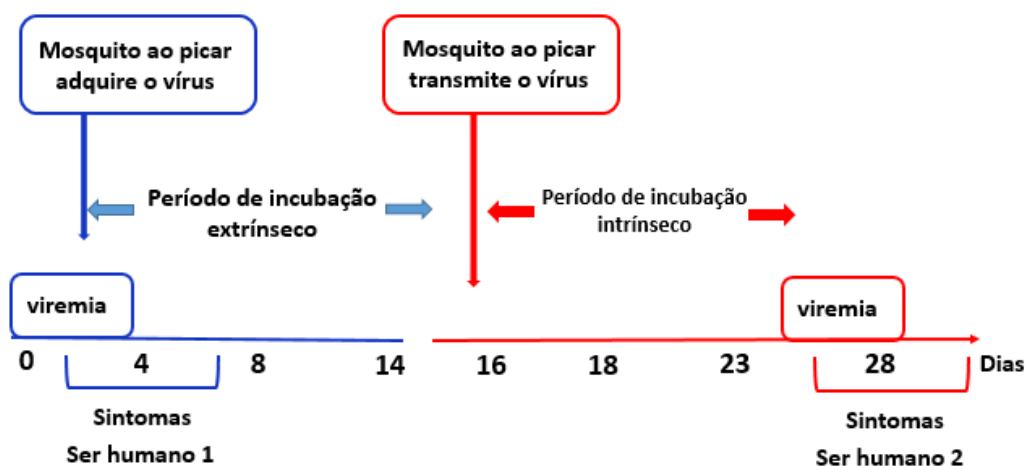
ano. Esta propriedade constitui uma vantagem evolutiva que dificulta notavelmente a erradicação do vetor (Montero. 2015).



**Figura 6:** Vetores de CHIKV. A) Fêmea de *A. albopictus* na pele de um hospedeiro humano. B) *A. aegypti* principal vetor de CHIKV na Ásia. Fonte: Pialoux et al, 2007.

Os habitats das larvas são restritos a depósitos artificiais que contenham água parada em pneus, calhas, recipientes abandonados e lixo acumulado. Após este período transformam-se em mosquitos adultos aptos a picar novos indivíduos susceptíveis (PAHO (b). 2016, BRASIL (a). 2016).

O ciclo caracteriza-se por um período de incubação intrínscico (de um a sete dias) no hospedeiro infectado, quando tem início a fase de viremia, que compreende o primeiro dia de febre até dois a quatro dias de sintomas (Figura 7). Neste momento, denominado período de transmissibilidade, o ciclo de transmissão se inicia e vetores competentes se infectam ao realizarem o repasto sanguíneo adquirindo assim o vírus (Taubitz et al. 2007, Suhrbier et al. 2012).



**Figura 7:** Perfil temporal do ciclo de transmissão do chikv mostrando o período de incubação extrínseco e intrínseco.

No vetor, tem início o período de incubação extrínseco com duração média de dez dias, após o qual, torna-se capaz de transmitir o vírus a um hospedeiro humano susceptível (Suhrbier et al. 2012, BRASIL. 2014) (figura 07). O intestino médio do vetor desempenha um papel importante no ciclo viral pois é o primeiro local de replicação (Janzen et al. 1970, Vazeille et al. 2007). Posteriormente, os vírus alcançam a hemolinfa e finalmente as glândulas salivares para o término da replicação e sua transmissão. Janzen e colaboradores, em seus experimentos, observaram que a replicação ativa de CHIKV não ocasiona alteração patológica visível nas glândulas salivares do vetor (Janzen et al. 1970).

A necessidade de controlar o vetor em ecossistemas tropicais alterados por infraestrutura humana, por meio de ações associadas à vigilância entomológica, educação pública e menor geração de resíduos sólidos constitui um grande desafio para a prevenção das epidemias de CHIKV e outras arboviroses (Charrel et al. 2007).

### 1.7 CHIKV e gestantes

A transmissão materno-fetal de CHIKV foi relatada pela primeira vez durante o grande surto ocorrido de 2005-2006 na Ilha La Reunión, no Oceano Índico (Gerárdin et al, 2008; Torres et al, 2016). Os mecanismos exatos desse tipo de transmissão ainda não foram completamente elucidados, entretanto, relatos disponíveis desse surto sustentam a hipótese de transmissão perinatal. Pesquisas realizadas em La Reunión com gestantes e recém-nascidos mostraram que a

transmissão vertical pode ocorrer durante a gestação, sendo, entretanto relativamente rara (apenas 2,5%), em contraste com casos de transmissão ocorrida no momento do parto em mães virêmicas, com cerca de 50% dos casos. Esse fato é frequentemente observado no momento do parto quando o sangue materno com elevada viremia (carga viral média de 1,5 milhões de cópias/ml de plasma) entra em contato com o feto através do rompimento de vasos da placenta resultantes das contrações uterinas durante o trabalho de parto (Ramful et al. 2007; Gerárdin et al. 2008).

Os recém-nascidos apresentaram sintomas tais como: artralgia, exantema polimorfo rubeliforme e roseliforme, linfopenia, encefalites e problemas cardíacos (Gerardin et al. 2008; Fritel et al. 2010).

Nas áreas onde o vetor *Aedes* está presente os sintomas de CHIKV em gestantes são fortemente confundidos com outras arboviroses como dengue e zika, sendo que em recém-nascidos, a maioria dos sintomas se limitam à febre, exantema e problemas neurológicos, logo torna-se necessário um acompanhamento especializado dada as possíveis e potenciais sequelas neurocognitivas que podem ser adquiridas com essa infecção (Torres et al. 2016; Ramos et al. 2017).

Em 2014 foi relatado o primeiro caso de transmissão vertical do CHIKV no Brasil, na cidade de Salvador – Bahia, onde uma gestante apresentou febre, exantema generalizada e IgM negativa para dengue quatro dias antes do parto. O recém-nascido apresentou sintomas como exantema maculopapular, febre e convulsões (Quadro 1). Foram realizados métodos moleculares de investigação para diferentes patógenos com resultado positivo para CHIKV em saliva, sangue, urina e líquido cefalorraquidiano do recém-nascido e negativo para os demais (Bandeira et al. 2016).

No relato publicado por Oliveira e colaboradores, uma gestante de 28 anos relatou febre, artralgia, cefaleia, dor ventral com prurido quando se encontrava com 34 semanas de gestação (oito meses). Dez dias após o início dos sintomas, a gestante desenvolveu um quadro de pré-eclampsia com evolução grave, sendo internada na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) onde o parto cesariana ocorreu. Após três dias a gestante veio a óbito e o recém-nascido apresentou sintomas ao nascer tais como trombocitopenia e neutrofilia, seguindo internação na UTI com quadro de sepse o qual, também evoluiu para o óbito. Amostras maternas e do recém-nascido apresentaram positividade para IgM anti CHIKV demonstrando um quadro agudo atípico (Oliveira et al. 2018).

**Quadro 1:** Relatos de caso de transmissão perinatal de CHIKV.

| <b>Autor, ano de publicação</b>        | <b>País</b> | <b>Principais sintomas maternos</b>                              | <b>Manifestações clínicas observadas nos recém-nascidos</b>                                                          | <b>Amostra analisada</b>     | <b>Metodologia aplicada</b>      |
|----------------------------------------|-------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| <b>Lyra et al. 2016</b>                | Brasil      | Febre, exantema maculopapular e artralgia                        | Febre, exantema, edema e dificuldade respiratória                                                                    | Sangue e urina               | RT-PCR                           |
| <b>Bandeira et al. 2016</b>            | Brasil      | Febre e exantema generalizada                                    | Febre, exantema e convulsões                                                                                         | Sangue, urina, LCR* e saliva | RT-PCR                           |
| <b>Passi, Khan &amp; Chitnis. 2008</b> | Índia       | Febre e intensa artralgia                                        | Febre e exantema generalizado                                                                                        | Soro                         | RT-PCR                           |
| <b>Alvarado-Socarras. 2016</b>         | Colômbia    | Febre, exantema maculopapular, edema e dor pélvica               | Febre, exantema, irritabilidade, icterícia e trombocitopenia                                                         | Sangue, urina, LCR* e saliva | Sorológico IgM e Elisa           |
| <b>Cordona-Correa et al. 2017</b>      | Chile       | Febre e intensa artralgia                                        | Febre, exantema e icterícia                                                                                          | Sangue e urina               | Sorológico IgM                   |
| <b>Ramos et al. 2018</b>               | Brasil      | Febre, exantema maculopapular generalizada, artralgia e cefaleia | Irritabilidade, insuficiência respiratória, eritema, inchaço de mãos, pés e cérebro, convulsões e problemas na visão | Sangue e LCR*                | Sorológico IgM e Elisa<br>RT-PCR |

\*LCR: Líquido cefalorraquidiano.

## 1.8 Patogênese da infecção

Após entrada no hospedeiro através da picada de um vetor contaminado, CHIKV replica-se no local da inoculação em células epiteliais, endoteliais (fibroblastos primários), condrócitos, monócitos, miócitos e osteoblastos (Sourisseau et al. 2007; Ziegler et al. 2008; Gardner et al. 2010; Her et al. 2010; Labadie et al. 2010).

Apesar de desencadear uma forte resposta imune inata, CHIKV se espalha na corrente sanguínea e linfática por onde pode se disseminar para vários órgãos do corpo e se replicar em suas células tais como: linfonodos e baço, pele, músculos, tendões, fígado e cérebro em casos mais graves (Teng et al. 2012; Silva & Dermody. 2017).

Na infecção por CHIKV há produção de interferon I (IFN) o qual é desencadeada pelos receptores tipo Toll (TLR-*toll like receptors*) que são restritos à membrana plasmática e compartimentos endossomais, e receptores RIG (RLR-*rig like receptors*) típicos do citoplasma. CHIKV é altamente sensível à atividade antiviral do interferon I pois este controla a replicação viral e a patogênese durante a infecção aguda (Sourisseau et al. 2007; Schilte et al. 2010; Schwartz & Albert. 2010; Gardner et al. 2012 apud Silva & Dermody. 2017).

Células infectadas por CHIKV produzem elevados níveis de diferentes interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15) as quais ativam macrófagos, monócitos, células NK e células dendríticas plasmocitoides (Ng et al. 2009; Singh & Unni. 2011).

A febre chikungunya grave tem sido associada a níveis plasmáticos elevados de IL-6 e IL-12, bem como diminuição de quimiocinas RANTES (Wauquier et al. 2010). A IL-7 possui um papel importante no desenvolvimento de artrite reumatoide enquanto a IL-15 tem sido associada ao desenvolvimento de processo inflamatório nas articulações (Ng et al. 2009) uma vez que o efeito citopático produzido por CHIKV nas células infectadas ocasiona dano celular direto e inflamação no local (Sourisseau et al. 2007).

Grande parte da interação molecular entre vírus e hospedeiro continua a ser estudada (Teo et al. 2012) porém relatos comprovam que a imunidade inata tem ação direta sobre fatores associados à replicação viral, sendo responsável pelo rápido declínio da viremia observado durante a fase aguda (Sourisseau et al. 2007, Chow et

al. 2010). Na infecção por CHIKV há uma rápida ativação de células NK, que na artralgia persistente, constitui a segunda população de células mais abundante no modelo *in vivo*, juntamente com células dendríticas, macrófagos sinoviais e fibroblastos sinoviais (Singh & Unni. 2011). Gardner e colaboradores comprovaram em seus experimentos *in vivo* que a depleção de macrófagos em camundongos resultou na redução da doença associada à mialgia e artrite, entretanto prolongou significativamente a viremia (Gardner et al. 2010).

Na fase aguda da doença é observado um quadro de linfopenia grave, sendo provocada não por ação direta de CHIKV nos linfócitos, mas possivelmente pela ação de IFN-I que os induz a morte celular, retornando aos níveis normais após a resolução da infecção (Schwartz & Albert. 2010).

Wauquier e colaboradores em seus experimentos utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex com amostras do surto no Gabão em 2007 observaram que CHIKV provoca inicialmente uma forte resposta imune inata, posteriormente ocorre ativação da imunidade adaptativa através da e proliferação de células TCD8<sup>+</sup> em estágios iniciais da doença, porém há pouca informação sobre esse assunto, uma vez que, o conhecimento da resposta imune adaptativa tanto celular quanto humoral torna-se extremamente importante no desenvolvimento de vacinas (Wauquier et al. 2010; Schwartz & Albert. 2010).

## 1.9 Manifestações clínicas

A febre chikungunya é descrita como uma doença não fatal e auto limitante (Robin et al. 2009; Her et al. 2010) com manifestações clínicas semelhantes a outros alfavírus artritogênicos como o vírus *Ross River* e vírus *Sindbis* (Sissoko et al. 2009). Até a sua descoberta e descrição em 1952 os sintomas típicos da fase aguda eram confundidos com os sintomas presentes na infecção pelo vírus dengue, porém, a duração prolongada das dores articulares, bem como ausência de dor retro orbital, de quadros hemorrágicos e de síndrome do choque foram cruciais para diferenciá-las (Robinson. 1955; Hasebe et al. 2002).

Embora a descrição de casos na forma assintomática, na maioria dos indivíduos infectados a sintomatologia é observada com o quadro aguda, subaguda ou crônica podendo apresentar evolução (BRASIL (c). 2016). Após o período de

incubação que dura de três a sete dias os sintomas clínicos iniciais da fase aguda são caracterizados por: febre com início súbito, dores de cabeça, náuseas e vômitos, exantema maculopapular, mialgia e poliartralgia (Manimunda et al. 2010, BRASIL (c). 2016). A poliartralgia aparece com maior frequência, pode ser incapacitante, e é caracterizada por fadiga, tenossinovite e artralgia persistente que afeta principalmente tornozelos, pulsos e falanges, tais sintomas tendem a desaparecer em duas semanas (Ali ou Alla & Combe. 2011).

No caso de evolução subaguda o quadro se caracteriza pela presença persistente das dores articulares as quais podem durar por até três meses (BRASIL (c). 2016). Sendo mais comum em pacientes adultos do que em crianças e, particularmente, associada a articulações periféricas, porém articulações maiores como joelhos e ombros foram relatados como sendo suscetíveis à artralgia (Ali ou Alla & Combe. 2011; Singh & Unni. 2011).

Em alguns casos denominados de síndrome crônica da febre chikungunya, os sintomas persistem por mais de três meses até anos e podem variar de uma simples inflamação nas articulações até uma verdadeira artrite reumatoide pós viral incapacitante, principalmente em idosos. Em casos raros, o quadro crônico pode levar à destruição das articulações (Blettery et al. 2015).

Adicionalmente, manifestações clínicas atípicas com complicações associadas ao CHIKV foram descritas. Durante o surto na ilha La Reunión foram notificados aproximadamente 254 casos fatais ligados direta ou indiretamente à doença dentre eles estão: insuficiência renal, respiratória e hepática, distúrbios cardiovasculares, complicações neurológicas (encefalite, mielopatia, déficit sensorial, meningite, confusão e neuropatia periférica) e lesões bolhosas graves e extensas na pele de crianças lactentes (Robin et al. 2009; Tournebize & Lagrange. 2009; Chandak et al. 2010). Na Índia, durante o surto de 2008, alguns sintomas atípicos como: úlceras na boca, conjuntivite, diarreia e vertigem foram observados (Manimunda et al. 2010).

Um estudo realizado por Soumahoro e colaboradores em 2442 casos na Ilha La Reunión durante o surto de 2005 e 2006, demonstrou que 15% dos indivíduos apresentavam artralgia persistente 20 meses após infecção (p.i.) e 12% queixavam-se de sintomas residuais de dor e rigidez após três anos (Soumahoro et al. 2009). No estudo de Sissoko e colaboradores, também com pacientes da ilha La Reunión, houve correlação entre idade e manifestações clínicas agudas e crônicas, sendo que

pacientes mais velhos eram mais susceptíveis (média de 64 anos) em relação aos jovens (média de 48 anos) (Sissoko et al. 2009).

### **1.10 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico clínico para CHIKV apresenta dificuldades em função da semelhança da sintomatologia desenvolvida em infecções por outros arbovírus como DENV e ZIKV, tornando o diagnóstico laboratorial determinante (Hasebe et al. 2002).

Segundo a OMS o diagnóstico laboratorial para CHIKV é baseado em três métodos: Isolamento do vírus em cultivo de células, métodos sorológicos e métodos moleculares (WHO. 2017). O isolamento e cultivo de CHIKV em células Vero ou C636 é sensível pois observa-se seu efeito citopático, todavia, inapropriado para diagnóstico de rotina pois demanda tempo na realização e consequentemente na entrega do resultado, sendo mais utilizado para estudos epidemiológicos (Kurcharz & Cebula-Byrska. 2012; Sam et al. 2006 apud Jacobsen et al. 2016).

Os métodos sorológicos são baseados na identificação de anticorpos específicos das classes M (IgM) e/ou G (IgG) no soro do paciente através de ensaios tais como: ensaio imuno-enzimático (ELISA), imunofluorescência indireta e testes de imunocromatografia. Anticorpos IgM específicos para CHIKV são detectáveis de três a oito dias após o início dos sintomas podendo persistir por meses até aproximadamente dois anos. Para a classe G, os anticorpos são detectáveis de seis a dez dias após os sintomas, persistindo por anos e potencialmente ao longo da vida, conferindo imunidade. Em áreas onde ocorrem outros alfavírus como o'nyong-nyong e, no Brasil, o vírus Mayaro (MAYV), testes de soroneutralização tornam-se necessários para um diagnóstico preciso, uma vez que, apresentam elevada reatividade cruzada a estes vírus. (Gerardin et al. 2016, Jacobsen et al. 2016).

