

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

CAMILA AMATO MONTALBANO

**PERFIL METABOLÔMICO SÉRICO DE PACIENTES NA FASE
AGUDA DE CHIKUNGUNYA**

**Campo Grande
2022**

CAMILA AMATO MONTALBANO

**PERFIL METABOLÔMICO SÉRICO DE PACIENTES NA FASE
AGUDA DE CHIKUNGUNYA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obter o título de doutora em doenças infecciosas e parasitárias, sob a orientação do Prof. Dr. James Venturini.

**Campo Grande
2022**

DEDICATÓRIA

Dedico a presente obra acadêmica primeiramente a mim mesma por não ter desistido do presente estudo mesmo diante de meus problemas de saúde, crise financeira no setor universitário e pandemia do novo coronavírus. Dedico também a Deus por ter me dado forças para seguir adiante nos momentos difíceis supracitados.

Gostaria também de realizar uma dedicatória aos meus pais, parentes, amigos do grupo *Crazy friends*, meu marido, meu filho canino Blade e meu filho Breno que está prestes a nascer. Agradeço inclusive por alguns destes me apoiarem mesmo que não estivessem de acordo que eu prosseguisse com meus estudos num momento de fragilidade de saúde.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer primeiramente a meu orientador Dr. James Venturini por ter me acolhido em sua equipe, ter me auxiliado a desenvolver o projeto e ter me dado o suporte necessário para correção e finalização de meu trabalho. Agradeço também ao Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha por ter me auxiliado a encontrar soluções para os empecilhos que a crise financeira universitária e a pandemia do novo coronavírus trouxeram para a realização de meu trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pela oportunidade de realizar o curso de doutorado em doenças infecciosas e parasitárias, o qual possui nota 6 perante a CAPES, demonstrando excelência em pós-graduação. Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e a equipe do finado professor Dr. Luiz Goulart pela oportunidade de realizar minhas análises laboratoriais, cito em especial Dra. Paula Santos e Dr. Mário Martins, que me auxiliaram na realização de minhas análises laboratoriais na UFU, e Dra. Larissa Maia, que realizou as análises estatísticas. Agradeço também ao professor Dr. Luís Alcantara que me colocou em contato com o prof. Luiz Goulart e sua equipe e que também me auxiliou em algumas análises.

Agradeço as sedes da Fiocruz de Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e da Bahia pelo suporte material e laboratorial dado aos meus dados e minhas amostras.

Por fim, gostaria de agradecer a CAPES pela bolsa de estudos concedida e à Dra. Silvia Heredia que me incentivou nos estudos, me forneceu conselhos acadêmicos e me deu sugestões de como desenvolver determinadas partes de meu estudo.

“Não prometo conseguir sempre,
mas garanto não desistir nunca.”
Camila Amato Montalbano

RESUMO

Chikungunya é um arbovírus de RNA que causa artralgia debilitante de duração prolongada. O presente estudo teve como objetivo identificar o perfil metabólico sérico de pacientes durante a fase aguda da doença. Para tanto, foram incluídos 25 indivíduos com diagnóstico clínico-laboratorial para Chikungunya (CHIKV) (Grupo CHIKV+), 19 indivíduos com sintomatologia típica de chikungunya, porém com resultados laboratorial negativo para CHIKV (Grupo CHIKV-) e 15 indivíduos saudáveis (Grupo controle- CG). Os pacientes do Grupo CHIKV+ e do Grupo CHIKV- foram avaliados em dois momentos: Fase M0 (1 a 10 dias de sintomas) e Fase M1 (11 a 22 dias de sintomas). Esses pacientes foram ainda divididos em quatro subgrupos, de acordo com a intensidade da artralgia e se atingiram a cronicidade ou não: subgrupo *Hight Severity* (HS), subgrupo *Mild to Moderate Severity* (MMS), subgrupo *Cronic* (C) e subgrupo *Non cronic* (NC). As amostras séricas selecionadas foram submetidas à purificação com metanol e, em seguida, passaram pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenado ao Espectrômetro de Massa (CLAEM/EM). Por fim, foi feita a identificação dos compostos e interpretação biológica dos achados em ferramentas adequadas. Os resultados revelaram 12 compostos lipídicos sub-regulados durante o M0 no CHIKV+ em relação ao CHIKV- e ao CG, sendo que muitos destes estão envolvidos na formação de membranas celulares, as quais são importantes para cada parte dos ciclos de vida de flavivírus e togavírus, incluindo entrada, replicação, montagem e saída. Sendo assim, o CHIKV utiliza demasiadamente estes lipídios dentro das células, havendo esgotamento no soro. Dez lipídios desses mantêm seus níveis reduzidos no M1 demonstrando que o vírus continua utilizando lipídios em favor a sua perpetuação. O 17-phenyl trinor PGF2 α -AS é um biomarcador de dor do momento inicial de fase aguda e de cronificação. A sub-regulação do composto Gln Arg Phe foi identificado como biomarcador de cronicidade. A descoberta destas alterações metabólicas pode levar a elucidação de fatores da fisiopatologia da doença, sendo útil para melhor compreensão desta, o que pode melhorar o manejo dos doentes, oferecendo-lhes melhor qualidade de vida durante o tratamento e evitar as fases subseqüentes desta enfermidade.

Palavras-chave: chikungunya, fase aguda, análise metabólica.

ABSTRACT

Chikungunya is an RNA arbovirus causes long-lasting debilitating arthralgia. This study aimed to identify the serum metabolomic profile of patients during the acute phase of the disease. For that, 25 individuals with clinical and laboratory diagnosis for CHIKV (CHIKV+ Group) were included in the study. In addition, 19 suspected subjects with negative laboratory results for CHIKV (CHIKV-Group) and 15 healthy subjects (Control Group) were included in the study. Patients in the CHIKV+ Group and the CHIKV-Group were evaluated at two moments: Phase M0 (1 to 10 days of symptoms) and Phase M1 (11 to 22 days of symptoms). These patients were further divided into four subgroups, according to the arthralgia intensity and whether they reached chronicity or not: High Severity (HS) subgroup, Mild to Moderate Severity (MMS) subgroup, Chronic (C) subgroup and Non chronic subgroup (NC). Serum samples were submitted to purification with methanol and then to High Performance Liquid Chromatography hyphenated with a Mass Spectrometer (CLAEM/MS). Finally, the compounds were identified, and the findings were biologically interpreted using appropriate tools. Results revealed 12 lipid compounds downregulated during M0 in CHIKV+ compared to CHIKV- and CG, many of which are involved in the formation of cell membranes, which are important for each part of the flavivirus and togavirus life cycles, including input, replication, mount, and output. Therefore, CHIKV uses these lipids too much inside the cells, with depletion in the serum. Ten of these lipids keep their levels reduced in M1, demonstrating that the virus continues to use lipids in favor of its perpetuation. The 17-phenyl trinor PGF₂α-AS is a pain biomarker of the initial moment of acute and chronic phase. Down-regulation of the Gln Arg Phe compound was identified as a biomarker of chronicity. The discovery of these metabolic changes can lead to the elucidation of factors of the pathophysiology of the disease, being useful for a better understanding of it, which can improve the management of patients, offering them a better quality of life during treatment and avoiding the subsequent stages of this disease.