Os métodos moleculares apresentam alta especificidade, porém necessitam de profissionais e equipamentos especializados. Durante os cinco primeiros dias após o início dos sintomas, o genoma de CHIKV pode ser detectado em amostras sanguíneas por técnicas como a reação em cadeia pela polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), nested-PCR e quando necessário a quantificação da carga viral utiliza-se a PCR em tempo real (RT-qPCR) (Hasebe et al. 2002; Pfeffer et al. 2002; Laurent et al. 2007; Simon et al. 2008; Bandeira et al. 2016; Pabbaraju et al.

2016). Os produtos de RT-PCR provenientes de amostras clínicas podem ser sequenciados para análise do genótipo do vírus, permitindo assim, a comparação com análises feitas em outras localidades geográficas e sua filogenia sendo que a maioria dos métodos são direcionados para a glicoproteína E1 (WHO. 2017).

No Brasil, o Ministério da Saúde juntamente com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) através da resolução 301/2016, concederam às empresas *Euroimmun* (Alemanha) e Quibasa (Química Básica do Brasil) autorização para produzir e comercializar os testes IgM/IgG Elisa (50 e 100 testes) e Bio Gene chikungunya PCR (48 a 192 testes) respectivamente (BRASIL (d). 2016). A Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), também em 2016, produziu o kit NAT que consiste na detecção do ácido nucleico dos vírus zika, chikungunya e dengue (todos os sorotipos) em um único teste, o que promove uma rapidez no diagnóstico, todavia, está acessível, por enquanto, aos Laboratórios Centrais (LACEN) de 18 estados brasileiros (BRASIL (b). 2016). A meta do Governo é que este kit possa estar disponível em todos os hospitais e postos da rede pública o mais breve possível, sendo um importante teste de detecção rápida de três arboviroses de impacto na saúde pública brasileira.

Segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) o teste Anti-Vírus Chikungunya Elisa IgG e IgM da *Euroimmun*® possui uma elevada especificidade e sensibilidade apresentando uma performance superior a kits de outras empresas, sendo uma importante ferramenta no diagnóstico laboratorial de rotina (CDC. 2015).

### **1.11 Prevenção e controle**

Embora baixos índices de mortalidade sejam descritos para CHIKV, a incapacitação da doença e sua consequente morbidade na população são considerações importantes para a prevenção, controle e desenvolvimento de tratamentos específicos (Silva & Dermody, 2017). Como a transmissão ocorre por mosquitos vetores, as principais medidas de controle e prevenção estão relacionadas àquelas estabelecidas para outras arboviroses como DENV (Programa Nacional de Controle da Dengue – PNCD), e assim, atividades de vigilância entomológica em associação com ações de vigilância virológica e da doença exercem papel

fundamental. Neste contexto, são adotadas abordagens de controle e redução de insetos vetores através da eliminação de objetos que possam acumular água como: pneus, garrafas, bacias, assim como evitar acúmulo de lixo, cobrir caixas d'água e recipientes (PAHO (b). 2016).

Para proteção no período diurno, se faz necessário a utilização de roupas com mangas compridas, calças e repelentes que contenham em sua fórmula DEET (N, N-dietil-3-metilbenzamida) e IR3535 (3-N-acetil-N-butil, éster etílico do ácido aminopropiônico) ou Icardina (ácido 1-piperidinocarboxílico, 2-2-hidroxi-etil-1 metil, propil éster) componentes estes com ação nos quimiorreceptores sensoriais localizados nas antenas dos vetores (WHO. 2017, BRASIL. 2014).

O controle vetorial tradicional possui apenas uma efetividade limitada na contenção de CHIKV, sendo necessário significativamente o desenvolvimento de medidas alternativas, mecanismo para tratamento e vacinas seguras, econômicas e eficazes. As vacinas para prevenir a infecção por CHIKV foram inicialmente produzidas a partir de 1970 com um progresso relativamente lento (Partidos et al. 2011 apud Hussain & Chu. 2011), porém não existe ainda uma vacina licenciada para a prevenção de infecções por este agente (Delang et al. 2014). Recentemente, Erasmus e colaboradores utilizaram o vírus Eilat (EILV), um alfavírus isolado de insetos, como plataforma para uma possível vacina quimérica contra a febre chikungunya. Tal protótipo EILV/CHIKV possui estrutura similar ao CHIKV na sua forma selvagem (*wild type*) com resultados de proteção rápida e efetiva em primatas não humanos porém não testada ainda em humanos (Erasmus et al. 2016).

Candidatas à uma possível vacina estão em desenvolvimento baseadas em VLP's (Graham et al. 2016) tais como E37997 e LR-2006OPY-1 (Akahata et al. 2010), contudo ainda não disponíveis pois deve-se levar em conta que a vacina promova imunidade protetora vitalícia contra os três genótipos de CHIKV (Silva & Dermody. 2017).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença destinam-se a aliviar os sintomas e consiste em analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroides utilizados principalmente na fase crônica para alívio da artrite persistente (Delang et al. 2014; Graham et al. 2016). O Fosfato de cloroquina proporciona alívio a doentes com artralgia crônica, porém os efeitos benéficos da cloroquina no tratamento da infecção por CHIKV ainda é debatido (Delogu & Lamballerie. 2011). O Favipiravir exerce atividade anti-alfavírus de amplo espectro pois é inibidor da

RpRd impedindo a replicação viral, logo fornece ação não somente contra alfavírus mas também a vírus de RNA no geral (Delang et al. 2014).

Compostos tais como ribavirina, 6-azauridina, glicirrina e IFN- $\alpha$  têm sido avaliados pela sua capacidade de inibir a replicação do vírus em cultura de células com potente ação antiviral, uma vez que já são utilizados no tratamento de outras doenças virais como hepatite C (Briolant et al. 2004, Hussain & Chu. 2011). O tratamento com anticorpos monoclonais (MAbs) contra CHIKV constitui uma forma de controle da infecção, cuja eficácia já foi comprovada em camundongos na fase crônica podendo assim, auxiliar como instrumento importante no desenvolvimento de uma vacina eficaz (Smith et al. 2015; Clayton, A. M. 2016).

O Ministério da Saúde destaca a importância do acompanhamento pré-natal para uma gestação saudável, pois com os exames médicos é possível identificar e reduzir muitos problemas de saúde dentre eles as doenças infecciosas que podem ocasionalmente ocorrer na gestante e, em alguns casos, serem transmitidos aos bebês durante o período gestacional ou no momento do parto (Brasil. 2017).

## **1.12 Epidemiologia**

### **1.12.1 Epidemiologia Molecular**

O vírus possui, como já mencionado anteriormente, três genótipos: o africano-ocidental (WA), o leste-central-sul africano (ECSA) e o genótipo asiático (NG & Hapuarachchi. 2010; Presti et al. 2011; Chian et al. 2015). Em seus estudos, NG & Hapuarachchi, descreveram que o surgimento dos vírus CHIKV pandêmicos atuais poderia ter ocorrido entre 1991 e 2004, aproximadamente por volta de 1998, fato apoiado por evidências epidemiológicas durante o período 1996-2000 na África Central (NG & Hapuarachchi. 2010).

As estirpes de CHIKV que causaram grande epidemia do Quênia para a Índia e sudeste Asiático desde 2002, pertencem ao genótipo ECSA (Presti et al. 2011). Tal genótipo despertou a atenção das autoridades de saúde global em um surto no litoral do Quênia em 2004, seguido pela disseminação para as ilhas do Oceano Índico como Comores e La Reunión por possuir uma substituição do aminoácido valina por alanina na posição 226 da proteína E1 (E1-A226V) o que proporcionou uma adaptação do vírus ao vetor *Aedes albopictus* (Presti et al. 2011). Dados publicados por Schuffenecker e colaboradores mostraram a emergência e

predominância desse genótipo (Schuffenecker et al. 2006). Posteriormente, disseminou-se para Índia, sudeste Asiático, Itália e França sendo responsável pela maioria dos casos importados pelo mundo (Chen et al. 2016).

As linhagens da Ásia e ECSA divergiram há aproximadamente 100-150 anos, exatamente quando a linhagem asiática foi introduzida na África (Volk et al. 2010; Chen et al. 2016). Análises recentes indicam que as estirpes do Oceano Índico (IOL) e Indiana formam um grupo monofilético dentro da linhagem ECSA (Volk et al. 2010).

Schuffenecker e colaboradores em seus experimentos baseados em sequências parciais da glicoproteína E1, demonstraram que os isolados do Oceano Índico atuais representam um clado homogêneo dentro de um amplo grupo composto por isolados da estirpe ECSA. Os isolados asiáticos estavam mais afastados dos isolados do Oceano Índico, enquanto os isolados da África Ocidental eram mais divergentes (Schuffenecker et al. 2006).

Em suas pesquisas Laiton-Donato e colaboradores verificaram que amostras colombianas apresentaram uma relação filogenética próxima com estirpes do genótipo Asiático a partir da Ilha de Saint Martin, Ilhas Virgens, México e Brasil (Laiton-Donato et al. 2016). No Brasil, em setembro de 2014, o genótipo Asiático que circulava no Caribe foi confirmado no Amapá. O genótipo ECSA, anteriormente não detectado nas Américas, surgiu no estado da Bahia (Conteville et al. 2016). Análises filogenéticas mostram que os genótipos Asiático e ECSA estão circulando no território brasileiro desde 2014 pelos estados Amapá e Bahia respectivamente (Nunes et al. 2015).

### **1.12.2 Distribuição Geográfica**

Após sua descoberta em 1952, CHIKV era considerado um arbovírus restrito a localidades da África e Ásia (Borgherini et al. 2008). Na África mantém um ciclo endêmico e zoonótico em áreas rurais cujo ecossistema favorável e equilibrado é composto por mosquitos do gênero *Aedes* e primatas não humanos ocasionando pequenos surtos à população que habita nessas regiões (Diallo et al. 1999; Adam et al. 2016). Na Ásia as epidemias ocorrem em áreas urbanas através de um ciclo envolvendo vetores (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) e seres humanos susceptíveis (Pialoux et al. 2007).

Entre os anos de 1960 e 1999 diversos surtos foram documentados na Ásia e Oceania em países como: Birmânia, Tailândia, Índia, Sri Lanka, Camboja, Vietnã, Malásia, Burma, Indonésia, Java, Sumatra, Ilhas Mollusca e Filipinas (Mackenzie et al. 2001; Lee Ligon. 2006; PIALOUX et al. 2007). Na África epidemias de CHIKV já foram descritas em diferentes países como: Uganda em 1958 (Weinbren et al. 1958), República Democrática do Congo em 2000 (Pastorino et al. 2004), Tanzânia em 2007 (Hertz et al. 2012) e Gabão em 2008 (Peyrefitte et al. 2008).

O primeiro surto notável, devido ao número de pessoas infectadas por CHIKV, ocorreu no Quênia em 2004 (Einserik. 2007; Sergon et al. 2008). Em 2005, uma epidemia no Oceano Índico atingiu várias ilhas como: La Reunión (Gerárdin et al. 2008), Seychelles, Maurício e Maldivas (Tomasello & Schlagenhauf. 2013). No mesmo ano CHIKV emergiu em Comores (Sergon et al. 2007).

Embora diversos relatos de febre chikungunya na Índia, nenhum deles descreveu uma epidemia maior quanto ao ano de 2006 onde estima-se que houveram mais de 1,38 milhões de casos, sendo metade na província de Karnataka e um quarto em Maharashtra (Kalantri et al. 2006; Yergolkal et al. 2006; Kelvin. 2011). Apesar de não ter relatos de óbitos nesta ocasião, os dados apontam para uma elevada morbidade com prejuízos na saúde, impacto escolar e na agricultura devido aos sintomas incapacitantes gerados nos indivíduos (Kalantri et al. 2006).

Em países não tropicais a maioria dos casos constitui-se de turistas que passam suas férias em regiões endêmicas, são infectados e que ao retornarem encontram a possibilidade de transmissão através do vetor *Aedes albopictus*. Em 2007 foi relatado o primeiro surto na Itália proveniente de dois imigrantes do Senegal. Na França, em 2010, uma jovem apresentou sintomas posteriores ao seu retorno da Índia, outros dois casos autóctones também foram relatados. O genótipo ECSA foi responsável pela emergência de CHIKV na Europa (Rezza et al. 2007; Grandadam et al. 2011; Tomasello & Schlagenhauf. 2013; Wahid et al. 2017).

A entrada de CHIKV no continente americano se deu pelas Ilhas do Caribe sendo o primeiro relato em dezembro de 2013 na ilha de Saint Martin, posteriormente em 2014 casos autóctones foram registrados na República Dominicana, Martinica, Guadalupe e Haiti (Gallian et al. 2016; PAHO (a). 2017). Surtos de febre chikungunya foram relatados em províncias situadas ao norte da

Colômbia no Mar do Caribe em 2014 com sintomas atípicos semelhantes à população da ilha La Reunión (Villamil-Gomes et al. 2015).

Em 2014 o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) relatou um total de 2811 casos de CHIKV nos Estados Unidos, destes, 12 foram casos autóctones na Flórida e o restante foram casos importados. Em 2015 um total de 896 casos foram registrados sendo um autóctone (Texas) e os demais foram turistas retornando de áreas endêmicas (CDC. 2016). No mesmo ano, em Porto Rico, confirmou-se a transmissão perinatal de CHIKV com um total de dez recém-nascidos provenientes de mães com sintomas da doença, na maioria dos casos (sete bebês) as mães apresentaram os sintomas cinco dias antes do parto. As manifestações clínicas apresentadas em 50% desses recém-nascidos foram: irritabilidade e exantema. Outros sintomas incluíram febre, leucopenia, mal estar e edema periférico, em três bebês houve problemas neurológicos como hidrocefalia e consequente morte cerebral (Rodrigues-Nieves et al. 2016).

A transmissão autóctone de CHIKV no Brasil foi relatada em 2014, na cidade de Oiapoque, estado do Amapá e sua introdução foi atribuída provavelmente ao surto que ocorreu no Caribe em 2013 (Azevedo et al. 2015; Honório et al. 2015). Em 2014 foram confirmados 2.772 casos de CHIKV no Brasil com distribuição em seis estados: Amapá (1554), Bahia (1214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1). (Honório et al. 2015). Segundo o Ministério da Saúde, em 2016 foram registrados no país 271.824 casos prováveis de febre chikungunya, com 196 óbitos confirmados. Em 2018 (até a semana epidemiológica 19), foram registrados 36.831 casos prováveis de CHIKV, sendo 179 destes no estado de Goiás (BRASIL, 2018).

No quadro I, estão relacionados estudos desenvolvidos em diferentes países com índices de positividade para a infecção por CHIKV variando de 15,6% na Itália (Rezza et al. 2007) a 44% na Índia (Shrinet et al. 2012) os quais foram associados ao genótipo ECSA. No Brasil os estudos até o momento descreveram índices de 45% (num total de 80 amostras positivas por sorologia) no estado da Bahia (Cardoso et al. 2017) a 84,28% na população geral do estado do Rio de Janeiro (Souza et al. 2016) (Quadro 2).

**Quadro 2.** Características gerais dos estudos de identificação e caracterização de CHIKV por continentes.

| <b>Ásia</b>                                         |                          |                          |                     |                    |                             |                                                   |                 |
|-----------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Autor, ano de publicação, país</b>               | <b>Total de amostras</b> | <b>Período de estudo</b> | <b>Faixa etária</b> | <b>Metodologia</b> | <b>Região de anelamento</b> | <b>Índice global de detecção</b>                  | <b>Genótipo</b> |
| <b>Lam et al. 2001</b><br><b>Malásia</b>            | 51                       | 1998-1999                | 16 a 59             | IFI                | --                          | 19 (37%)                                          | --              |
| <b>Phommanivong et al. 2016 - Laos</b>              | 40                       | 2013                     | 5 – 65              | RT-PCR             | CHIKF/CHIKR E1              | 10 (25%)                                          | IOL (ECSA)      |
| <b>Jain et al. 2017</b><br><b>Índia</b>             | 572                      | 2010-2013                | 17 – 68             | RT-PCR<br>ELISA    | CHIKF/CHIKR E1              | ELISA= 194<br>(33,91%)<br>RT-PCR= 271<br>(47,37%) | ECSA            |
| <b>África</b>                                       |                          |                          |                     |                    |                             |                                                   |                 |
| <b>Sergon et al. 2007</b><br><b>Ilha de Comores</b> | 331                      | 2005                     | 5-55                | ELISA              | --                          | IgM: 60%<br>IgG: 27%                              | --              |
| <b>Peyrefitte et al. 2008 Gabão</b>                 | 35                       | 2006-2007                | 9-50                | RT-PCR             | CHIKF/CHIKR E1              | 7 (20%)                                           | ECSA            |
| <b>Hertz et al. 2012</b><br><b>Tanzânia</b>         | 700                      | 2007-2008                | 2 meses – 13 anos   | RT-qPCR            | CHIKF/CHIKR E1              | 55 (7,9%)                                         | NR              |
| <b>Fritel et al. 2010</b><br><b>Ilha La Reunión</b> | 1400                     | 2005-2006                | Gestantes           | RT-PCR             | CHIKF/CHIKR E1              | 658 (47%) RT-PCR                                  | NR              |

ND = não disponível; NR = não realizado.