Keywords: chikungunya, acute phase, metabolomic analysis.

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ACS	Agente comunitrio de saúde
ALT:	Alanina aminotransferase
AST:	Aspartato aminotransferase
BF:	Vírus barmah forest
Bti:	<i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>
CG:	Grupo controle
CHIKV:	Vírus Chikungunya
CHIK+:	Grupo positivo para Chikungunya
CHIK-:	Grupo negativo para Chikungunya
CD₄⁺:	Grupamento de diferenciação 4 do linfócito T
CD₈⁺:	Grupamento de diferenciação 8 do linfócito T
C:	Cronic
DENV1	Sorotipo 1 do vírus dengue
DENV2	Sorotipo 2 do vírus dengue
DENV3	Sorotipo 3 do vírus dengue
DENV4	Sorotipo 4 do vírus dengue
DENV5	Sorotipo 5 do vírus dengue
ECSA:	Genótipo de CHIKV do centro, leste e sul africano
EEE:	Encefalite equina oriental
HS:	High severity
IFN-1:	Interferon tipo 1
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
IgG:	Imunoglobulina G
IgM:	Imunoglobulina M
LIO:	Genótipo de CHIKV do oceano Índico
MAYV:	Vírus mayaro
MCP-1:	Proteína quimiosttica dos monócitos tipo 1
MMS:	Mild top moderate severity
MS:	Espectrometria de massa
NC:	Non crhonic

OMS:	Organização Mundial de saúde
ONN:	Vírus o'nyon-nyon
PCR:	Reação em cadeia de polimerase
RA:	Artrite reumatoide
RMN:	Ressonância magnética nuclear
RNA:	Ácido ribonucleico
RR:	Vírus ross river
TALE:	Termo de assentimento livre e esclarecido
TCLE:	Termo de consentimento livre e esclarecido
VAS:	Escala analógica visual da dor
VHS:	Velocidade de hemossedimentação
WAf:	Genótipo de CHIKV enzoótico da África ocidental
ZIKV:	Vírus zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	Histórico da doença.....	13
2.2	Espectro da infecção.....	14
2.3	Fisiopatologia da doença.....	17
2.4	Aspectos epidemiológicos.....	19
2.5	Diagnóstico.....	21
2.6	Manejo clínico e tratamento.....	22
2.7	Metabolômica.....	26
3	JUSTIFICATIVA.....	32
4	OBJETIVOS.....	33
4.1	Objetivo geral.....	33
4.2	Objetivos específicos.....	33
5	METODOLOGIA.....	34
5.1	Tipo de estudo e localidade.....	34
5.2	Critérios de inclusão.....	34
5.3	Critérios de exclusão.....	35
5.4	População de estudo.....	35
5.5	Procedimentos do estudo.....	37
5.6	Análise metabolômica.....	39
5.6.1	Desenho do estudo metabolômico	39

		10
5.6.2	Extração dos metabólitos	40
5.6.3	CLAE/EM	41
5.7	Análise estatística	41
5.8	Considerações éticas	42
6	RESULTADOS	43
6.1	Análise metabolômica geral	43
6.2	Perfil metabolômico identificado no M0	43
6.3	Perfil metabolômico identificado no M1	53
6.4	Vias perturbadas	64
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	APÊNDICE- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	88
	ANEXO A- QUESTIONÁRIO PARA ENTREVISTA DA FASE AGUDA	91
	ANEXO B- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA	97

1 INTRODUÇÃO

Chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), o qual é um vírus de RNA, do gênero *Alphavirus* e família *Togaviridae*. O nome chikungunya significa "aquele que se curva" na língua Makonde, utilizada em parte da Tanzânia e de Moçambique. Foi dado este nome devido à posição encurvada que os doentes adotam por sofrerem de artralgia muito dolorosa, causada pela infecção (THIBERVILLE *et al.*, 2013; ROBINSON, 1953).

A fase aguda, que dura até 21 dias, se caracteriza por febre elevada, exantema maculopapular pruriginoso, cefaleia, prostração e, principalmente, a dor articular intensa e debilitante a qual é a característica mais marcante e ocorre na maioria dos acometidos (MADARIAGA *et al.*, 2015; PAHO, 2011; SIMON *et al.*, 2008; WEAVER, 2015).

O grande problema de chikungunya é que, muitas das vezes, a doença progride para fases subsequentes: pós-aguda, de 22 a 90 dias, e crônica, de três meses em diante, podendo perdurar por mais de dois anos. Nas fases pós-aguda e crônica, tende-se a extinção dos sintomas gerais, permanecendo somente artrite e artralgia. O paciente, então debilitado, apresenta dificuldades para realizar suas atividades cotidianas por todo esse período, fazendo-o recorrer várias vezes às unidades de saúde, o que gera problemas socioeconômicos para o mesmo e para a saúde pública (SIMON *et al.*, 2015).

A frequência de cronicidade da infecção por CHIKV foi relatada de maneira diferente em diversos estudos em outros países (BRASIL, 2014b; CUNHA *et al.*, 2017). Na África do Sul, 12%-18% dos pacientes tiveram sintomas persistentes de 18 meses a três anos (KUAN *et al.*, 2016). Já na Ilha africana *Réunion*, 80%-93% dos pacientes declaram ter sintomas persistentes por mais de três meses após o início da doença (SISSOKO *et al.*, 2008; THIBERVILLE *et al.*, 2013).