**Quadro 2.** Características gerais dos estudos de identificação e caracterização de CHIKV por continentes (continuação).

| <b>Europa</b>                                     |                          |                          |                     |                    |                                           |                                         |                 |
|---------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------|
| <b>Autor, ano de publicação, país</b>             | <b>Total de amostras</b> | <b>Período de estudo</b> | <b>Faixa etária</b> | <b>Metodologia</b> | <b>Região de anelamento</b>               | <b>Índice global de detecção</b>        | <b>Genótipo</b> |
| <b>Rezza et al. 2007</b><br><b>Itália</b>         | 205                      | 2007                     | ND                  | RT-qPCR            | CHIKF/CHIKR E1                            | 32                                      | ECSA            |
| <b>Sánchez-Seco et al. 2009</b><br><b>Espanha</b> | 308                      | 2006-2007                | ND                  | RT-PCR<br>ELISA    | CHIKF/CHIKR NSP4                          | RT-PCR=5 (1,62%)<br>ELISA=29            | NR              |
| <b>Delisle et al. 2015 - França</b>               | 13                       | 2014                     | 22-80<br>(Media 59) | RT-PCR<br>ELISA    | ND                                        | RT-PCR= 4<br>ELISA= 9                   | ECSA            |
| <b>América</b>                                    |                          |                          |                     |                    |                                           |                                         |                 |
| <b>Mattar et al. 2015 - Colômbia</b>              | 100                      | 2014                     | 6-76                | RT-qPCR<br>ELISA   | NSP1 (M2W e cM3w)<br>E2                   | RT-qPCR= 25<br>(25%)<br>ELISA= 46 (46%) | Asiático        |
| <b>Edwards et al. 2016</b><br><b>Guatemala</b>    | 523                      | 2015                     | 1-60                | RT-PCR             | 874,961,899(FAM§)<br>6856,6981,6919 (FAM) | 328 (63%)                               | NR              |

**Quadro 2.** Características gerais dos estudos de identificação e caracterização de CHIKV por continentes (continuação).

| <b>Autor, ano de publicação, país</b>                            | <b>Total de amostras</b>                  | <b>Período de estudo</b> | <b>Faixa etária</b> | <b>Metodologia</b> | <b>Região de anelamento</b>                | <b>Índice global de detecção</b>                 | <b>Genótipo</b> |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Gallian et al. 2017</b><br><b>Ilhas Guadalupe e Martinica</b> | Guadalupe=<br>6189<br>Martinica=<br>10197 | 2014-2015                | 18-70               | RT-qPCR            | ND                                         | Guadalupe=<br>(0,36%)<br>Martinica=<br>(0,42%)   | NR              |
| <b>Souza et al. 2016</b><br><b>Brasil</b>                        | 91                                        | 2016                     | ND                  | RT-qPCR<br>ELISA   | CHIKF/CHIKR E1                             | ELISA= 34<br>(48.57%)<br>RT-qPCR= 59<br>(84.28%) | ECSA            |
| <b>Cardoso et al. 2017</b><br><b>Brasil</b>                      | 2736                                      | 2014-2016                | ND                  | RT-PCR<br>ELISA    | 874,961,899 (FAM§)<br>6856,6981,6919 (FAM) | ELISA<br>(422/2687) 15%<br>PCR (36/80)<br>45%    | ND              |

ND = não disponível; NR = não realizado.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

Os arbovírus constituem um grupo de vírus que compartilham a característica de serem transmitidos por meio de vetores artrópodes, sendo considerados um importante problema de saúde pública principalmente em países tropicais (Londono-Renteria et al. 2016). Dentre os vírus pertencentes a esse grupo destacam-se: vírus dengue (DENV), vírus da febre amarela (YFV), vírus da febre do Nilo Ocidental (WNV), vírus zika (ZIKV) e vírus chikungunya (CHIKV) (Doughty et al. 2017).

O vírus chikungunya, como os demais arbovírus circulantes no país, possui transmissão associada a vetores da família *Culicidae* do gênero *Aedes*, com relevância maior para as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Ioos et al. 2015; Petersen et al. 2016). Entretanto, para o ZIKV foi confirmada a ocorrência de transmissão vertical com consequentes quadros de microcefalia em recém-nascidos (Miranda Filho et al. 2016). Diante do observado para ZIKV, muitos questionamentos foram postulados a respeito desta via de transmissão para outros arbovírus. Neste sentido, investigações comprovaram a transmissão do CHIKV em recém-nascidos de mães virêmicas no momento do parto e ainda, nestes casos de transmissão perinatal, quadros de encefalites nos recém-nascidos foram descritos, incluindo relatos em estados brasileiros (Ramful et al. 2007; Gerárdin et al. 2008; Bandeira et al. 2016).

Entretanto, estudos que avaliem a ocorrência do CHIKV em gestantes são escassos no país e ainda inexistentes na região Centro-Oeste. Considerando assim, a importante epidemia de febre chikungunya em todo mundo, sua associação à via de transmissão vertical e a existência de uma ampla dispersão de vetor competente em nossa região, torna-se relevante investigar a ocorrência da infecção pelo CHIKV, em especial na população de gestantes. Neste cenário, as informações obtidas auxiliarão na construção de uma melhor compreensão dos fatores associados à patogenia desta infecção.

### 3. OBJETIVOS

---

#### OBJETIVO GERAL

Investigar o perfil sorológico e molecular da infecção pelo vírus chikungunya em gestantes com suspeita clínica (febre e exantema) atendidas na rede pública de saúde do município de Goiânia, Goiás.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar a presença de anticorpos IgM e IgG específicos para o vírus chikungunya na população de gestantes investigada;
- Detectar o RNA do CHIKV em amostras de sangue de população de gestantes com doença exantemática;
- Relacionar a positividade entre os marcadores molecular e sorológicos investigados;
- Descrever características clínicas dos casos de infecção pelo CHIKV identificados na população de gestantes exantemáticas.

## 4. METODOLOGIA

---

### 4.1 Delineamento e População do Estudo

Este trabalho constitui um estudo que faz parte de um projeto maior intitulado “Aspectos epidemiológicos, clínicos, virológicos e imunológicos da infecção pelo Zika vírus em Goiás”. O referido projeto foi delineado como uma coorte de gestantes atendidas pela Rede Pública de Saúde do Município de Goiânia apresentando doença exantemática compatível com infecção pelo ZIKV, e notificadas pelo Sistema de Notificação de Agravos (SINAN-Goiás), seguindo o protocolo de notificação compulsória para gestantes com suspeita clínica de infecção pelo ZIKV.

A notificação compulsória para gestantes com quadro exantemático pelo Sistema de Vigilância vinculado à Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia (SMS) e Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (SES), foi instituída em 2016 em função da necessidade de esclarecimento dos casos por suspeita de Síndrome Congênita do ZIKV.

Para o desenvolvimento do presente estudo foi selecionada uma série de casos de gestantes notificadas pelo SINAN, entre janeiro de 2017 a julho de 2018. Além dos casos notificados, também foram consideradas elegíveis e convidadas para participação no estudo, gestantes com doença exantemática aguda atendidas no Hospital Materno Infantil (HMI) da Secretaria de Estado da Saúde de Goiás, sendo inclusas aquelas das quais tenha sido possível obter dados e amostra clínica. Foram excluídas as gestantes incapazes de dar o consentimento informado ou casos de mulheres que apresentaram condições clínicas/obstétricas que constituíssem algum risco ou impedimento para participação na pesquisa, acompanhamento ou coleta de espécime clínico.

O projeto foi submetido a avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética da UFG (CAAE 64534017.7.0000.5083 – Anexo 1), sendo conduzido seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos definidas pela Resolução 466/12. A apresentação da pesquisa foi feita à gestante por membros da equipe de estudo, incluindo esclarecimento sobre coleta de dados e espécimes clínicos, bem como o protocolo de acompanhamento realizado durante a gestação até o momento do parto. Aceite da gestante foi obtido mediante a assinatura

do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 4) pela própria gestante ou, para aquelas com idade inferior a 18 anos, assinatura de seu responsável legal no TCLE (Anexo 3), bem como da própria gestante no Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE – Anexo 2).

Para a identificação das gestantes potencialmente elegíveis para o estudo foram consideradas duas situações: casos atendidos no setor de pronto-atendimento do HMI e casos registrados pelo SINAN. Na primeira situação, as gestantes foram identificadas no momento de atendimento por apresentação de quadro exantemático suspeito de infecção pelo ZIKV, considerada assim Fase exantemática ou aguda. A outra possibilidade estabelecida, foi a identificação de casos elegíveis prováveis a partir do levantamento dos casos notificados pelo sistema de vigilância. Nestas situações, a abordagem à gestante foi realizada em período posterior à apresentação dos sintomas, por contato telefônico, durante o qual a gestante era convidada para uma consulta com obstetra membro da equipe do projeto. Nesta ocasião, considerada então a Fase tardia da infecção, era realizada a apresentação do projeto e possível recrutamento da mesma como participante do estudo para posterior coleta de amostras.

Para as gestantes inclusas no estudo, foi realizado o encaminhamento para a elaboração do protocolo de acompanhamento por meio do agendamento de consultas, realizadas por médica obstetra membro da equipe do projeto, conforme a solicitação clínica e disponibilidade da gestante. O acompanhamento foi estabelecido desde o momento do recrutamento da gestante, tendo este ocorrido em Fase aguda ou Fase tardia, até o momento do parto. Para cada consulta de acompanhamento, conforme concordância das gestantes participantes, o protocolo estabeleceu a coleta de amostras de sangue.

## **4.2 Coleta e Processamento de Amostras**

Seguido da autorização mediante ao preenchimento do TCLE, foram coletados amostras de sangue das gestantes participantes do estudo. A coleta sanguínea foi realizada por meio de punção venosa, por profissionais qualificados da própria equipe das unidades de saúde, utilizando tubos de coleta com volume de 10mL contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético – EDTA. Todas as amostras foram identificadas, acondicionadas corretamente e encaminhadas para o Laboratório de Virologia e Cultivo Celular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da

Universidade Federal de Goiás (LabViCC/IPTSP/UFG) para o processamento e adequado armazenamento.

As amostras de sangues foram processadas e centrifugadas a 1.500 rpm (rotações por minuto) por dez minutos a 4°C. Logo após a centrifugação, o soro foi alíquotado (2 alíquotas) em criotubos e armazenado em ultrafreezer a -80°C até o momento da realização dos testes sorológicos e moleculares.

Para os casos em que o recrutamento ocorreu por meio do levantamento de notificações no Sistema de Vigilância, desta forma, posterior ao quadro exantemático, as amostras de fase aguda não puderam ser obtidas.

### 4.3 Investigação Sorológica

Todas as amostras de soro coletadas foram submetidas a um ensaio imunoenzimático específico para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-chikv, utilizando um kit comercial, o ensaio Anti-Vírus Chikungunya Elisa IgG e IgM da Euroimmun® (Lübeck, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Brevemente, 100 µL das amostras de soro diluídas a proporção de 1:101 com o tampão de amostra, foram adicionados aos poços revestidos com antígeno CHIKV recombinante (juntamente com o calibrador e os controles positivo e negativo fornecidos pelo kit).

A placa foi incubada por uma hora a 37°C, depois foram realizadas três lavagens com solução de lavagem diluída a 1:9. Posteriormente foram adicionados 100 µL do conjugado marcado com peroxidase (anti-anticorpo IgM/IgG humano) o qual se liga à imonoglobulina de interesse presente na amostra, submetendo-se à uma nova incubação de 30 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação e nova etapa de lavagem, o substrato cromógeno foi adicionado seguindo nova fase de incubação por 15 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de solução de parada (ácido sulfúrico 0,5 M). As densidades ópticas foram medidas a um comprimento de onda de 450nm em espectrofotômetro (KHB® ST360) de modo que os resultados foram expressos com valores de índice, calculados da seguinte forma:

$$Resultado = \frac{Densidade\ óptica\ da\ amostra}{Densidade\ óptica\ do\ calibrador\ (kit)}$$

Conforme orientações do kit, resultados com valores de índice  $< 0,8$  foram considerados negativos, valores de  $0,8$  a  $< 1,1$  foram considerados inconclusivos (borderline) e valores  $\geq 1,1$  foram considerados positivos.

#### **4.4 Investigação Molecular**

##### **4.4.1 Extração do RNA viral**

Em todas as amostras, o RNA viral foi extraído a partir de 140 $\mu$ L da amostra de soro processada, sendo utilizado o kit comercial QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo instruções do fabricante. Brevemente, em um tubo eppendorf de 1,5 ml foram adicionados à amostra, 5,6 $\mu$ L de RNA-carreador e 560 $\mu$ L de Buffer AVL, seguindo homogeneização em vórtex (Vertex QL-901) e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 560 $\mu$ L de etanol 100%, sendo realizada nova homogeneização e rápida centrifugação. Após a centrifugação, todo o conteúdo foi transferido para as mini-colunas, fornecidas pelo kit. Foram realizadas duas lavagens utilizando 500  $\mu$ L de tampões específicos fornecidos pelo kit (AW1 e AW2). Cada lavagem seguiu de uma centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto e 14.000 rpm por 3 minutos respectivamente. Ao final do processo, o material foi eluído em Buffer AVE obtendo um produto de 60 $\mu$ L de RNA extraído. Este produto foi aliquotado e armazenado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  aguardando os procedimentos moleculares (Figura 8).

##### **4.4.2 RT-qPCR**

Para a investigação do RNA viral, todas as amostras extraídas foram submetidas a RT-PCR em tempo real, utilizando iniciadores e sonda descritos por Patel et al. 2017 (Quadro 3) e protocolo adaptado.

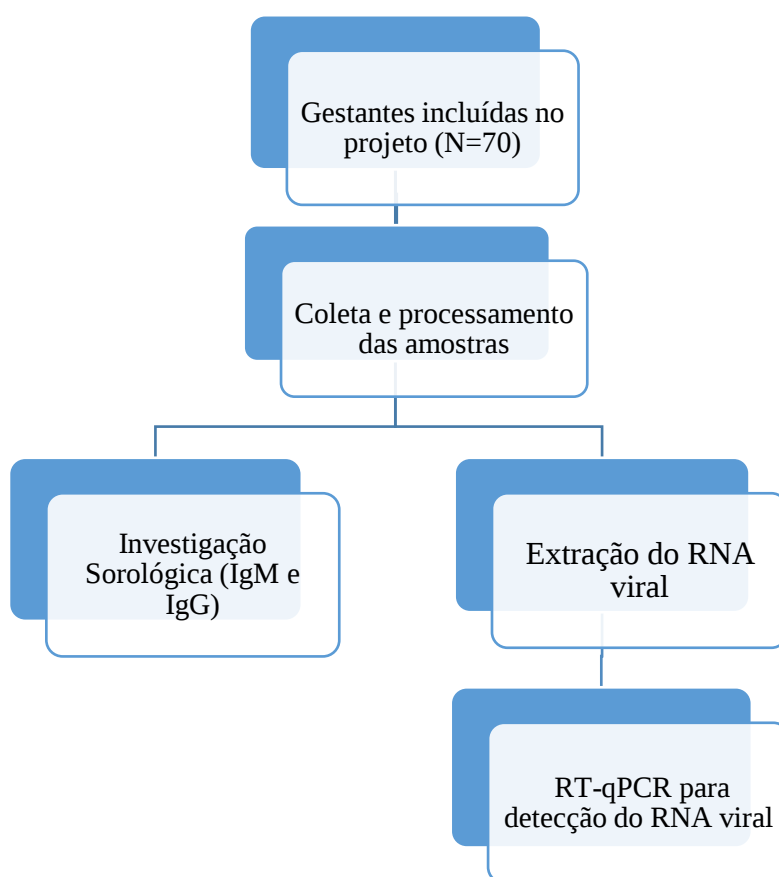
A reação foi realizada utilizando kit comercial Path-ID multiplex One-Step RT-qPCR 1X (Applied Biosystems – Carlsbad, CA, USA), que consistiu no uso de 2,5 $\mu$ L de material extraído em um volume final de reação de 20 $\mu$ L, contendo 10 $\mu$ L de tampão, 2  $\mu$ L de Multiplex Enzyme Mix, 0,8 $\mu$ L (8 $\mu$ M) de cada iniciador e 0,4 $\mu$ L (4 $\mu$ M) de sonda TaqMan.

A reação foi processada em aparelho Rotor – Gene Q (Qiagen®), de acordo com a seguinte ciclagem: para transcrição reversa, 48°C por 30 minutos para a ativação da transcriptase reversa, 95°C por 15 minutos para inativação da transcriptase reversa e posterior amplificação em 45 ciclos de: 95°C por 15 segundos para hibridização e por último 60°C por um minuto para a extensão.