No Brasil, a doença foi identificada inicialmente nos estados do Amapá e Bahia, em 2014. A introdução no Amapá se deu através da Guiana Francesa e na Bahia pela cidade de Feira de Santana, através de cidadãos brasileiros que retornavam de Angola. Desde então, a cidade de Feira de Santana tem tido uma desordem na saúde pública devido ao grande volume de doentes que vão e voltam às

unidades de saúde com dores articulares contínuas ou intermitentes (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A necessidade de conhecer aspectos importantes do vírus, de seu comportamento biológico na relação com seus transmissores, bem como características clínicas e epidemiológicas, assumiu papel de destaque desde quando o vírus foi identificado de forma autóctone no Brasil. Tal prioridade se justifica pelo fato do crescente número de casos, chegando a mais de um milhão de casos notificados desde a primeira identificação no país até 18 de junho de 2022 (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2015a; BRASIL, 2016a; BRASIL, 2017a; BRASIL, 2018; BRASIL, 2019; BRASIL, 2020; BRASIL, 2021a; BRASIL, 2021b; BRASIL, 2022).

Em estudo anterior, ainda não publicado, identificamos 76,2% de pacientes com elevada percepção dolorosa nas articulações durante a fase aguda da doença, em estudo realizado em pacientes de Feira de Santana na Bahia a partir de 2015 (MONTALBANO, 2017).

A intensa artralgia e artrite debilitantes da fase inicial da doença necessitam ser mais bem compreendidas, de modo a possibilitar uma adequada assistência aos doentes, para lhes proporcionar melhor qualidade de vida durante o tratamento e evitar as fases subsequentes desta enfermidade.

Na literatura, o estudo sobre as alterações metabólicas decorrentes da infecção por CHIKV são escassos, já que é uma das doenças listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como negligenciadas. Há apenas um artigo (SHRINET *et al.*, 2016) no mundo inteiro que fez análise metabólica em amostras de soros positivos para CHIKV e demonstrou perturbações de importantes vias energéticas, como o ciclo do ácido cítrico e possíveis biomarcadores de dor e inflamação como a hipoxantina. Logo, há necessidade da realização de mais estudos nesta área, justificando a importância do presente estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da doença

Em 1952, nas comunidades do sul da Tanzânia, país localizado na parte oriental do continente africano e banhado pelo Oceano Índico, foi registrada uma epidemia de doença que lembrava dengue, porém com algumas características clínicas e epidemiológicas distintas daquelas até então observadas, fato que alertou para a possibilidade de tratar-se de nova enfermidade (ROBINSON, 1953).

Devido ao início súbito e a gravidade do comprometimento articular, a população local passou a chamar a doença de chikungunya, pelo fato desta palavra significar “aquele que se curva”. A elevada taxa de ataque chamava à atenção, pois em duas a três semanas, cerca de 60 a 80% da população de cada aldeia era acometida pela doença, sendo que em algumas casas, todos os habitantes eram acometidos (ROBINSON, 1953).

Desde o relato inicial em 1952 até os dias atuais, diversas epidemias foram registradas. Entre os anos de 1960 e 1980, o vírus foi isolado em diversos países da África e da Ásia, onde provocou várias epidemias que acometeram centenas de milhares de pessoas (MACKENSIE *et al.*, 2001; POWERS *et al.*, 2000).

A partir de 2004, a doença disseminou-se novamente a partir de um surto na costa do Quênia, chegando a 500.000 casos registrados até 2006. Depois dos surtos ocorridos em 2006 nas Ilhas do Oceano Índico, a epidemia se disseminou para a Índia, contribuindo para a chegada da doença em vários países da região até ser levada por viajantes até os Estados Unidos e países da Europa, como Itália, França e Reino Unido. Em outubro de 2013, a doença chegou às Américas (LEDRANS *et al.*, 2007; MORENS; FAUCI, 2014; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2011; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Em setembro de 2014, foram notificados os primeiros casos autóctones no Brasil, nos estados do Amapá e Bahia. A introdução no Amapá se deu através da Guiana Francesa e na Bahia pela cidade de Feira de Santana, através de cidadãos brasileiros que retornavam de Angola (RODRIGUES *et al.*, 2016). Desde então, é obrigatório que os estabelecimentos de saúde, públicos ou privados, notifiquem os casos suspeitos em até 24 horas às Secretarias Municipais e Estaduais de Saúde e ao Ministério da Saúde (BRASIL, 2014a).

2.2 Espectro da infecção

Chikungunya é subdividida em três fases: aguda, pós-aguda e crônica. Além das dores articulares, a doença aguda sintomática caracteriza-se por gerar febre alta de início súbito, podendo ser acompanhada de manifestações cutâneas, cefaleia, mialgia, dor retro-orbital, conjuntivite, fadiga e prostração. Nas fases pós-aguda e crônica, há diminuição dos sintomas gerais, porém com persistência da dor e/ou inflamação nas articulações, as quais podem perdurar assim por até dois anos. Há relatos de que alguns sujeitos apresentam alopecia e pele e cabelos secos na fase crônica (COUDERC, LECUIT, 2015; LARRIEU *et al.*, 2010; OKEOMA, 2016; SIMON; SAVINI; PAROLA, 2008; THIBERVILLE *et al.*, 2013; WEAVER; LECUIT, 2015).

Artralgia, artrite e possibilidade de cronicidade são características típicas desta enfermidade, diferenciando-a de outras arboviroses como dengue e zika. O comprometimento articular é generalizado e normalmente bilateral e simétrico, ocorrendo mais comumente nas mãos, pés, pulsos e tornozelos. Edema e rigidez matinal também são observados com frequência (NKOGHE *et al.*, 2012; SISSOKO *et al.*, 2009).

Na fase aguda, as dores são contínuas na maioria dos indivíduos e tendem a se tornar intermitentes nas fases subseqüentes. As articulações e tendões apresentam-se, já na primeira fase, comprometidos, tendo-se observado diversos casos de síndrome do túnel do carpo, sinovite, entesite (principalmente no tendão de Aquiles), tenossinovite e periostite. Nas fases pós-aguda e crônica, estas manifestações reumáticas tendem a piorar, sendo possível o surgimento de artrose e sequelas, como degeneração de articulações e encurtamento do tendão de Aquiles. (BORGHERINI *et al.*, 2007; GERARDIN *et al.*, 2013; JAVELLE *et al.*, 2015).

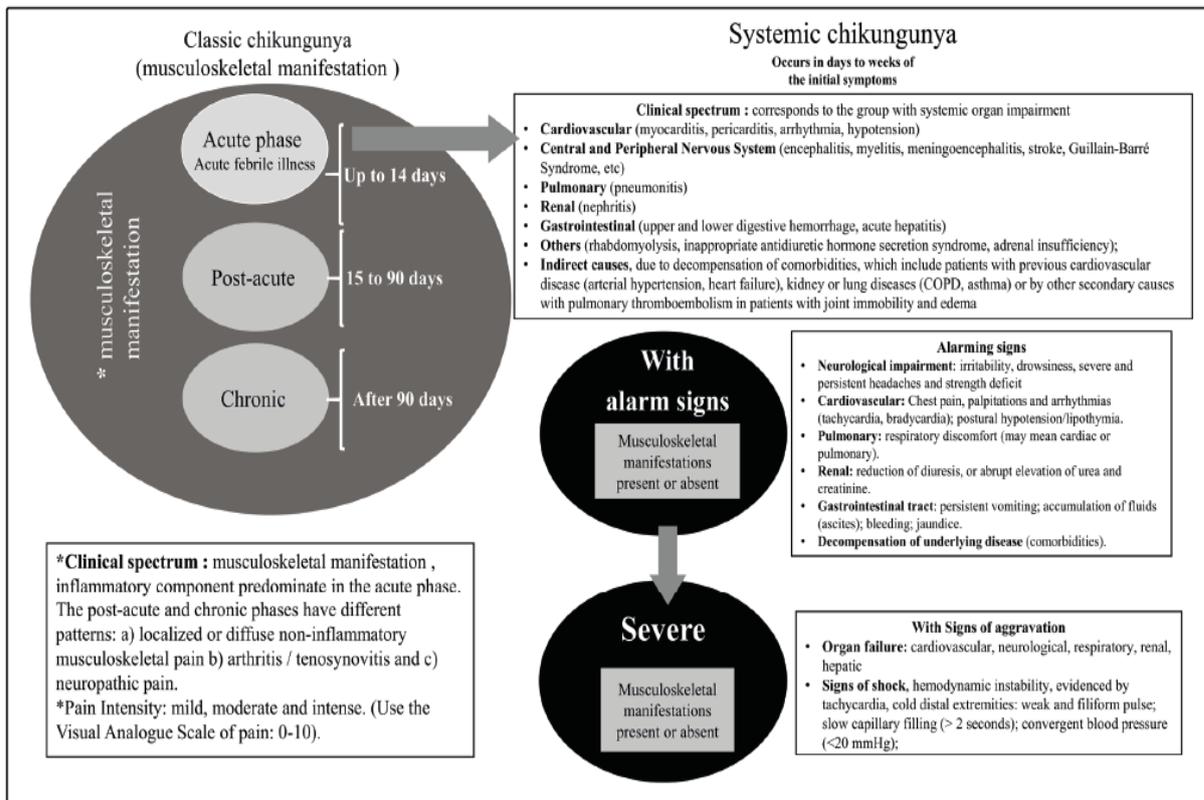
Inicialmente, a fase aguda foi descrita com duração de 10 dias e a fase pós-aguda era denominada subaguda (de 11 a 90 dias) e a crônica era a partir de três meses de sintomas, podendo chegar a um ano e meio, ou mais (BRASIL, 2015b). Em 2017, o Ministério da saúde alterou esta classificação passando a fase aguda a ter até 21 dias, a pós-aguda ocorrendo de 22 a 90 dias de sintomas e a crônica permaneceu como antes (BRASIL, 2017b; SIMON *et al.*, 2015).

Em 2020, Brito e colaboradores propuseram uma nova classificação para chikungunya: fase aguda (até 14 dias de sintomas), pós-aguda (de 15 a 90 dias) e crônica (acima de 3 meses). Os autores também se atentaram para o fato de que a

doença não é pouco letal como estabelecido em 2015 e que também é passível de sequelas e complicações viscerais. Sendo assim, propuseram classificar a doença não apenas por período, mas também por gravidade, sendo semelhante à classificação da dengue (BRITO *et al.*, 2020).

Brito e colaboradores também propuseram que há uma forma clássica da doença (é o esperado e possui a subdivisão nos três períodos supracitados) e uma forma sistêmica (subdividida em “chikungunya com sinais de alarme” e “chikungunya grave”). Estas descrições encontram-se especificadas na figura 1 a seguir. O Ministério da Saúde relatou interesse em lançar um novo manual de Manejo clínico em pacientes com chikungunya utilizando a classificação proposta (BRITO *et al.*, 2020).

Figura 1: Proposta de nova classificação de chikungunya, com as especificações das fases por período, sinais de alarme e da gravidade.



Fonte: Brito *et al.*, 2020.

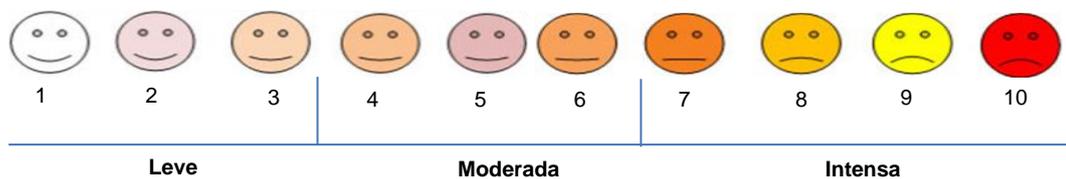
Diversos estudos sugerem que alguns fatores de risco que ocorrem na fase aguda, ou antes mesmo da infecção, encontram-se relacionados com a cronicidade e com a artralgia persistente. São eles sexo feminino, idade, intensidade de algumas

manifestações da fase aguda (febre alta, artrite em seis ou mais articulações, depressão e viremia alta), falta de repouso durante os primeiros dias da doença e a pré-existência de comorbidades musculoesqueléticas e hipertensão (CUNHA; TRINTA, 2017; GERARDIN *et al.*, 2013; JAIN, *et al.*, 2017; MONTALBANO, 2017; SCHILTE, *et al.*, 2013; SIMON *et al.*, 2015; SISSOKO *et al.*, 2009). Não há relato de reinfecção por CHIKV, devido ao fato de que o indivíduo que se infecta uma vez adquire imunidade de longa duração (THIBERVILLE *et al.*, 2013).