**Quadro 3:** Oligonucleotídeos e sonda utilizados para RT-PCR em tempo real (Patel et al. 2016).

| Oligonucleotídeos | Sequência: 5' - 3'                              | Região de hibridização gene E1 |
|-------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------|
| CHIKV FP1         | YGA YCA YGC MGW CAC AG                          | 10443 – 10459                  |
| CHIKV RP1         | AAR GGY GGG TAG TCC ATG TT                      | 10549 – 10568                  |
| CHIKV Probe 2     | 6FAM -CCA ATG TCY TCM GCC<br>TGG ACR CCK TT-TMR | 10486 – 10511                  |

Legenda: R = A-G; Y = C-T; W = A-T; K = G-T; M = A-C;



**Figura 8:** Fluxograma de materiais e métodos.

#### **4.5. Avaliação e Análise de Dados**

Para análise dos dados foram utilizadas informações obtidas a partir da avaliação das fichas de investigação do Sistema de Informação de Agravos. Foi elaborado um arquivo eletrônico contendo os dados provenientes da população de estudo, obtidos pelo banco de dados secundários em cima dos quais foram utilizados para análise com o auxílio do programa Epi-Info 2000 for win.

## 5. RESULTADOS

O presente estudo avaliou a ocorrência de infecção pelo CHIKV em gestantes residentes no município de Goiânia no período de janeiro de 2017 a julho de 2018 atendidas na rede pública de saúde do município, apresentando quadro exantemático. Foram incluídas no estudo 70 gestantes que possuíam o exantema como sintoma principal. A maioria das gestantes envolvidas no estudo pertencia à faixa etária entre 20 e 29 anos 45,7% (32/70), enquanto apenas 1,4% (1/70) da população investigada estava na faixa etária acima de 40 anos.

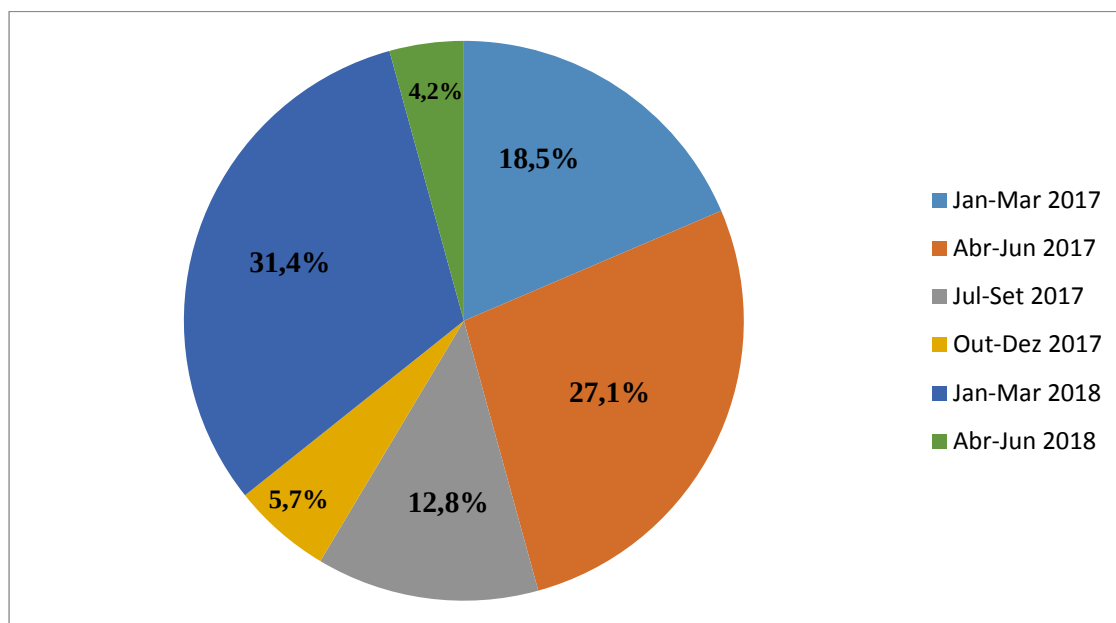
Com relação ao período gestacional em que a mulher estava no momento em que as manifestações sintomáticas ocorreram, a maioria das gestantes 38,5% (27/70) estava no primeiro trimestre gestacional, seguida pelo terceiro e segundo trimestres com percentuais de 30% (21/70) e 25,7% (18/70) respectivamente. Em 5,7% (4/70) das gestantes incluídas no estudo não foi possível obter informações sobre o período gestacional (Tabela 1).

**Tabela 1:** Características da população estudada (n=70).

| CARACTERÍSTICAS                       | N  | (%)   |
|---------------------------------------|----|-------|
| <b>Faixa etária</b>                   |    |       |
| 15 – 19 anos                          | 15 | 21,4% |
| 20 – 29 anos                          | 32 | 45,7% |
| 30 – 39 anos                          | 22 | 31,4% |
| ≥ 40 anos                             | 1  | 1,4%  |
| <b>Período gestacional</b>            |    |       |
| 1º trimestre                          | 27 | 38,5% |
| 2º trimestre                          | 18 | 25,7% |
| 3º trimestre                          | 21 | 30%   |
| SI                                    | 4  | 5,7%  |
| <b>Ano de ocorrência dos sintomas</b> |    |       |
| 2017                                  | 45 | 64,2% |
| 2018                                  | 25 | 35,7% |
| <b>Coleta das amostras/sintomas</b>   |    |       |
| Fase aguda                            | 16 | 22,8% |
| Fase tardia                           | 54 | 77,2% |

SI: Sem informação

Considerando o ano de ocorrência da manifestação sintomática (exantema), foi observado que 64,2% (45/70) dos casos foram relatados ter ocorrido no ano de 2017 e 35,7% (25/70) no ano de 2018. Ainda, o primeiro trimestre de 2018 representou o maior número de casos exantemáticos inclusos no estudo 31,4% (22/70), seguido pelo segundo trimestre de 2017 com 27,1% (19/70) (Figura 9).



**Figura 9:** Distribuição dos casos exantemáticos em relação ao trimestre anual de ocorrência do quadro sintomático (N=70).

Todas as amostras, como já descrito anteriormente, foram submetidas ao teste sorológico para detecção dos anticorpos específicos contra o CHIKV, IgM e IgG. Das 70 amostras analisadas, uma apresentou positividade para o marcador IgG isolado (1,4%) (Caso 1) e outra gestante apresentou positividade para os marcadores IgG e IgM (1,4%) (Caso 2). Nos dois casos, o quadro exantemático ocorreu quando a gestante estava no primeiro trimestre gestacional. Assim, na população investigada foi observada uma soroprevalência de 2,8% (IC 95%: 0,34 – 9,94).

A investigação para o marcador molecular por RT-qPCR específica para CHIKV (RNA viral), demonstrou taxa de positividade para a infecção pelo CHIKV de 1,4% (IC 95%: 0,03 – 7,70). A amostra identificada com positividade para o RNA viral corresponde ao caso 2, o qual representa a amostra com positividade para os dois marcadores sorológicos pesquisados (IgM e IgG) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Positividade para os marcadores de infecção pelo vírus chikungunya (sorológico e molecular) em relação ao trimestre gestacional (n=70).

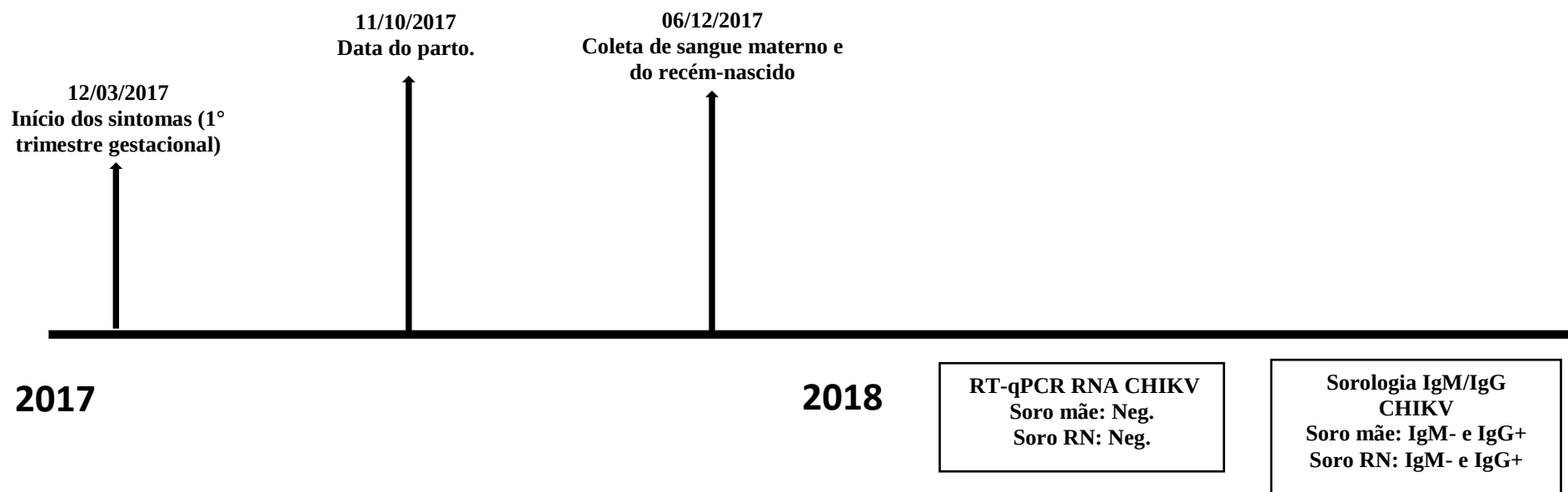
| <b>Período gestacional</b> | <b>IgG Pos/T(%)</b> | <b>RT-qPCR Pos/T (%)</b> | <b>IgM/ IgG/ RT-qPCR Pos/T(%)</b> | <b>Total Pos/T(%)</b> |
|----------------------------|---------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| 1º trimestre               | 1/27 (3,7%)         | 0/27                     | 1/27 (3,7%)                       | 2/27 (7,4%)           |
| 2º trimestre               | 0/18                | 0/18                     | 0/18                              | 0/18                  |
| 3º trimestre               | 0/21                | 0/21                     | 0/21                              | 0/21                  |
| SI                         | 0/4                 | 0/4                      | 0/4                               | 0/4                   |
| <b>Total</b>               | 1/70 (1,4%)         | 0/70                     | 1/70 (1,4%)                       | 2/70 (2,8%)           |

SI: Sem informação

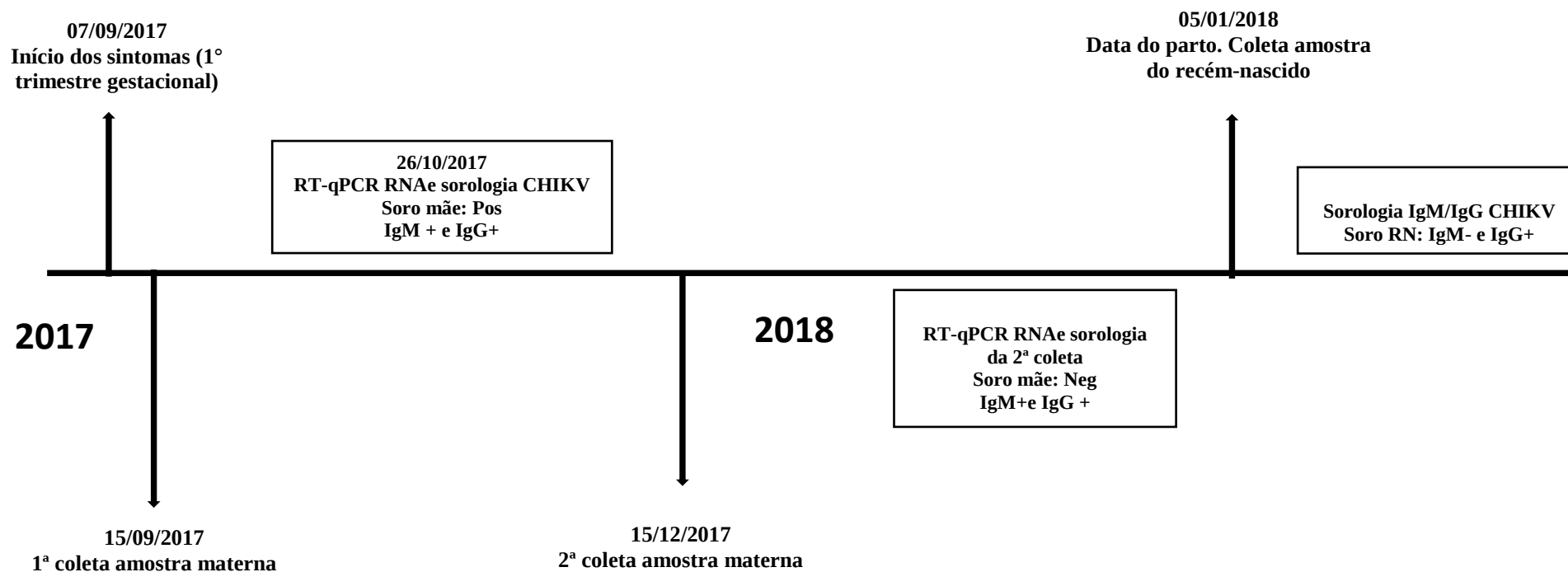
O Caso 1 refere-se a uma gestante com 24 anos de idade, que na ocasião apresentou exantema disseminado para diversas partes do corpo como membros inferiores, abdôme, mãos e pés além de outros sintomas como dores musculares durante sete dias, dor e inchaço nas articulações, cefaleia, fraqueza no corpo. Os sintomas tiveram início em 12 de março de 2017 estando a gestante no primeiro trimestre gestacional. Conforme descrito, as gestantes foram acompanhadas por clínico especialista até o momento do parto, o qual, neste caso ocorreu em 11 de outubro de 2017, não sendo descritas anormalidades no recém-nascido ao nascimento. A coleta de material biológico materno foi realizada após a data do parto, em 06 de dezembro de 2017, bem como do recém-nascido. As amostras foram submetidas a investigação molecular e sorológica e apresentaram resultados negativos para o RNA viral pela técnica de RT-qPCR e para o marcador sorológico IgM. Para o marcador sorológico IgG, amostras materna e do recém-nascido foram positivas (Figura 10).

Outro caso (caso 2) foi descrito em uma gestante com 19 anos de idade, que além do exantema apresentou sintomas como febre alta durante sete dias, dores musculares e nas articulações, cefaleia, vômito, fraqueza no corpo e conjuntivite. As manifestações clínicas ocorreram quando a gestante estava no primeiro trimestre gestacional, com início no dia 07 de setembro de 2017. A primeira coleta de material biológico ocorreu oito dias após o início dos sintomas e, por meio do acompanhamento desta gestante, foi possível obter nova amostra três meses após esta data em 15/12/2017. Pela técnica molecular, positividade foi observada apenas na

amostra da primeira coleta, enquanto a avaliação sorológica demonstrou positividade para ambos marcadores (IgM e IgG) nos dois momentos de coleta. A gestante permaneceu sendo acompanhada até o parto, que ocorreu no dia 05 de janeiro de 2018, não sendo descritas anormalidades no recém-nascido. No momento do parto foi coletada amostra do recém-nascido e esta apresentou positividade apenas para o marcador sorológico IgG (Figura 11).



**Figura 10:** Linha do tempo mostrando os principais eventos do caso 1.



**Figura 11:** Linha do tempo mostrando os principais eventos do caso 2.

## 6. DISCUSSÃO

---

O vírus chikungunya (CHIKV) é um importante arbovírus transmitido ao ser humano através de picadas de vetores insetos do gênero *Aedes*. A doença é caracterizada por quadros de febre associadas à dor articular intensa e debilitante, além de cefaleia, mialgia e exantema maculopapular (Manimunda et al. 2010).

A introdução do CHIKV no Brasil ocorreu em maio de 2014, com a primeira confirmação de caso autóctone na cidade de Feira de Santana, estado da Bahia (Cardoso et al. 2017). Em Goiânia, no mês de dezembro de 2014 foram registrados os primeiros casos de CHIKV. Neste mesmo ano foram notificados 13 casos suspeitos sendo confirmados dois. Os casos confirmados foram considerados importados (Guiana Francesa e Caribe) e a primeira comprovação de caso autóctone ocorreu no município de Rio Quente com a confirmação de um caso (MS Brasil, 2015 ; Goiânia, 2014).

Este estudo constitui a primeira investigação da ocorrência de CHIKV realizada na região Centro-Oeste, em específico, em gestantes exantemáticas notificadas pela rede pública de saúde do município de Goiânia – GO. A população de gestantes avaliada foi constituída em sua maioria por mulheres na faixa etária entre 20 e 29 anos, a qual é descrita na literatura como a faixa etária de maior frequência na população gestante pelo estudo de Fritel et al. 2010 (47%) e Laoprasopwattana et al. 2015 cuja média de idade foi de 24.7 anos (Fritel et al. 2010; Laoprasopwattana et al. 2015).

Além da transmissão horizontal ao ser humano através de picadas de vetores insetos do gênero *Aedes*, foram descritos casos de infecção pelo CHIKV transmitidos de mãe para filho no momento do parto (transmissão perinatal). Em associação a estas ocorrências, foi observada doença neo-natal grave nos recém-nascidos, principalmente encefalite, também com possibilidade de desenvolvimento de deficiências ao longo da vida (Fritel et al. 2010; Ritz et al. 2015). A transmissão perinatal de CHIKV foi descrita pela primeira vez em junho de 2005 durante a epidemia na Ilha La Reunión que afetou mais de um terço da população (Gérardin et al. 2008). Entretanto, apenas após o ocorrido no Brasil para ZIKV, para o qual foi comprovada a transmissão vertical do vírus e sua associação com casos de microcefalia, foi estabelecida no país a portaria 204 do Ministério da Saúde de 2016, a qual determinou a notificação compulsória para os casos suspeitos de infecção pelo ZIKV (Brasil – Ministério da Saúde, 2016).

Este foi um marco essencial para o sistema de vigilância das arboviroses no país, em particular em população de gestantes. Assim, em 2017 foram notificados 2190 casos de gestantes exantemáticas e em 2018 até a SE 36 o número foi de 1013. Na presente investigação, foi observado este mesmo padrão de redução de casos exantemáticos em relação aos anos 2017 e 2018, todavia o primeiro trimestre de 2018 apresentou um maior número de casos elegíveis para o estudo. Entretanto, este fato pode estar associado ao processo de captação de gestantes participantes que com o desenvolvimento do projeto, foi se tornando mais eficaz, favorecendo um melhor estabelecimento do mesmo.

Dados obtidos pela Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia relacionados com a população geral apontam para uma diminuição da frequência de CHIKV, onde no ano de 2017 foram notificados 80 casos suspeitos, enquanto no ano de 2018 este número foi de 60 casos notificados, dos quais, 42 foram descartados. Dentre os dados notificados em 2017, 12 foram confirmados sendo seis importados e seis autóctones (Goiânia, 2018). Nos casos notificados em 2018 até o presente momento, apenas um caso foi confirmado (importado). Na população de gestantes notificadas, diferentemente do ZIKV, a investigação laboratorial para CHIKV não é considerada uma recomendação obrigatória e assim, dos casos de gestantes com quadro exantemático notificadas, não existem dados disponíveis pela vigilância a respeito da ocorrência deste vírus.

Na presente investigação, foi identificado um índice de soroprevalência para a infecção pelo CHIKV de 2,8% (IC 95%: 0,34 – 9,94). Este dado reflete a baixa circulação deste agente no em nossa região, conforme os dados apresentados da vigilância da Secretaria Municipal de Goiânia (Goiânia, 2018). Um estudo realizado por Bacci e colaboradores em 2015 em população semelhante, relatou um índice de 36,1% (127/352) para anticorpos IgG, índice considerado alto em relação ao nosso estudo. Entretanto, o local do estudo é considerada uma região endêmica para o vírus (oeste da África) (Bacci et al. 2015). No Brasil, dados publicados por Cunha e colaboradores com a população geral do Distrito de Chapada na Bahia demonstraram que dos 120 indivíduos envolvidos no estudo, foi obtido um índice de soropositividade de 20% sendo essa região localizada a 100 km da cidade de Feira de Santana onde foi detectado pela primeira vez o genótipo ECSA no Brasil em 2014, e por ter apresentado nessa região um alto índice de casos já notificados (Cunha et al. 2017).

Com base em análises feitas nos boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde, em 2017 da semana epidemiológica 01 até a 52 foram registrados 185.593 casos prováveis de febre chikungunya, destes, o estado do Ceará destacou-se com 113.040 de casos prováveis de CHIKV, sendo confirmados 152 óbitos. Em 2018 até a semana epidemiológica 36, foram registrados 74.932 casos prováveis, com destaque para o estado do Rio de Janeiro que tem, até a presente data, 31.994 casos prováveis sendo 9 óbitos confirmados. No estado de Goiás observa-se um pequeno número de registros quando em relação a outras regiões do país, sendo que em 2018 apenas 204 casos prováveis foram registrados até o momento (Brasil MS, 2018).

No caso 1 a gestante apresentou resultado positivo apenas para o marcador IgG, indicando uma exposição ao vírus. A amostra reagente foi obtida nove meses após a manifestação dos sintomas, que ocorreram no primeiro trimestre gestacional. Este fato justifica a ausência do marcador molecular, bem como do marcador sorológico de infecção aguda (IgM), em função do período ocorrido da coleta após a fase aguda do quadro exantemático, uma vez que, somente nessa data a equipe do projeto conseguiu entrar em contato com a gestante e posteriormente realizar a coleta da amostra.

No caso 2, a primeira amostra foi coletada oito dias após o início dos sintomas. Foi possível detectar a presença do RNA viral na amostra utilizando uma técnica sensível, e detectar a presença dos marcadores sorológicos IgM e IgG. Essa gestante foi acompanhada com a coleta de uma segunda amostra três meses após os sintomas onde apresentou resultado negativo para a detecção do RNA viral e permaneceu positivo para IgM e IgG, o que está em acordo com o descrito para a evolução da infecção por este agente. Bacci e colaboradores, observou que das 352 amostras apenas uma foi positiva para o marcador IgM demonstrando que naquele momento do estudo a gestante apresentava infecção aguda, e as 127 gestantes positivas para o marcador IgG estão relacionadas com infecção passada, uma vez que, como já mencionado, a área é endêmica para o CHIKV (Bacci et al. 2015).

Com relação aos sintomas relatados nos dois casos identificados no estudo, além do exantema, houve predomínio de febre, artralgia e cefaleia que foram observados no primeiro trimestre gestacional. Ramos e colaboradores e Lyra e colaboradores em seus relatos de caso, descreveram sintomas equivalentes em gestantes, os quais foram identificados em dias antes do parto. Nestas investigações, foram descritas adicionalmente manifestações clínicas nos recém-nascidos: exantema,

insuficiência respiratória, febre, trombocitopenia e hemorragia intracraniana. Assim, a partir dessas características, foram evidenciados casos de transmissão perinatal (Lyra et al. 2016; Ramos et al. 2017).

A investigação nas amostras dos recém-nascidos dos dois casos relatados, revelou positividade também apenas para o marcador IgG. Imunoglobulinas de classe G são importantes no processo de inflamação da resposta imune adaptativa, além de ser o único tipo de imunoglobulina capaz de ultrapassar a barreira placentária (Paul, WE. 2008). Nestes casos apresentados no estudo, a positividade nos recém-nascidos para IgG pode sugerir transferência de imunoglobulinas maternas para o feto, não sendo necessariamente um processo infeccioso ocorrido.

Ainda, os recém-nascidos não apresentaram qualquer sintomatologia ou descrição de anormalidade ao nascimento. Gerárdin e colaboradores em um estudo de coorte com gestantes na Ilha La Reunión, relataram que a transmissão materno-fetal é frequentemente observada no momento do parto (transmissão perinatal) e que a infecção no início da gestação há pouca possibilidade de transmissão uma vez que o vírus possui dificuldade de atravessar a barreira placentária (Gerárdin et al. 2008). Este fato reforça a sugestão de ausência de infecção fetal, uma vez que nos dois casos relatados o quadro exantemático materno ocorreu quando as gestantes estavam no primeiro trimestre gestacional.

A introdução do CHIKV no estado de Goiás e no município de Goiânia ocorreu em condições de sobreposição com outras arboviroses de importância. Aliado a este fato, as semelhanças na sintomatologia apresentada por estes agravos podem constituir de dificuldade na avaliação e identificação do real perfil de propagação deste agente na região. O baixo índice de infecção demonstrado no presente estudo, em associação aos dados do sistema de vigilância levam à sugestão de que o vírus circulante na população, apresenta uma dificuldade de se estabelecer com características de uma epidemia, apesar da descrição da mutação ocorrida na posição E1-A221V identificada como fator de melhor *fitness* do CHIKV.

Contudo, a cidade de Goiânia apresenta condições climáticas e ambientais favoráveis para uma ampla dispersão de mosquitos vetores do gênero *Aedes sp*, favorecendo uma alta infestação destes. Associado a este fato, a ampla suscetibilidade observada na população constituem aspectos que favorecem uma possível e rápida disseminação do vírus e assim, a região caracteriza um cenário com potencial risco para epidemias por CHIKV.

Dessa forma, a implementação de ações de vigilância com foco na intensificação do controle de epidemias torna-se essencial. A efetividade deste processo está diretamente vinculada ao estabelecimento do diagnóstico preciso e rápido, que favoreça o rastreamento dos casos de infecções pelo CHIKV. Neste contexto, a presente investigação constitui estudo relevante, contribuindo para o conhecimento da ocorrência desse agente na região. A transmissão materno-fetal do CHIKV pode causar complicações neonatais graves, existe, portanto necessidade de mais estudos nesta área para compartilhar, conhecer e implementar um protocolo para manejo da infecção perinatal por CHIKV. Como perspectiva futura, o sequenciamento genômico dessa amostra RNA positiva torna-se essencial para identificar o genótipo circulante na população do estado contribuindo para os estudos epidemiológicos.

## 7. CONCLUSÃO

---

- Foi identificada uma soropositividade da infecção pelo CHIKV de 2,8%, o que representou dois casos de gestantes com positividade para marcadores sorológicos, sendo um IgG isolado e outro em associação ao marcador IgM;
- A infecção aguda de uma gestante foi confirmada pela detecção do RNA viral (1,4%);
- Nos dois casos de positividade para os marcadores sorológicos, apenas um apresentou associação ao marcador molecular (RNA viral), caracterizando uma amostra de fase aguda da infecção;
- Os casos de infecção por CHIKV em gestantes do estudo consistiram de casos com manifestações clínicas características da infecção, as quais ocorreram durante o primeiro trimestre da gestação, não sendo identificados fatores que permitissem a associação à transmissão perinatal.

## REFERÊNCIAS

---

Acosta-Reyes J, Navarro-Lechuga E, Martínez-Garcés J C. Chikungunya fever: history and epidemiology. *Revista Salud Uninorte*. 31(3): 621-630, 2015.

Adam A, Osama M.E.S, Christopher W, Barbara S, Jonas SC, Sven R, Christian J. Low seroprevalence indicates vulnerability of eastern and central Sudan to infection with chikungunya virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 16 (4): 290-291, 2016.

Akahata W, Yong Yang Z, Andersen H, Siyang Sun, Heather A H, Kong W P. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nature medicine*. 16 (3): 334, 2010.

Alla, S Ali Ou & Combe B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 25 (3): 337-346, 2011.

Azevedo RSS, Oliveira CS, Vasconcelos PFC. Chikungunya risk for Brazil. *Revista de saúde pública*. 49, 2015.

Bacci A, Marchi S, Fievet N, Massougbodji A, Perrin R X, Chippaux J P, Sambri V, Landini M P, Varani S, Rossini G. High seroprevalence of chikungunya virus antibodies among pregnant women living in an urban area in Benin, West Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene* (92): 6, 1133-1136, 2015.

Bandeira A C, Campos G S, Sardi S I, Rocha V F D, MD, Rocha G C M. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: first report in Brazil. *IDCases*. 5. 57-59, 2016.

Bernard E., Solignat M, Bernard G, Chazal N, Higg S, Devaux C, Briant L. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One*. 5 (7): e11479, 2010.

Blettery M, Brunier L, Polomat K, Moinet F, Deligny C, Arfi S, Baptiste G J, Bandt M. Brief Report: Management of Chronic Post-Chikungunya Rheumatic Disease: The Martinican Experience. *Arthritis & Rheumatology*. 68 (11): 2817-2824, 2016.

Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Goux A, Cotte L, Michault A, Arvin-Berod C, Paganin F. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clinical Infectious Diseases*. 47 (4): 469-475, 2008.

Bourai M, Lucas-Hourani M, Gad H H, Drosten C, Jacob Y, Tafforeau L, Lecuit M. Mapping of Chikungunya virus interactions with host proteins identified nsP2 as a highly connected viral component. *Journal of virology*. 86 (6): 3121-3134, 2012.

Brasil – Ministério da Saúde, 2016  
<[bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204\\_17\\_02\\_2016.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html)> acessado dia 19/10/18.

Brasil (a). Ministério da Saúde. <<http://www.combateaedes.saude.gov.br/pt/tira-duvidas>> 2016. Acesso: 23/06/2017.

Brasil (b). Ministério Da Saúde. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/01/governo-encomendara-500-mil-testes-para-zika-chikungunya-e-dengue>>. Acesso: 09/05/2017.

Brasil (c). Ministério da Saúde. Chikungunya: manejo clínico. Disponível em <<http://www.portalarquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2016/dezembro/25/chikungunya-novo-protocolo.pdf>>. Acesso dia: 23/06/2017.

Brasil (d). Ministério da Saúde. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/02/registrado-teste-que-detecta-zika-chikungunya-e-dengue-de-forma-combinada>>. Acesso dia: 28/06/2017.

Brasil. Ministério da Saúde. 2017. Disponível em <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2012/05/pre-natal-e-fundamental-para-uma-gravidez-saudavel-diz-ministerio-da-saude>> Acesso dia 08/11/2018.

Brasil. Ministério Da Saúde. Boletim epidemiológico volume 49, nº28/2018. Disponível em <<http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso: 10/07/2018.

Brasil. Ministério Da Saúde. Disponível em <[http://www.saude.campinas.sp.gov.br/vigilancia/informes/2014/Informe\\_Tecnico\\_CVE\\_IF160614\\_CHIKUNGUNYA.pdf](http://www.saude.campinas.sp.gov.br/vigilancia/informes/2014/Informe_Tecnico_CVE_IF160614_CHIKUNGUNYA.pdf)>. Acesso: 08/05/2017.

Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance J M. In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon- $\alpha$  and ribavirin combination. *Antiviral research*. 61 (2): 111-117, 2004.

Bullard-Feibelman K M, Fuller B P & Geiss B J. A sensitive and robust high-throughput screening assay for inhibitors of the chikungunya virus nsP1 capping enzyme. *PLoS One*, 11(7). 0158923, 2016.

Cardona-Correa S E, Lina María Castaño-Jaramillo L M C, Quevedo-Vélez A. Vertical transmission of chikungunya virus infection. Case Report. *Revista chilena de pediatría*, (88) : 2, 285-288, 2017.

Cardoso C W, Kikuti M, Prates A P P B, Paploski I A D, Tauro L B, Silva M M O, Santana P, Rego M F S, Mitermayer. Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, 11 (1): e0005334, 2017.

Carey D E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 26(3), 243-262, 1971.

Cauchemez S, Ledrans M, Poletto C, Quenel P, Valk H, Colizza V, Boelle P Y. Local and regional spread of chikungunya fever in the Americas. *Euro surveillance*:

*bulletin Europeen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin*. 19 (28): 20854, 2014.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC. 2015. Disponível em <[www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV\\_Presentation.pdf](http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_Presentation.pdf)> Acesso dia: 05/06/17.

Centers for Disease Control and Prevention-CDC. 2016 provisional data for the United States. Disponível: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states-2016>>. Acesso dia: 04/07/2017.

Chandak N H, Kashyap R S, Kabra D, Karandikar P, Saha S S, Morey S H, Purohit H J. Neurological complications of Chikungunya virus infection. *Neurology India*.57 (2): 177, 2009.

Chang S F, Su C L, Shu P Y, Yang C F, Liao T L, Cheng C H, Hu H C, Huang J H. Concurrent isolation of chikungunya virus and dengue virus from a patient with coinfection resulting from a trip to Singapore. *Journal of clinical microbiology*, 48 (12): 4586-4589, 2010.

Charrel R N, Lamballerie X, Raoult D. Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. *The New England journal of medicine*, 356 (8): 769, 2007.

Chen K C, Kam Y W, Lin R T P, Ng M M L, Ng L F P, Chu J J H. Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. *Virology journal*, 10 (1): 169, 2013.

Chen R, Puri V, Fedorova N, Lin D, Hari K L, Jain R, Rodas J K. Comprehensive Genome Scale Phylogenetic Study Provides New Insights on the Global Expansion of Chikungunya Virus. *Journal of Virology*, 90 (23): 10600-10611, 2016.

Chian C W, Chan Y F, Ong K C, Wong K T, Sam I C. Neurovirulence comparison of chikungunya virus isolates of the Asian and East/Central/South African genotypes from Malaysia. *Journal of General Virology*, 96(11): 3243-3254, 2015.

Clayton A M. Monoclonal antibodies as prophylactic and therapeutic agents against chikungunya virus. *The Journal of infectious diseases*. 214 (5): 506-509, 2016.

Contevelle L C, Zanella L, Marin M A, Bispo de Filippis A M, Nogueira R M R, Vicente A C P, Mendonça M C L. Phylogenetic analyses of chikungunya virus among travelers in Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2015. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111 (5): 347-348, 2016.

Cunha R V, Trinta K S, Montalbano C A, Sucupira M V, de Lima M M, Marques E, Croda J. Seroprevalence of chikungunya virus in a rural community in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 11 (1): e0005319, 2017

Delang L, Guerrero N S, Tas A, Querát G, Pastorino B, Froeyen M, Dallmeier K, Jochmans D. Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause

resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 69 (10): 2770-2784, 2014.

Delisle E, Rousseau C, Broche B, L'Ambert G, Cochet A, Prat Cl. chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill*, 20 (17): 21108, 2015.

Delogu I & Lamballerie X. Chikungunya disease and chloroquine treatment. *Journal of medical virology*. 83 (6): 1058-1059, 2011.

Diallo M, Thonnon J, Lamizana M T, Fontenille D. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 60 (2): 281-286, 1999.

Doughty C T, Yawetz S, Lyons J. Emerging Causes of Arbovirus Encephalitis in North America: Powassan, Chikungunya, and Zika Viruses. *Current neurology and neuroscience reports*. 2 (17): 1-16, 2017.

Edwards T, Signor L C C, Willians C, Donis E, Cuervas L E, Adams E R. Co-infections with Chikungunya and Dengue Viruses, Guatemala, 2015. *Emerging infectious diseases*, 22 (11): 2003, 2016.

Enserink M. Chikungunya: no longer a third world disease. *Science*. 318 (5858): 1860-1861, 2007.