Edema, idade superior aos 26 anos, sexo feminino, dor retro orbital, hipertensão e prurido na fase aguda encontram-se associados a cronicidade da artrite e da artralgia (MORAES *et al.*, 2020).

A escala analógica visual da dor (VAS) é um bom instrumento para avaliar dores musculoesqueléticas e articulares, começando a ser utilizada em reumatologia em meados do século 20. Trata-se de uma escala de 0 a 10 na qual o paciente marca a intensidade de sua dor, sendo zero a ausência de dor e 10 a máxima sensação dolorosa possível (BOONSTRA *et al.*, 2008; SOKKA, 2005).

Figura 2: Escala analógica visual da dor (VAS)



Fonte: Adaptado de FORTUNATO *et al.*, 2013.

Cerca de 30% dos pacientes podem apresentar componentes de dor neuropática associada à dor musculoesquelética e esses podem não responder aos analgésicos habituais. É recomendado que isso seja pesquisado através do questionário de dor neuropática DN4, que é composto por duas questões realizadas por entrevista e duas questões de exame físico, totalizando dez respostas. Caso quatro ou mais respostas sejam positivas, provavelmente o paciente apresenta um quadro de dor com componente neuropático (BRITO *et al.*, 2016).

Além da transmissão vetorial, há também a transmissão vertical de CHIKV. Em estudo na Ilha da Reunião, 7.509 gestantes foram acompanhadas e 678 delas apresentaram positividade para o teste PCR e/ou soro reagente para IgM anti-CHIKV. Trinta e nove mulheres apresentaram viremia no período intraparto e cerca de 49%

dos recém-nascidos foram infectados. Esses bebês tendem a ter meningoencefalite e dermatite vesículo-bolhosa, os quais são graves, e o diagnóstico precoce é essencial para o sucesso do tratamento (CUNHA; TRINTA, 2017; GERARDIN, *et al.* 2008).

Os achados hematológicos observados nas infecções por CHIKV são plaquetopenia, leucopenia, taxas acima do valor de referência das transaminases hepáticas, creatinina e creatinina quinase (CK) (STAIKOWSKY *et al.*, 2009).

Inicialmente, acreditava-se que, apesar de debilitante, chikungunya seria uma doença com baixo risco de morte ou gravidade. Porém, nos últimos anos, vários países, como Colômbia, Venezuela e Brasil, divulgaram diversos casos fatais. Logo em seguida, a comunidade científica constatou que não é uma doença com baixa letalidade, inclusive em 2017 ocorrem mais óbitos por chikungunya do que por dengue no Brasil (BRASIL, 2017b; BRASIL, 2018; CARDONA-OSPINA, 2015.)

2.3 Fisiopatologia da doença

Inicialmente, o vírus CHIKV é introduzido na pele e corrente sanguínea pelo mosquito infectado, normalmente o *Aedes* spp., quando este realiza a picada. O período de incubação é curto: três a sete dias. CHIKV penetra na célula-alvo através de endocitose mediada por receptor (apesar de se saber da existência destes receptores, eles ainda não foram identificados) e então se replica, normalmente em fibroblastos da derme, e se dissemina para outros tecidos (principalmente utilizando-se de monócitos/macrófagos também por endocitose) através da corrente sanguínea. Além disso, infecta células de Langerhans, chegando também à órgãos linfoides secundários como o baço e linfonodos. Em seguida, a replicação ocorre em células dos tecidos dos órgãos linfoides, músculos, articulações, pele de outras regiões mais distantes do local da picada e nas meninges de pacientes neonatos ou imunodeprimidos (COUDERC; LECUIT, 2015).

Nesses tecidos, há o rompimento do nucleocapsídeo e o RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido para formar as quatro proteínas do complexo de replicação viral (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), as quais medeiam a síntese de um intermediário de RNA negativo que serve como um modelo para a síntese da subgenômica e RNA genômico. O RNA subgenômico é traduzido nas proteínas estruturais do capsídeo, pE2 (precursor de E2 e E3), E1 e 6K. Após replicação do material genético, as proteínas do capsídeo se associam para formar um novo nucleocapsídeo no

citoplasma, o qual incorpora RNA genômico durante o processo de maturação. As proteínas precursoras são transportadas para o retículo endoplasmático e complexo de Golgi onde sofrem modificações pós-traducionais para formar o E1-E2 heterodímero. Essas proteínas são transportadas para a membrana celular do hospedeiro para formar picos de envelope viral. O vírus é então liberado da célula hospedeira através do processo de brotamento (CUNHA, TRINTA, 2017; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Nesse momento, há elevada produção de Interferon tipo 1 (IFN-I); contudo, o vírus dispõe de mecanismos de escape para inibir a ação dessa citocina (figura 3). Os macrófagos infectados produzem as interleucinas IL-6 e IL-8 e a proteína quimiotática de monócitos tipo 1 (MCP-1), substâncias que atraem os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e as células Natural Killer (NK) para os locais de infecção. As células TCD4⁺ do tipo Th1 ativam os macrófagos que fagocitam o vírus a fim de que estes produzam radicais livres para destruição do microrganismo fagocitado (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013).