Erasmus J H, Auguste A J, Kaelber J T, Luo H, Rossi S L, Fenton K, Leal G, Kim D Y, Chiu W, Wang T, Frolov I. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nature medicine*. 23 (2):192-199, 2017.

Forrester N L, Palacios G, Tesh R B, Guzman H, Sherman M, Weaver S C, Lipkin W I. Genome scale phylogeny of the Alphavirus genus suggests a marine origin. *Journal of virology*. JVI. 05591-11, 2011.

Fritel X, Rollot O, Gerárdin P, Gauzere B A, Bideault J, Lagarde L, Dhuime B, Orvain E. Chikungunya virus infection during pregnancy, Reunion, France, 2006. *Emerging infectious diseases*. 16(3): 418, 2010.

Gallian P, Goffart I L, Richard P, Maire F, Flusin O, Djoudi R, Chiaroni J, Charrel R. Epidemiology of Chikungunya Virus Outbreaks in Guadeloupe and Martinique, 2014: An Observational Study in Volunteer Blood Donors. *PLOS Neglected Tropical Diseases*.11(1): e0005254, 2017.

Gardner J, Anraku I, Le T L, Larcher T, Major L. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *Journal of virology*. 84(16): 8021-8032, 2010.

Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolova I. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *Journal of virology*. 80 (12): 5686-5696, 2006.

Gérardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaivo H, Choker G, Lenglet Y, Touret Y. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med.* 5 (3): e60, 2008.

Gerárdin P, Labeaud A D, Ritz N, Fritel X. Chikungunya fever during pregnancy and in children: An overview on clinical and research perspectives. *Current topics in chikungunya* 20-41, 2016.

Goiânia, 2014 <[www.saude.goiania.go.gov.br/html/noticia/14/12/Secretaria-Municipal-Saude-promove-Dia-D.shtml](http://www.saude.goiania.go.gov.br/html/noticia/14/12/Secretaria-Municipal-Saude-promove-Dia-D.shtml)> acessado dia 20/10/2018.

Goiânia,2018<[www.saude.goiania.go.gov.br/docs/divulgacao/Informe\\_Semanal\\_Den\\_Chik\\_Zika\\_Micro\\_09\\_10\\_18\\_SE\\_40.pdf](http://www.saude.goiania.go.gov.br/docs/divulgacao/Informe_Semanal_Den_Chik_Zika_Micro_09_10_18_SE_40.pdf)> acesso dia 10/10/2018.

Gopakumar, H & Ramachandran, S. Congenital chikungunya. *Journal of clinical neonatology*, (1) : 3. 155, 2012.

Graham B S, Repik P M, Yactayo S. Chikungunya in the Americas: Recommendations and Conclusions. *Journal of Infectious Diseases.* 214(5): 510-513, 2016.

Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge J M, Souares Y, Failloux A B, Tolou H J. Chikungunya virus, southeastern France. *Emerging infectious diseases.* 17(5):910, 2011.

Griffin D E. *Alphaviruses*. In: Fieds Virology. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 3<sup>o</sup> ed. 629-650, 2013.

Hammon W M, Rundnick A, Sather G E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, 131(3407): 1102-1103, 1960.

Hapuarachchi H C, Bandara K B A T, Sumanadasa S D M, Hapugoda M d, Lai Y L, Lee K S, Tan L k. Re-emergence of Chikungunya virus in South-east Asia: virological evidence from Sri Lanka and Singapore. *Journal of General Virology.* 91 (4): 1067-1076, 2010.

Hasebe F, Parquet M C, Pandey B D, Mathenge E G M, Morita K, Saat Z, Yusop Al. Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. *Journal of medical virology.* 67(3): 370-374, 2002.

Her Z, Malleret B, Chan M, Ong E K S, Wong S C, Kwek D J C, Tolou H. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. *The Journal of Immunology.* 184 (10): 5903-5913, 2010.

Hertz J T, Munishi M O, Ooi E E, Howe S, Lim W Y, Chow A. Chikungunya and dengue fever among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 86(1): 171-177, 2012.

Honório N A, Câmara D C P, Calvet G A, Brasil P. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 31(5): 906-908, 2015.

Honório N A, Castro M G, Barros F S M, Magalhães M A F M, Sabroza P C. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 25(6): 1203-1214, 2009.

Hussain K M & Chu J J H. Insights into the interplay between chikungunya virus and its human host. *Future Virology*. 6 (10): 1211-1223, 2011.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 10th report.2017. <[http://www.ictvonline.org/ictv\\_reports/ictv\\_10th\\_report](http://www.ictvonline.org/ictv_reports/ictv_10th_report)>. Acesso: 23/06/2018.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Vírus taxonomy: 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/>>. Acesso dia: 23/03/2017.

Ioos S et al. "Current Zika virus epidemiology and recent epidemics." *Medecine et maladies infectieuses*. 44(7): 302-307, 2014.

J. L. Alvarado-Socarras J L, González M O, Vargas-Soler J A, Rodriguez-Morales A J, Franco-Paredes C. Congenital and neonatal chikungunya in Colombia. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, (5) : 3, 17-e20, 2016.

Jacobsen S, Patel P, Chanasit J S, Goffart I L, Teichmann A. External quality assessment studies for laboratory performance of molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Journal of Clinical Virology*. 76: 55-65, 2016.

Jain J, Dubey S K, Shrinet J, Sunil S. Clinical, Serological, and Virological Analysis of 572 Chikungunya Patients From 2010 to 2013 in India. *Clinical Infectious Diseases*, 65 (1): 133-140, 2017.

Janzen H G, Rhodes A J, Doane F W. Chikungunya virus in salivary glands of *Aedes aegypti* (L.): an electron microscope study. *Canadian journal of microbiology*. 16 (7): 581-586, 1970.

Jose J, Snyder J E, Kuhn R J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future microbiology*. 4(7): 837-856, 2009.

Kalantri S P, Joshi R, Riley L W. Chikungunya epidemic: an Indian perspective. *National Medical Journal of India*. 19(6): 315, 2006.

Kamhi E, Joo E J, Dordick J S, Linhardt R. Glycosaminoglycans in infectious disease. *Biological Reviews*. 88 (4): 928-943, 2013.

Kashyap R S, Morey S H, Chandak N H, Purohit H J, Taori G M. Detection of viral antigen, IgM and IgG antibodies in cerebrospinal fluid of Chikungunya patients with neurological complications. *Cerebrospinal fluid research*. 7(1): 12, 2010.

Kelvin A A. Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 5(06): 441-444, 2011.

Khan A H, Morita K, Parquet M D C, Hasebe F, Mathenge E G M. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*. 83 (12): 3075-3084, 2002.

Kucharz E J & Cebula-Byrska I. Chikungunya fever. *European journal of internal medicine*. 23(4): 325-329, 2012.

Kuhn R J. *Togaviridae*. In: Fields Virology. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 3<sup>o</sup> ed. 629-650, 2013.

Kujala P, Ikaheimonen A , Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P. biogenesis of the semliki forest virus RNA replication complex. *journal of virology*. 75(8): 3873-3884, 2001.

Kumar S, Mamidi P, Kumar A, Basantray I, Bramha U, Dixit A, Chattopadhyay S. Development of novel antibodies against non-structural proteins nsP1, nsP3 and nsP4 of chikungunya virus: potential use in basic research. *Archives of virology*, 160(11), 2749-2761. 2015.

Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard, Lamballerie X. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of clinical investigation*, 120(3), 894-906. 2010.

Laine M, Luukkainen R, Toivanen A. Sindbis viruses and other alphaviruses as cause of human arthritic disease. *Journal of internal medicine*, 256 (6): 457-471, 2004.

Laiton-Donato K, Usme-Ciro J A, Rico A, Pardo L, Martínez C, Salas D, Páez A. Análisis filogenético del virus del chikungunya en Colombia: evidencia de selección purificadora en el gen E1. *Biomédica*, 36, 25-34. 2016.

Lam S K, Chua K B, Hooi P S, Rahimah M A, Kumari S, Tharmaratnam M, Sampson, I. A. Chikungunya infection-an emerging disease in Malaysia. *Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 32(3), 447-451. 2001.

Laoprasopwattana K, Suntharasaj T, Petmanee P, Suddeaugrai O, Geater A. Chikungunya and dengue virus infections during pregnancy: seroprevalence, seroincidence and maternal-fetal transmission, southern Thailand, 2009–2010. *Epidemiology & Infection*, 144(2), 381-388. 2016.

Laras K, Sukri N C, Larasati R P, Bangs M J, Kosim R, Wandra T, Sedyaningsih E R. Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99(2), 128-141. 2005.

Laurent P, Le Roux K, Grivard P, Bertil G, Naze F, Picard M, Michault, A. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. *Clinical chemistry*, 53(8), 1408-1414. 2007.

Li L, Jose J, Xiang Y, Kuhn R J, Rossmann, M. G. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature*, 468(7324), 705. 2010.

Ligon B L. Reemergence of an unusual disease: the chikungunya epidemic. In: *Seminars in pediatric infectious diseases*. 99-104, 2006.

Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, De Filippis A M B, Failloux, A. B. *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(1), 43-54. 2004.

Lumsden W H R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49(1), 33-57, 1955.

Lyra P P R, Campos G S, Bandeira I D, Sardi S I, Costa, L. F M, Santos F R, Moreira, L. M. O. . Congenital chikungunya virus infection after an outbreak in Salvador, Bahia, Brazil. *AJP reports*, 6(3): e299, 2016.

Mackenzie J S, Chua K B, Daniels P W, Eaton B T, Field H E, Hall R A, McMinn P. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerging infectious diseases*. 7 (3): 497, 2001.

Manimunda S P, Vijayachari P, Uppoor R, Sugunan A P, Singh S S, Rai S K, Guruprasad D R. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*.104(6): 392-399, 2010.

Mark G Lewis, Stephen Higgs, Michael G Rossmann, Srinivas Rao, Gary J N. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nature medicine*. 16 (3): 334-338, 2010.

Mattar S, Miranda J, Pinzon H, Tique V, Bolaño A, Aponte J, Alvarez J. Outbreak of Chikungunya virus in the north Caribbean area of Colombia: clinical presentation and phylogenetic analysis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9 (10): 1126-1132, 2015.

Melton J V et al. Alphavirus 6K proteins form ion channels. *Journal of Biological Chemistry*. 277(49): 46923-46931, 2002.

Metz S W et al. Functional processing and secretion of Chikungunya virus E1 and E2 glycoproteins in insect cells. *Virology journal*.8 (1): 353, 2011.

Miranda-Filho D B, et al. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *American journal of public health*. 106(4): 598-600, 2016.

Montero A. Fiebre chikungunya-Una nueva amenaza global. *Medicina clínica*. 145(3): 118-123, 2015.

Ng L C, Hapuarachchi H C. Tracing the path of Chikungunya virus—evolution and adaptation. *Infection, Genetics and Evolution*. 10(7): 876-885, 2010.

Ng L F P et al. IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PloS one*. 4 (1): 4261, 2009.

Nunes M R T, Faria N R, Vasconcelos J M, Golding N, Kraemer M U, Oliveira L F, Carvalho V L. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine*. 13 (1): 102, 2015.

Oliveira R D M A B, de Almeida Barreto F K, Maia A M P C, Gomes I P, Simião A R, Barbosa R B, Cavalcante J W. Maternal and infant death after probable vertical transmission of chikungunya virus in Brazil—case report. *BMC infectious diseases*, 18(1), 333. 2018

Pabbaraju K, Wong S, Gill K, Fonseca K, Tipples G A, Tellier R. Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *Journal of Clinical Virology*. 83: 66-71, 2016.

PAHO. Pan American Health Organization (a). <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=33991&Itemid=270](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=33991&Itemid=270)> 2016. Acesso dia: 01/07/2017.

PAHO. Pan American Health Organization (b). <[www.paho.org/aedes-aegypti-infograph&itemid=41735&lang=pt](http://www.paho.org/aedes-aegypti-infograph&itemid=41735&lang=pt)>2016. Acesso dia: 20/05/17.

Park E & Griffin D E. The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology*, 388(2): 305-314, 2009.

Parola P, Lamballerie X, Jourdan J, Rovey C, Vaillant V, Minodier P, Charrel R N. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerging infectious diseases*. 12 (10):1493, 2006.

Passi G R, Khan Y Z & Chitnis D S. Chikungunya infection in neonates. *Indian pediatrics*, (45) : 3 2008.

Pastorino B, Muyembe-Tamfum J J, Bessaud M, Tock F, Tolou H, Durand J P, Peyrefitte, C. N. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *Journal of medical virology*. 74(2): 277-282, 2004.

Patel P, Wahed A A, Faye O, Prüger P, Kaiser M, Thaloengsok S, Sall A A. A field-deployable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of the Chikungunya virus. *PLoS neglected tropical diseases*. 10 (9): 0004953, 2016.

Patterson J, Maura S, Manish G. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *Western Journal of Emergency Medicine* 17 (6): 671, 2016.

Paul, WE. Evolution of the Immune System. Cap. 3. *Fundamental Immunology*, 2008.

Pehrson J R & Fuji R N. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic acids research*, 26(12): 2837-2842, 1998.

Perera R, Owen K E, Tellinghuisen T L, Gorbalenya A E, Kuhn R J. Alphavirus nucleocapsid protein contains a putative coiled coil  $\alpha$ -helix important for core assembly. *Journal of virology*. 75(1): 1-10, 2001.

Peyrefitte C N, Bessaud M, Pastorino B A, Gravier P, Plumet S, Merle O L, Ollivier L. Circulation of Chikungunya virus in Gabon, 2006–2007. *Journal of medical virology*. 80 (3): 430-433, 2008.

Pfeffer M, Linssen B, Parker M D, Kinney R M. Specific detection of Chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. *Zoonoses and Public Health*. 49 (1): 49-54, 2002.

Phommanivong V, Kanda S, Shimono T, Lamaningao P, Darcy A W, Mishima N, Nishiyama T. Co-circulation of the dengue with chikungunya virus during the 2013 outbreak in the southern part of Lao PDR. *Tropical medicine and health*, 44 (1): 24, 2016.

Pialoux G, Gaüzère B A, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet infectious diseases* 7(5): 319-327, 2007.

Powers A M & Logue C H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*. 88(9): 2363-2377, 2007.

Powers A M, Brault A C, Shirako Y, Strauss E G, Kang W, Strauss J H, Weaver S C. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. *Journal of Virology*. 75 (21): 10118-10131, 2001.

Powers A M, Brault A C, Tesh R B, Weaver S C. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology*. 81(2): 471-479, 2000.

Presti A L, Ciccozzi M, Cella E, Lai A, Simonetti F R, Galli M, Rezza G. Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infection, Genetics and Evolution*. 12 (2): 392-398, 2012.

Ramful D, Carbonnier M, Pasquet M, Bouhmani B, Ghazouani J, Noormahomed T, Alessandri, J. L.. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. *The Pediatric infectious disease journal*. 26 (9): 811-815, 2007.

Ramos R, Viana R, Brainer-Lima A, FloreÂncio T, Carvalho M D, Linden V, Medeiros F. Perinatal Chikungunya Virus-associated Encephalitis Leading to Postnatal-Onset Microcephaly and Optic Atrophy. *The Pediatric infectious disease journal*, (37) : 1, 94-95, 2018.

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A C, Panning M, Silvi G. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *The Lancet*. 370 (9602): 1840-1846, 2007.

Robillard P Y, Boumahni B, Gérardin P, Michault A, Fourmaintraux A, Schuffenecker I, Barau G. Transmission verticale materno-fœtale du virus chikungunya: Dix cas observés sur l'île de la Réunion chez 84 femmes enceintes. *La Presse Médicale*. 35 (5): 785-788, 2006.

Robin S, Ramful D, Zettor J, Benhamou L, Jaffar-Bandjee M C, Rivière J P, Alessandri J L. Severe bullous skin lesions associated with Chikungunya virus infection in small infants. *European journal of pediatrics*. 169 (1): 67, 2010.

Robinson M C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 49(1), 28-32, 1955.

Rodríguez-Nieves M, García-García I, García-Fragoso L. Perinatally Acquired Chikungunya Infection: The Puerto Rico Experience. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 35 (10): 1163, 2016.

Ross R W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *Journal of Hygiene*, 54(02): 177-191, 1956.

Salonen A, Vasiljeva L, Merits A, Magden J, Jokitalo E, Kääriäinen L. Properly folded nonstructural polyprotein directs the Semliki Forest virus replication complex to the endosomal compartment. *Journal of virology*. 77(3): 1691-1702, 2003.

Sam, J I. Chikungunya virus infection. 264, 2006.

Sánchez-Seco M P, Negredo A I, Puente S, Pinazo M J, Shuffenecker I, Tenorio A, Ory F. Diagnóstico microbiológico del virus chikungunya importado en España (2006–2007): detección de casos en viajeros. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27 (8): 457-461, 2009.

Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, Arenzana-Seisdedos F. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 207 (2): 429-442, 2010.

Schuffenecker I, Itean I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney M C, Biscornet L. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*. 3 (7): 263, 2006.

Schwartz O & Albert M L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (7), 491-500, 2010.

Sergon K, Njuguna C, Kalani R, Ofula V, Onyango C, Konongoi L S, Njenga M K. Seroprevalence of chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 78 (2): 333-337, 2008.

Shrinet J, Jain S, Jain J, Bhatnagar R K, Sunil S. Next generation sequencing reveals regulation of distinct *Aedes* microRNAs during chikungunya virus development. *PLoS Negl Trop Dis*. 8 (1): 2616, 2014.

Silva L A & Dermody T S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *The Journal of clinical investigation*. 127 (3): 737-749, 2017.

Simizu B, Yamamoto K, Hashimoto K, Ogata T. Structural proteins of Chikungunya virus. *Journal of virology*. 51(1): 254-258, 1984.

Simon F, Savini H, Parola P. Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. *Medical Clinics of North America*. 92 (6): 1323-1343, 2008.

Singh S K & Unni S K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Reviews in medical virology*. 21 (2): 78-88, 2011.

Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K, Renault P, Moschetti F, Ledrans M, Pierre V. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl Trop Dis*. 3 (3): 389, 2009.

Smith S A, Silva L A, Fox J M, Flyak A I, Kose N, Sapparapu G, Swayne S. Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against chikungunya virus. *Cell host & microbe*. 18 (1): 86-95, 2015.

Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*. 393 (2): 183-197, 2009.

Soumahoro M K, Gerardin P, Boelle P Y, Perrau J, Fianu A, Pouchot J, Hanslik T. Impact of Chikungunya virus infection on health status and quality of life: a retrospective cohort study. *PLoS One*. 4 (11): 7800, 2009.

Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Frenkiel M P. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog*. 3(6): 89, 2007.

Souza T M A, Azeredo E L, Badolato-Corrêa J, Damasco P V, Santos C, Petitinga-Paiva F, Faria N R C. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS currents*. 9, 2017.

Spuul P, Balistreri G, Kääriäinen L, Ahola T. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *Journal of virology*. 84 (15): 7543-7557, 2010.

Strauss J H & Strauss E G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*. 58(3): 491-562, 1994.

Suhrbier Andreas, Jaffar-Bandjee Marie-Christine, Gasque, Philippe. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nature Reviews Rheumatology*, 8 (7): 420-429, 2012.

Sy A K, Saito-Obata M, Medado I A, Tohma K, Dapat C, Segubre-Mercado E, Tandoc A, Lupisan S, Oshitani H. Molecular characterization of chikungunya virus, Philippines, 2011–2013. *Emerging infectious diseases*. 22 (5): 887, 2016.

Taubitz W, Cramer JP, Kapaun A, Pfeffer M, Drosten C, Dobler G, Burchard GD, Löscher T. Chikungunya fever in travelers: clinical presentation and course. *Clinical Infectious Diseases* 45 (1): e1-e4, 2007.

Teng TS, Kam YW, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng LC, Ng LF. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute Chikungunya virus infection. *Journal of Infectious Diseases*. 211 (12): 1925-1935, 2015.

Teo TH, Lum FM, Lee WW, Ng LF. Mouse models for Chikungunya virus: deciphering immune mechanisms responsible for disease and pathology. *Immunologic research*. 53 (1-3): 136-147, 2012.

Thiberville SD, Moyen N, Dupuis-Maguiraga L, Nougairede A, Gould EA, Roques P, Lamballerie X. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral research*. (3): 345-370, 2013.

Tomasello D, & Schlagenhauf P. Chikungunya and dengue autochthonous cases in Europe, 2007–2012. *Travel medicine and infectious disease*. 11(5): 274-284, 2013.

Tournebise P, Charlin C, Lagrange M. Manifestations neurologiques du chikungunya: à propos de 23 cas colligés à la Réunion. *Revue Neurologique*. 165 (1): 48-51, 2009.

Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLOS pathogen*. 3 (12): 201, 2007.

Utt A, Quirin T, Saul S, Hellström K, Ahola T, Merits A. Versatile trans-replication systems for chikungunya virus allow functional analysis and tagging of every replicase protein. *PloS One*. 11 (3): 0151616, 2016.

Van Duijl-Richter MK, Hoornweg TE, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. Early Events in Chikungunya Virus Infection—From Virus CellBinding to Membrane Fusion. *Viruses*. 7 (7): 3647-3674, 2015.

Van Kooyk Y & Rabinovich G A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology*, 9(6): 593-601, 2008.

Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq JS, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux AB. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit

different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PloS One*. 2 (11): 1168, 2007.

Villamil-Gómez W, Alba-Silvera L, Menco-Ramos A, Gonzalez-Vergara A, Molinares-Palacios T, Barrios-Corrales M, Rodríguez-Morales AJ. Congenital chikungunya virus infection in Sincelejo, Colombia: a case series. *Journal of tropical pediatrics*. 51, 2015.

Villoing S, Béarzotti M, Chilmonczyk S, Castric J, Brémont M. Rainbow trout sleeping disease virus is an atypical alphavirus. *Journal of virology*. 74 (1): 173-183, 2000.

Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, Maharaj PD, Brault AC, Weaver SC. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *Journal of virology*. 84 (13): 6497-6504, 2010.

Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G, Rey FA. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 468 (7324): 709-712, 2010.

Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases*. 58: 69-76, 2017.

Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *Journal of Infectious Diseases*. 204 (1): 115-123, 2010.

Weber C, Büchner S M, Schnierle B S. A small antigenic determinant of the Chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(4): 3684, 2015.

Weinbren M P, Haddow A J, Williams M C. The occurrence of chikungunya virus in Uganda I. Isolation from mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 52 (3): 253-262, 1958.

WHO. World Health Organization. Media centre chikungunya fact sheet. Disponível em: <[www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/)> Acesso: 07/05/2017.

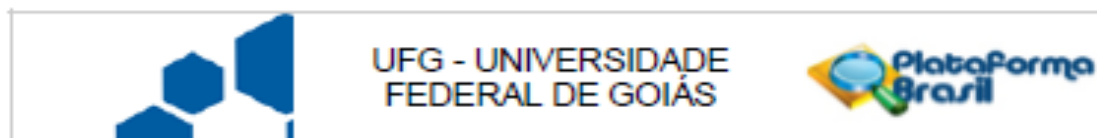
Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, Sathe PS, Sudeep AB, Gandhe SS, Gokhle MD, Jacob GP, Hundekar SL, Mishra AC.. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerging infectious diseases*. 12 (10): 1580, 2006.

Zeller H, Van Bortel W, Sudre B. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014. *Journal of Infectious Diseases*. 214(5): 436-440, 2016.

Ziegler SA, Lu L, da Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB.. An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 79 (1): 133-139, 2008.

## ANEXOS

### Anexo 01: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa daUFG.



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Aspectos epidemiológicos, clínicos, virológicos e imunológicos da Infecção pelo Zika vírus em Goiás.

**Pesquisador:** Marília Dalva Turchi

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 64534017.7.0000.5083

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Goiás - UFG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.987.434

##### Apresentação do Projeto:

A presente proposta de pesquisa está estruturada em dois subprojetos direcionados para a investigação dos aspectos clínico-epidemiológicos, virológicos e de imunidade humoral relacionados com a Infecção pelo Zika vírus (ZIKV) em Goiás, a saber:

Subprojeto 1: Risco de ocorrência da síndrome de zika Congênita e caracterização do zika vírus em gestantes, no Estado de Goiás.

Subprojeto 2: Investigação genômica e proteômica do vírus zika em área com co- circulação de arbovirus.

##### Objetivo da Pesquisa:

Subprojeto 1: Estimar o risco de desfechos desfavoráveis na gestação e de alterações congênitas nos conceitos de gestantes expostas ao Zika vírus (ZIKV).

Subprojeto 2: Investigar o perfil genômico, filodinâmico e proteômico do vírus zika isolado a partir de amostras biológicas de pacientes atendidos em unidades de saúde, caracterizadas como unidades de vigilância sentinela para arboviroses, em Goiânia, Goiás.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores, no subprojeto 1 os procedimentos preconizados fazem parte

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

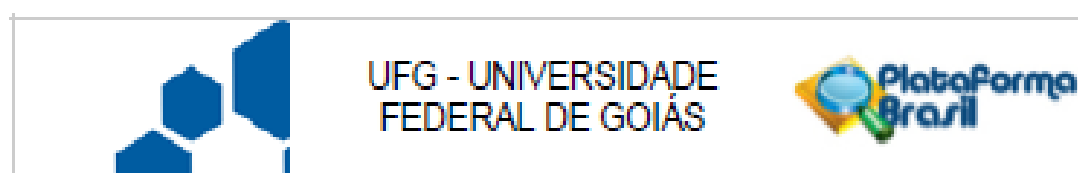
UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.987.434

das recomendações do Ministério da Saúde para diagnóstico e acompanhamento de gestantes e recém-nascidos com suspeita de Infecção pelo ZIKV e não trazem riscos às gestantes e seus conceitos. As gestantes serão orientadas sobre todos os procedimentos propostos, de forma a minimizar potenciais riscos a relacionados com stress emocional. Poderá ocorrer eventual risco de hematomas (manchas roxas) em local de punção para coleta de sangue., mas isso está destacado no projeto. O questionário não envolve perguntas que possam causar constrangimento a participante. Sub projeto 2: Eventual risco de hematomas (manchas roxas) em local de punção para coleta de sangue, o que também está destacado no projeto. Quanto aos benefícios:

Subprojeto 1. Além dos cuidados preconizados na rotina de atendimento, as gestantes e os conceitos receberão cuidados adicionais relacionados as visitas periódicas e exames complementares. Os participantes receberão orientações e explicações adicionais sobre Infecção pelo Zika virus e suas repercussões. Os participantes serão orientados por profissionais de saúde, devidamente preparados para essa finalidade. Os participantes também receberão todos os resultados dos seus exames, juntamente com orientações específicas. Subprojeto 2. Investigação será realizada dentro do contexto de vigilância virológica. Os exames laboratoriais a serem realizados pela presente proposta, referentes à investigação molecular dos arbovirus pesquisados representará um retorno prático e direto aos órgãos de gestão e em especial à população diretamente afetada, por meio da entrega dos resultados obtidos.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

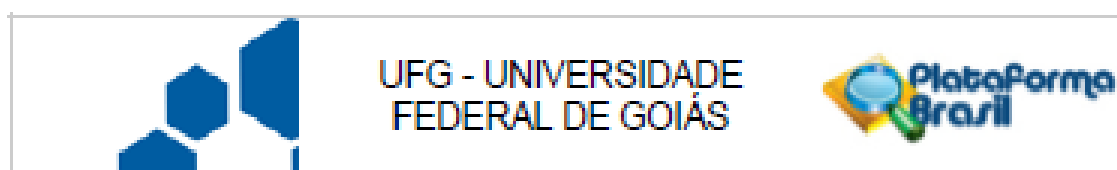
Trata-se de um estudo que visa investigar os aspectos epidemiológicos, clínicos, virológicos e imunológicos da Infecção pelo vírus zika em Goiás, o qual está subdividido em dois estudos (subprodutos).

No subprojeto 1 serão analisadas, de forma retrospectiva e prospectiva, gestantes com doença exantemática sugestiva de Infecção pelo ZIKV, identificadas a partir das notificações para a Secretaria Municipal de Goiânia (SMS) e Secretaria de Estado da Saúde de Goiás (SES). Amostra estimada em 1.000 gestantes com doença exantemática durante a gestação

Período para inclusão será: a) retrospectivo: janeiro de 2016 a março de 2017; b) prospectivo: abril de 2017 a fevereiro de 2019.

As participantes serão acompanhadas desde o aparecimento do quadro exantemático até o final da gestação (abortamento ou parto). Os recém-nascidos de mulheres participantes do estudo serão acompanhados até o final do período neonatal (28 dias de vida). As gestantes serão acompanhadas nos serviços de saúde onde realizarem o pré-natal de rotina. Coleta de dados e de material biológico (sangue, urina e saliva) fora dos períodos previstos das consultas de pré-natal.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-070  
 UF: GO Município: GOIÂNIA  
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.607.434

serão realizadas no domicílio da gestante. Coleta de dados e de material biológico da participante e do conceito serão coletados nos hospitais/maternidades onde ocorrer o parto ou abortamento.

Seguimento e coleta de dados e de material biológico ocorrerá durante o período gestacional. As participantes responderam a um questionário sobre a condição sócio demográfica e características da infecção e será realizada pelo menos duas ultrassonografias. Com relação ao conceito, logo após o nascimento serão coletados dados clínicos e amostras de sangue de cordão, sangue periférico e fragmentos de placenta. Quando houver indicação clínica, será realizada coleta de líquor cefalorraquidiano. Será realizado ultrassom (US) transfontanela para todos os RN e tomografia de crânio (TC) ou Ressonância Magnética (RM) para os RN que apresentarem alterações neurológicas. Fetos ou natimortos serão coletados fragmentos de vísceras.

Para o grupo de gestantes com doença exantemática notificadas entre janeiro de 2016 a março de 2017 (coorte retrospectiva) serão utilizados dados secundários (SINAN, SINASC e revisão de prontuários e entrevistas).

O TCLE está adequado, bem estruturado e contempla todos os itens das diretrizes éticas. A recomendação de que o TCLE e TALE estivessem em papel timbrado foi atendida.

O subprojeto 2 avaliará participantes com suspeita clínica de Infecção pelo vírus Zika (quadro exantemático agudo), atendidos em unidades da rede pública de saúde do município de Goiânia, Goiás. Serão incluídos participantes da demanda espontânea de unidades de saúde, consideradas como unidades de vigilância sentinela pela SMS, atendidos entre abril de 2017 a junho de 2020. Os participantes serão atendidos na rotina dos serviços de saúde e em consonância com as diretrizes e protocolos do Ministério da Saúde e da SMS de Goiânia. O preenchimento da ficha de notificação/investigação será feito por profissional de saúde da unidade notificadora. Este subprojeto é uma parceria estabelecida por meio de um Termo de Cooperação Técnica entre a Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, Goiás e o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Por se tratar de um estudo desenvolvido em cooperação com a Secretaria Municipal de Saúde, o pesquisador solicita a dispensa do uso do TCLE, uma vez que as amostras a serem coletadas referem-se a pacientes atendidos na rotina dos serviços de saúde, selecionados como unidades de vigilância sentinela para arbovírus (Dengue, Chikungunya ou Zika). Sendo assim, os exames laboratoriais a serem realizados pela presente proposta, referentes à investigação molecular dos arbovírus pesquisados, constitui uma solicitação da SMS e representará um retorno prático e direto aos órgãos de gestão e em especial à população diretamente afetada, por meio da entrega dos resultados obtidos. O recrutamento das participantes será realizado em diversas unidades de saúde, entre elas o Hospital Materno Infantil, cuja anuência será enviada

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-670  
 UF: GO Município: GOIÂNIA  
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.987.434

posteriormente, segundo a pesquisadora responsável. Para as demais instituições, os termos de anuência foram apresentados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos necessários a apreciação ética foram apresentados, conforme anexo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para dezembro 2021.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                    | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|--------------------------|----------|
| Outros                                                    | Termo_Anuencia_HMI.pdf                        | 28/03/2017<br>17:28:40 | João Batista de Souza    | Acelto   |
| Informações Básicas do Projeto                            | PIB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_853158.pdf | 24/03/2017<br>14:50:51 |                          | Acelto   |
| Outros                                                    | Carta_atendimento_pendencias.pdf              | 24/03/2017<br>14:50:23 | Fabiola Souza Flaccadori | Acelto   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_maior18_Subprojeto1_Versao2.pdf          | 24/03/2017<br>14:49:18 | Fabiola Souza Flaccadori | Acelto   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TALE_menor18_Subprojeto1_Versao2.pdf          | 24/03/2017<br>14:49:03 | Fabiola Souza Flaccadori | Acelto   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Responsavel_Subprojeto1_Versao2.pdf      | 24/03/2017<br>14:48:20 | Fabiola Souza Flaccadori | Acelto   |
| Declaração de Pesquisadores                               | Termo_Compromisso.pdf                         | 08/02/2017<br>09:23:55 | Fabiola Souza Flaccadori | Acelto   |

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970

UF: GO Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.967.434

|                                                           |                                             |                     |                      |        |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------|----------------------|--------|
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | TermoAnuencia_MNC.pdf                       | 03/02/2017 11:09:20 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | TermoAnuencia_HMDI.pdf                      | 03/02/2017 11:09:07 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | TermoAnuencia_SMS.pdf                       | 03/02/2017 11:08:53 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | Cooperacao_SMSeUFG.pdf                      | 03/02/2017 11:08:24 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| Outros                                                    | Declaracao_Subprojeto1.pdf                  | 03/02/2017 11:07:41 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| Outros                                                    | Questionario_Subprojeto1.pdf                | 03/02/2017 11:06:40 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Justificativa_DispensaTCLE_Subprojeto 2.pdf | 03/02/2017 11:05:14 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto.pdf                                 | 03/02/2017 11:02:17 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |
| Folha de Rosto                                            | Folha_Rosto.pdf                             | 03/02/2017 11:01:48 | Marilia Dalva Turchi | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 28 de Março de 2017

Assinado por:  
João Batista de Souza  
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131  
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970  
UF: GO Município: GOIANIA  
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpl.ufg@gmail.com

**Anexo 02:** Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE) para gestantes menores de dezoito anos:



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pesquisa: coorte de gestantes com exantema

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada “Risco de ocorrência da síndrome de zika Congênita e caracterização do zika virus em gestantes, no estado de Goiás”. Meu nome é Marília Dalva Tuchi, sou médica e pesquisadora responsável, minha área de atuação é em doenças infecciosas. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizada de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas, via e-mail [pesquisa.gestantes@gmail.com](mailto:pesquisa.gestantes@gmail.com) ou sob forma de ligação a cobrar, através do seguinte contato telefônico (62) 3209-6122. Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215.