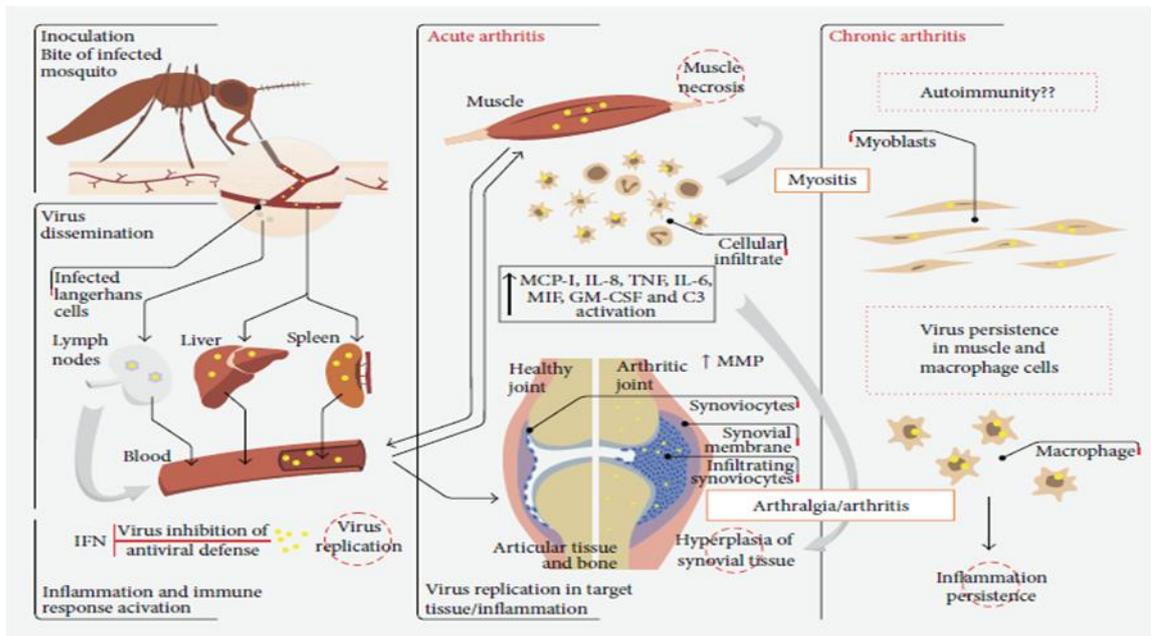
As células Th1 também ativam os linfócitos TCD8⁺ para que secretem suas perforinas e granzimas nas células infectadas, a fim de induzir apoptose e, assim, eliminar os vírus da fase intracelular. Por outro lado, o papel da imunidade inata parecer ter uma importância durante a inflamação das articulações em resposta ao CHIKV, evidenciando-se grande infiltrado de macrófagos na cápsula sinovial, o que gera edema e ativação dos nociceptores (fibras nervosas responsáveis pela geração da percepção dolorosa) (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013).

O período de incubação finaliza-se com o início da febre alta, sendo a elevada viremia da fase aguda associada com aparecimento desta. A carga viral é maior em neonatos e idosos. A replicação inicial ocorre em leucócitos no sangue, gerando leucopenia na fase aguda da doença (JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 2009).

A poliartralgia debilitante é relatada na grande maioria dos pacientes sintomáticos e a gravidade e persistência dos sintomas estão associados à extensão de replicação do vírus e a presença dos mediadores inflamatórios no plasma. As crianças tendem a apresentar artralgia em menos articulações e com menor intensidade, devido a resposta imunológica letárgica e menor. Esta artralgia menos intensa ocorre pelo fato de crianças exibirem baixa produção de IFN-I. É importante ressaltar que IFN-I é responsável também por controlar a viremia, assim crianças

podem apresentar quadro grave ou até fatal na fase aguda devido aos baixos níveis dessa citocina (LUN; NG, 2015).

Figura 3: Fisiopatologia da infecção por chikungunya.



Fonte: ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013.

2.4 Aspectos epidemiológicos

As arboviroses são um grave problema de saúde pública que ocorre de maneira emergente. Estima-se que existam 545 espécies de arbovírus associadas a zoonoses. Existem cinco famílias de arbovírus de importância médica: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (LOPES; LINHARES; NOZAWA, 2014). As condições climáticas adversas, em consequência do aquecimento global, associadas à não colaboração da população no combate do mosquito, e a fácil adaptação do vetor às condições da vida urbana e aos inseticidas, agravam ainda mais essa situação (SANTOS, 2021).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 3,9 bilhões de pessoas estão vivendo em áreas tropicais e subtropicais sob risco de contrair arboviroses, não apenas pelo clima, como também por fatores ecológicos, econômicos e sociais (BRASIL, 2009; INSTITUTO RENÉ RACHOU, 2021; UEHARA, *et al.*, 2006; WORLD HEALTH ORGANIZATION, c2022).

As epidemias das arboviroses interferem também na economia de diversos países. Quando se trata de chikungunya, esta situação é ainda pior pois, além do grande número de doentes e hospitalizações, os indivíduos retornam para atendimento nas unidades de saúde diversas vezes devido a dor intensa e prolongada. Toda esta situação leva a prejuízos não apenas à saúde pública, mas também ao mercado de trabalho, que fica sem o funcionário, e ao próprio indivíduo, que pode perder o emprego devido à falta de credibilidade gerada pelos diversos atestados apresentados (OLIVEIRA *et al.*, 2009; COELHO, 2008; TEICH; ARINELLI; FAHHAN, 2018).

O número de casos de chikungunya acumulados nas Américas desde o surto de 2013 em Saint-Martin até 12 de fevereiro de 2022 encontra-se acima de 3,2 milhões, sendo o Brasil o país que está em primeiro lugar nas Américas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2022).

O número supracitado deve ser considerado como bem maior, uma vez que existe intensa subnotificação há anos por diversos motivos, tais como: em muitos países, os dados encontram-se desatualizados em relação ao número de casos reais; existem regiões que não contam com um adequado sistema de vigilância epidemiológica; muitos casos passam despercebidos ou até confundidos com outras arboviroses (BRASIL, 2021a).

Desde dezembro de 2019, com o surgimento da pandemia da Covid-19, observou-se uma diminuição dos registros de casos prováveis de diversas doenças infecciosas. Esta diminuição pode ser consequência do receio da população em procurar atendimento em uma unidade de saúde com medo de se contaminar por SARS-CoV-2, bem como uma possível subnotificação ou atraso nas mesmas, associadas a mobilização das equipes de vigilância e assistência para o enfrentamento da pandemia (BRASIL, 2021a; NASCIMENTO *et al.*, 2021; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Desde a introdução do CHIKV no Brasil, em setembro de 2014, até 18 de junho de 2022, foram notificados pelo Sistema Nacional de Notificação de Agravos (SINAN) do Ministério da Saúde do Brasil mais de um milhão de casos de chikungunya, distribuídos em todas as regiões do país. Este número certamente é bem maior, da mesma forma que o número de casos nas Américas, e pelos mesmos motivos supracitados. (BRASIL, 2014a; BRASIL, 2015a; BRASIL, 2016a; BRASIL,

2017a; BRASIL, 2018; BRASIL, 2019; BRASIL, 2020; BRASIL, 2021a; BRASIL, 2021b; BRASIL, 2022).

Em estudo na comunidade rural de Chapada, próxima a cidade de Feira de Santana-Bahia, revelaram uma soroprevalência de anticorpos anti-CHIKV de 20% nessa população (CUNHA *et al.*, 2017). A soroprevalência tem sido apresentada com números variados em diversos estudos em outras localidades pelo planeta (10,2%-75%), o que se deve às diferentes condições locais de vigilância, tipos de genótipos e vetor (KUAN *et al.*, 2016; PIALOUX *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2016).

2.5 Diagnóstico

Somente exames laboratoriais de sorologia e pesquisa de RNA viral são capazes de fornecer um diagnóstico exato e específico da infecção por CHIKV. Em contrapartida, esses levam alguns dias para ficarem prontos. Além disso, no caso da sorologia, deve-se aguardar o período sintomatológico exato para a realização do exame (BRASIL, 2017b).

Sendo assim, o tratamento dos primeiros dias da fase aguda de chikungunya não é definido pelos exames específicos e sim, pela sintomatologia, pelo hemograma e pelos exames bioquímicos. O diagnóstico específico é importante para guiar o tratamento das fases pós-aguda e crônica, em conjunto com a anamnese clínica, exame físico e alguns exames laboratoriais de monitoramento (BRITO *et al.*, 2016; BRASIL, 2017c).

Para a pesquisa do RNA viral, as principais técnicas moleculares utilizadas são os ensaios de amplificação do material genético do vírus: *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) e *Real Time Quantitative PCR* (RT-qPCR). Estas técnicas permitem um diagnóstico sensível, detectando o ácido nucleico viral de zero a oito dias após o aparecimento dos sintomas, sendo que o período de maior viremia vai do primeiro ao quinto dia (Edwards *et al.*, 2007).

Para a pesquisa de anticorpos específicos, as principais técnicas disponíveis são: o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e o teste imunocromatográfico do tipo *point-of-care* (POC). Os testes sorológicos permitem a detecção de anticorpos específicos do tipo IgM, os quais já são possíveis de serem detectados a partir do segundo dia após o aparecimento dos sintomas, contudo em grande parte dos pacientes o título de anticorpos ainda é muito baixo neste período. Logo, seria mais

indicado realizar a investigação sorológica a partir do oitavo dia de sintomas para detecção de IgM e do tipo IgG a partir do décimo dia (OKEOMA, 2016; KIKUTI *et al.*, 2020).

O teste imunocromatográfico, conhecido popularmente como teste rápido, não é considerado um exame diagnóstico específico, devida a baixa sensibilidade. Quando o resultado é positivo, uma nova amostra sanguínea necessita ser coletada e encaminhada para a realização da confirmação diagnóstica pelo método ELISA. A vantagem desses testes rápidos é que dispensam uma estrutura laboratorial, podendo serem levados ao campo em locais de difícil acesso sem necessidade de refrigeração ou equipamento e pode fornecer resultados em 10 a 20 minutos (BRASIL, 2017b; CUNHA; TRINTA, 2017).

2.6 Manejo clínico e tratamento

O manejo clínico de sujeitos sintomáticos com suspeita de chikungunya é diferente nas três fases da doença. De um modo geral deve-se observar sinais de gravidade e realizar a classificação de risco. O diagnóstico diferencial de chikungunya em relação a outras arboviroses também é importante, uma vez que impacta diretamente na escolha do medicamento a ser administrado, principalmente nas fases pós-aguda e crônica (CUNHA; TRINTA, 2017).

Na fase aguda, o diagnóstico diferencial é um pouco mais difícil de ser realizado. Sendo assim a conduta a ser tomada deve ser baseada na hipótese que talvez não seja chikungunya e pensar que alguns medicamentos indicados para chikungunya não são adequados para indivíduos acometidos por outras patologias (BRITO *et al.*, 2016).

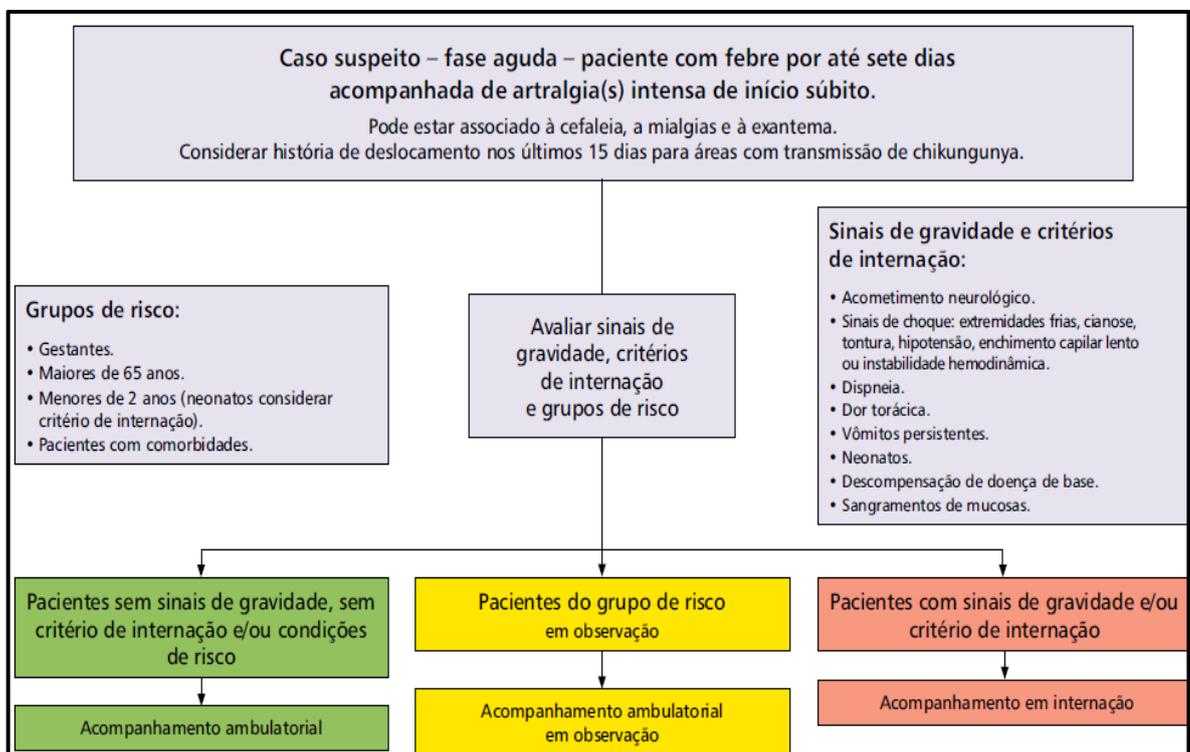
Sendo assim, o Ministério da saúde do Brasil preconizou um fluxograma para a conduta a ser realizada nos casos agudos suspeitos de chikungunya, respeitando a classificação de risco do paciente (Figura 3) a seguir (BRASIL, 2017b).