**1. Informações sobre a Pesquisa:**

Essa pesquisa tem por objetivo investigar as consequências da infecção pelo Zika vírus durante a gestação e o risco de desenvolvido de malformações congênitas, nos recém-nascidos.

O Zika vírus é habitualmente transmitido pela picada de um mosquito. O mesmo mosquito que transmite dengue e chikungunya. Os sintomas mais comuns da infecção pelo Zika vírus são febre, manchas no corpo, dor no corpo, dor nas juntas e olhos avermelhados, mas a maioria das pessoas não apresentam nenhum sintoma. Quando a infecção pelo Zika

vírus acontece durante a gestação a criança tem risco de nascer com alguns problemas de saúde, incluindo microcefalia. A microcefalia significa que a cabeça do recém-nascido é menor do que a de outros da mesma idade e sexo.

### **Procedimentos:**

Ao participar dessa pesquisa, nesse primeiro momento, você vai precisar responder a um questionário com perguntas sobre essa gravidez, medicamentos que usou durante esse período, as condições em que você vive, características do exantema (manchas vermelhas) no corpo, ou outros problemas de saúde que você tem ou teve.

Vai ser necessário coletar sangue de sua veia e urina para fazer o exame do vírus Zika e outros vírus transmitidos por mosquitos. O exame de sangue vai ser feito usando agulha e tubo de coleta descartáveis. Serão coletados 20 ml (que corresponde a duas colheres de sopa) de sangue. Esse procedimento pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada (hematoma). Será coletado 20 ml de urina em recipiente estéril, quando do início da sua participação no estudo. A coleta de urina não causa nenhuma dor ou desconforto.

Será realizado exame de ultrassonografia abdominal. Esse exame faz parte do acompanhamento rotineiro do pré-natal de gestantes. São recomendadas duas ultrassonografias, uma no início e outra no final da gravidez. Caso ainda não tenham sido realizadas, serão providenciadas pela pesquisa.

Você fará as suas consultas habituais na rotina do seu pré-natal. Adicionalmente, à partir da primeira entrevista, uma vez a cada três meses e no final da gestação, você será procurada pela equipe de pesquisa para responder alguns questões sobre a evolução da gestação, sobre medicamentos que usou, sobre problemas de saúde que você teve e sobre o parto e o recém-nascido.

O parto e o atendimento do seu bebê serão feitos na rotina dos serviços de saúde. Após o parto, será realizado um exame de ultrassonografia e exame de tomografia da cabeça do seu bebê. Também será necessário coletar 2ml sangue e 2ml de urina do bebê nas primeiras 24h de vida. A coleta de sangue pode causar um desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor

da picada (hematoma). A coleta de urina pode causar um pequeno desconforto local. Esses procedimentos fazem parte das recomendações do Ministério da Saúde para acompanhamento dos recém-nascidos de mães com suspeita de zika.

Ao participar da pesquisa, você tem garantido os seguintes direitos:

1. De ter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. De retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e isso não vai implicar em prejuízo de qualquer natureza para sua pessoa, seu bebê ou seus familiares.
3. Da segurança que você e seu bebê não serão identificados de nenhuma forma e garantindo a sua privacidade.
4. De que a sua participação na pesquisa é realizada de forma voluntária, ou seja, não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação em adesão à mesma.
5. De ter as entrevistas realizadas por pessoal treinado, em local privativo, com perguntas feitas de modo a não causar constrangimento.
6. De não assumir qualquer despesa ao participar da pesquisa.
7. De saber os resultados dos exames feitos na amostra de urina e sangue da senhora. Os resultados desses exames serão entregues pessoalmente e não serão passados para outras pessoas. Caso o exame indique que você já teve Zika ou outra infecção viral, um dos membros da equipe de pesquisadores ou um dos profissionais de saúde do serviço fornecerá orientações sobre os resultados dos exames e as formas de prevenir uma nova infecção.
8. De ter garantido que, caso você seja diagnosticada com outras doenças ou agravos no momento da pesquisa, você será encaminhada para os serviços especializados.
9. De pleitear indenização diante de eventuais danos decorrentes de sua participação na pesquisa

Finalmente, solicitamos sua autorização para que o questionário respondido por você passe a fazer parte do banco de dados da pesquisa e que amostras biológicas possam ser estocadas no banco de amostras, sob a nossa guarda e que possam ser utilizadas em estudos de pesquisa médica ou educacional futuros, respeitando as mesmas garantias acima.

No caso de novos estudos serem planejados com a utilização de seu material biológico armazenado, a sua escolha é:

☐ Solicito novo contato para autorizar

☐ Autorizo a utilização do material guardado em outras pesquisa, sem necessidade de novo consentimento.

Se você concordar em participar desse estudo, pedimos que assine este documento, em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, afirmando que entendeu as explicações e que está de acordo.

Eu, ....., inscrita sob o RG ou CPF ....., abaixo assinado, concordo em participar do estudo acima descrito. Informo ter entre 15 e 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informada e esclarecida, pelo pesquisador responsável, sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, ..... de ..... de .....

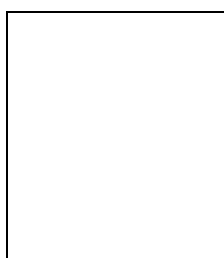
---

Assinatura por extenso do(a) participante

---

Assinatura por extenso do (a) pesquisador(a) responsável

Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica



---

---

**Anexo 03:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os responsáveis:



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pesquisa: coorte de gestantes com exantema

A menor, pela qual você é responsável, está sendo convidada a participar como voluntária, da pesquisa intitulada “Risco de ocorrência da síndrome de zika Congênita e caracterização do zika virus em gestantes, no estado de Goiás”. Meu nome é Marília Dalva Turchi, sou médica e pesquisadora responsável, minha área de atuação é em doenças infecciosas. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você concordar com a participação da gestante pela qual é responsável, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável. Esclareço que em caso de recusa na autorização da participação da menor, esta não será penalizada de forma alguma. Mas se concordar com a participação da menor, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas, via e-mail [pesquisa.gestantes@gmail.com](mailto:pesquisa.gestantes@gmail.com) ou sob forma de ligação a cobrar, através do seguinte contato telefônico (62) 3209-6122. Ao persistirem as dúvidas *sobre os direitos* da participante da pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215.

**1. Informações sobre a Pesquisa:**

Essa pesquisa tem por objetivo investigar as consequências da infecção pelo Zika vírus durante a gestação e o risco de desenvolvido de malformações congênitas, nos recém-nascidos.

O Zika vírus é habitualmente transmitido pela picada de um mosquito. O mesmo mosquito que transmite dengue e chikungunya. Os sintomas mais comuns da infecção pelo Zika vírus são febre, manchas no corpo, dor no corpo, dor nas juntas e olhos avermelhados,

mas a maioria das pessoas não apresentam nenhum sintoma. Quando a infecção pelo Zika vírus acontece durante a gestação a criança tem risco de nascer com alguns problemas de saúde, incluindo microcefalia. A microcefalia significa que a cabeça do recém-nascido é menor do que a de outros da mesma idade e sexo.

### **Procedimentos:**

Ao participar dessa pesquisa, nesse primeiro momento, a gestante com seu auxílio vai precisar responder a um questionário com perguntas sobre essa gravidez, medicamentos que usou durante esse período, as condições em que vive, características do exantema (manchas vermelhas) no corpo, ou outros problemas de saúde que a mesma tem ou teve.

Vai ser necessário coletar sangue e urina para fazer o exame do vírus Zika e outros vírus transmitidos pelo mosquito. A coleta de sangue vai ser feito usando agulha e tubo de coleta descartáveis. Serão coletados 20 mL (que corresponde a duas colheres de sopa) de sangue. Esse procedimento pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada (hematoma). Será coletado 20 mL de urina em recipiente estéril, quando do início da participação no estudo. A coleta de urina não causa nenhuma dor ou desconforto.

Será realizado exame de ultrassonografia abdominal. Esse exame faz parte do acompanhamento rotineiro do pré-natal de gestantes. São recomendadas duas ultrassonografias, uma no início e outra no final da gravidez. Caso ainda não tenham sido realizadas, serão providenciadas pela pesquisa.

A gestante fará as suas consultas habituais na rotina do seu pré-natal. Adicionalmente, à partir da primeira entrevista, uma vez a cada três meses e no final da gestação, a gestante será procurada pela equipe de pesquisa para responder alguns questões sobre a evolução da gestação, sobre medicamentos que usou, sobre problemas de saúde que teve e sobre o parto e o recém-nascido.

O parto e o atendimento do bebê serão feitos na rotina dos serviços de saúde. Após o parto, será realizado um exame de ultrassonografia e exame de tomografia da cabeça do bebê. Também será necessário coletar 2mL sangue e 2mL de urina do bebê

nas primeiras 24h de vida. A coleta de sangue pode causar um desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada (hematoma). A coleta de urina pode causar um pequeno desconforto local. Esses procedimentos fazem parte das recomendações do Ministério da Saúde para acompanhamento dos recém-nascidos de mães com suspeita de zika.

Ao participar da pesquisa, a gestante tem garantido os seguintes direitos:

1. De ter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. De retirar o consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e isso não vai implicar em prejuízo de qualquer natureza para a gestante, seu bebê ou seus familiares.
3. Da segurança que a gestante e seu bebê não serão identificados de nenhuma forma e garantindo a privacidade.
4. De que a participação da gestante na pesquisa é realizada de forma voluntária, ou seja, não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação em adesão à mesma.
5. De ter as entrevistas realizadas por pessoal treinado, em local privativo, com perguntas feitas de modo a não causar constrangimento.
6. De não assumir qualquer despesa ao participar da pesquisa.
7. De saber os resultados dos exames feitos na amostra de urina e sangue. Os resultados desses exames serão entregues pessoalmente e não serão passados para outras pessoas. Caso o exame indique que a gestante já teve Zika ou outra infecção viral, um dos membros da equipe de pesquisadores ou um dos profissionais de saúde do serviço fornecerá orientações sobre os resultados dos exames e as formas de prevenir uma nova infecção.
8. De ter garantido que, caso a gestante seja diagnosticada com outras doenças ou agravos no momento da pesquisa, ela será encaminhada para os serviços especializados.
9. De pleitear indenização diante de eventuais danos decorrentes da participação na pesquisa.

Finalmente, solicitamos sua autorização para que o questionário respondido pela gestante pela qual você é responsável passe a fazer parte do banco de dados da pesquisa e que amostras biológicas possam ser estocadas no banco de amostras, sob a nossa guarda e que possam ser utilizadas em estudos de pesquisa médica ou educacional futuros, respeitando as mesmas garantias acima.

No caso de novos estudos serem planejados com a utilização do material biológico armazenado, a sua escolha é:

☐ Solicito novo contato para autorizar

☐ Autorizo a utilização do material guardado em outras pesquisa, sem necessidade de novo consentimento.

**Consentimento do responsável pela gestante participante da pesquisa**

Eu, ....., inscrito(a) sob o RG ou CPF ....., responsável pela gestante participante da pesquisa ....., abaixo assinado, autorizo a sua participação na pesquisa acima descrita. Fui, ainda, devidamente informado(a) e esclarecido (a), pela pesquisadora responsável ....., sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação da gestante no estudo. Foi-me garantido que posso retirar minha autorização a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo e autorizo a participação da gestante no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, ..... de ..... de .....

---

Assinatura por extenso do responsável pela gestante participante

---

Assinatura por extenso do (a) pesquisador(a) responsável

**Anexo 04:** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para gestantes maiores de dezoito anos:



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Pesquisa: coorte de gestantes com exantema

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa intitulada “Risco de ocorrência da síndrome de zika Congênita e caracterização do zika virus em gestantes, no estado de Goiás”. Meu nome é Marília Dalva Tuchi, sou médica e pesquisadora responsável, minha área de atuação é em doenças infecciosas. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizada de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas, via e-mail [pesquisa.gestantes@gmail.com](mailto:pesquisa.gestantes@gmail.com) ou sob forma de ligação a cobrar, através do seguinte contato telefônico (62) 3209-6122. Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215.

**1. Informações sobre a Pesquisa:**

Essa pesquisa tem por objetivo investigar as consequências da infecção pelo Zika vírus durante a gestação e o risco de desenvolvido de malformações congênitas, nos recém-nascidos.

O Zika vírus é habitualmente transmitido pela picada de um mosquito. O mesmo mosquito que transmite dengue e chikungunya. Os sintomas mais comuns da infecção pelo Zika vírus são febre, manchas no corpo, dor no corpo, dor nas juntas e olhos avermelhados, mas a maioria das pessoas não apresentam nenhum sintoma. Quando a infecção pelo Zika

vírus acontece durante a gestação a criança tem risco de nascer com alguns problemas de saúde, incluindo microcefalia. A microcefalia significa que a cabeça do recém-nascido é menor do que a de outros da mesma idade e sexo.

**Procedimentos:**

Ao participar dessa pesquisa, nesse primeiro momento, você vai precisar responder a um questionário com perguntas sobre essa gravidez, medicamentos que usou durante esse período, as condições em que você vive, características do exantema (manchas vermelhas) no corpo, ou outros problemas de saúde que você tem ou teve.

Vai ser necessário coletar sangue de sua veia e urina para fazer o exame do vírus Zika e outros vírus transmitidos por mosquitos. O exame de sangue vai ser feito usando agulha e tubo de coleta descartáveis. Serão coletados 20 ml (que corresponde a duas colheres de sopa) de sangue. Esse procedimento pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada (hematoma). Será coletado 20 ml de urina em recipiente estéril, quando do início da sua participação no estudo. A coleta de urina não causa nenhuma dor ou desconforto.

Será realizado exame de ultrassonografia abdominal. Esse exame faz parte do acompanhamento rotineiro do pré-natal de gestantes. São recomendadas duas ultrassonografias, uma no início e outra no final da gravidez. Caso ainda não tenham sido realizadas, serão providenciadas pela pesquisa.

Você fará as suas consultas habituais na rotina do seu pré-natal. Adicionalmente, à partir da primeira entrevista, uma vez a cada três meses e no final da gestação, você será procurada pela equipe de pesquisa para responder alguns questões sobre a evolução da gestação, sobre medicamentos que usou, sobre problemas de saúde que você teve e sobre o parto e o recém-nascido.

O parto e o atendimento do seu bebê serão feitos na rotina dos serviços de saúde. Após o parto, será realizado um exame de ultrassonografia e exame de tomografia da cabeça do seu bebê. Também será necessário coletar 2ml sangue e 2ml de urina do bebê

nas primeiras 24h de vida. A coleta de sangue pode causar um desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada (hematoma). A coleta de urina pode causar um pequeno desconforto local. Esses procedimentos fazem parte das recomendações do Ministério da Saúde para acompanhamento dos recém-nascidos de mães com suspeita de zika.

Ao participar da pesquisa, você tem garantido os seguintes direitos:

1. De ter resposta a qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. De retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, e isso não vai implicar em prejuízo de qualquer natureza para sua pessoa, seu bebê ou seus familiares.
3. Da segurança que você e seu bebê não serão identificados de nenhuma forma e garantindo a sua privacidade.
4. De que a sua participação na pesquisa é realizada de forma voluntária, ou seja, não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação em adesão à mesma.
5. De ter as entrevistas realizadas por pessoal treinado, em local privativo, com perguntas feitas de modo a não causar constrangimento.
6. De não assumir qualquer despesa ao participar da pesquisa.
7. De saber os resultados dos exames feitos na amostra de urina e sangue da senhora. Os resultados desses exames serão entregues pessoalmente e não serão passados para outras pessoas. Caso o exame indique que você já teve Zika ou outra infecção viral, um dos membros da equipe de pesquisadores ou um dos profissionais de saúde do serviço fornecerá orientações sobre os resultados dos exames e as formas de prevenir uma nova infecção.
8. De ter garantido que, caso você seja diagnosticada com outras doenças ou agravos no momento da pesquisa, você será encaminhada para os serviços especializados.
9. De pleitear indenização diante de eventuais danos decorrentes de sua participação na pesquisa

Finalmente, solicitamos sua autorização para que o questionário respondido por você passe a fazer parte do banco de dados da pesquisa e que amostras biológicas possam ser estocadas no banco de amostras, sob a nossa guarda e que possam ser utilizadas em estudos de pesquisa médica ou educacional futuros, respeitando as mesmas garantias acima.

No caso de novos estudos serem planejados com a utilização de seu material biológico armazenado, a sua escolha é:

[    ] Solicito novo contato para autorizar

[ ] Autorizo a utilização do material guardado em outras pesquisa, sem necessidade de novo consentimento.

Se você concordar em participar desse estudo, pedimos que assine este documento, em duas vias, sendo uma delas de sua propriedade, afirmando que entendeu as explicações e que está de acordo.

Eu, ....., inscrito(a) sob o RG ou CPF ....., abaixo assinado, concordo em participar do estudo acima descrito. Informo ter mais de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informada e esclarecida, pelo pesquisador responsável, sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, ..... de ..... de .....

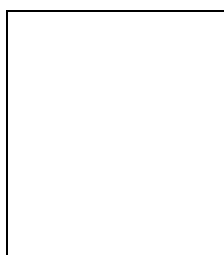
---

Assinatura por extenso do (a) participante

---

Assinatura por extenso do(a) pesquisador(a) responsável

Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica




---



---