A artralgia deve ser tratada desde seu surgimento, na fase aguda da doença, pois o não tratamento ou tratamento incompleto/ inadequado pode atuar como meio de cronificação da doença e/ou levar a fadiga, perda de qualidade de vida, depressão e distúrbios do sono. Tão importante também é o tratamento da dor nas fases pós-agudas e crônicas, pois, além de o não tratamento levar aos problemas supracitados,

também pode deixar sequelas nas articulações atingidas e estruturas subjacentes (BRITO *et al.*, 2016).

Na fase aguda, a anamnese deve compreender a caracterização da febre, observando o início dela, bem como a sua correlação com a artralgia e outras manifestações, principalmente o exantema (verificar também a localização, se há prurido e tipos: dermatite esfoliativa, hiperpigmentação, lesões por fotossensibilidade, lesões simulando eritema nodoso, úlceras orais, bolhas e vesículas) (OKEOMA, 2016).

Figura 3: Fluxograma da conduta a ser realizada em pacientes suspeitos de chikungunya na fase aguda



Fonte: BRASIL, 2017 b.

A investigação da existência de comorbidades deve ser realizada antes do início do tratamento uma vez que muitos medicamentos não podem ser administrados em certas condições clínicas. As principais comorbidades a serem pesquisadas são diabetes, hipertensão arterial, glaucoma, insuficiência renal e cardiomiopatias (THIBERVILLE *et al.*, 2013).

Quanto a artralgia, a intensidade deve ser avaliada, utilizando-se a escala analógica visual (VAS), bem como a localização das primeiras articulações envolvidas

no processo inflamatório, sua duração, e progressão para outras articulações, se a articulação já se encontrava comprometida antes da infecção, além da natureza aguda ou insidiosa e periodicidade das dores (BOONSTRA *et al.*, 2008; FORTUNATO *et al.*, 2013, SIMON *et al.*, 2015; SOKKA,2005).

Nas primeiras visitas durante a fase aguda, os medicamentos em uso pelo paciente (principalmente anti-inflamatórios não esteroidais- AINES, e anti-inflamatórios em geral) através de automedicação para combater os sintomas de chikungunya ou utilizados para outras patologias devem ser indagados e apoiar-se nos dados obtidos durante exame físico para a realização de diagnóstico diferencial de dengue (BRASIL, 2016b).

O exame físico do paciente com chikungunya deve conter, no mínimo, sinais vitais, investigação das lesões de pele, exame neurológico, oftalmológico e, principalmente, articular. As articulações acometidas devem ser apalpadas e observadas quanto à possível nodulação, edema, estalidos, deformidade, limitação da mobilidade, mudanças visíveis na pele, dor ou atrofia muscular (SIMON *et al.*, 2015).

O tratamento é de suporte aos sintomas, hidratação e repouso, uma vez que não há terapia antirretroviral específica para CHIKV. Na fase aguda, deve-se evitar AINES e corticoides devido ao risco aumentado de hemorragia e insuficiência renal desses pacientes e por possível confusão diagnóstica com dengue (BRASIL, 2017b).

Para tratar dor de leve intensidade (VAS de 1 a 3) recomenda-se administrar, por via oral, 1000 mg de dipirona a cada seis horas ou paracetamol de 500 a 750 mg, com intervalos de quatro a seis horas. Em caso de dor moderada (VAS de 4 a 6), deve-se administrar dipirona de 1000mg e paracetamol de 500 mg intercalados de três em três horas. Devido a hepatotoxicidade do paracetamol, a dose diária total de 4000 mg não deve ser ultrapassada (CUNHA; TRINTA, 2017).

Se $VAS \geq 4$ com artralgia persistente, poliarticular ou incapacitante, pode-se administrar estas medicações por via intravenosa (IV) em unidade de pronto atendimento ou serviço de urgência. Persistindo a dor, pode-se administrar o opioide tramadol 100 mg IV, juntamente com 10 mg de bromoprida, para evitar náuseas as quais se agravam com o uso do opioide e que podem já existir como sintoma da infecção por CHIKV (BRITO *et al.*, 2016).

Quando há presença de dor elevada (VAS de 7 a 10), deve-se utilizar os dois analgésicos supracitados de três em três horas associado ao tramadol (50 a 100 mg

a cada seis horas), principalmente quando a anamnese revela dor neuropática. Em alternativa ao tramadol, pode-se utilizar outros opioides, como a codeína (30 mg a cada seis horas) e a oxicodona (10 mg a 20 mg a cada 12 horas), não devendo ser utilizados dois opioides concomitantemente (BRASIL,2017b).

Nos casos de dor neuropática, o uso de drogas moduladoras da atividade excitatória do sistema nervoso pode ser indicado. Um exemplo é a utilização de 50mg/dia de amitriptilina, um antidepressivo tricíclico que inibe a receptação de serotonina e noradrenalina e cujos principais efeitos colaterais são a sensação de boca seca, a sonolência e o ganho de peso (OKEOMA, 2016).

Recomenda-se a utilização de compressas frias de quatro em quatro horas por 20 minutos como medida analgésica nas articulações acometidas e deve-se estimular o repouso e a hidratação oral (dois litros no período de 24 horas) dos pacientes, começando na unidade de saúde e continuando no domicílio (BOUHASSIRA *et al.*, 2005).

Nas fases pós-aguda ou crônica, com VAS \geq 4, recomenda-se o uso de corticoides, sendo a prednisona o medicamento de primeira escolha, cuja dose indicada é 0,5 mg/kg de peso/dia, em dose única pela manhã. Espera-se melhora da capacidade para deambular sem ajuda e controle satisfatório das dores. Mesmo com a remissão completa da dor, deve-se manter a dose por mais três a cinco dias. Caso não haja recidiva do quadro, inicia-se o desmame, com retirada de 5 mg a cada sete dias (THIBERVILLE *et al.*, 2013).

O uso de corticosteroides deve ser evitado em pacientes com hipertensão de difícil controle, diabetes, passado de fratura por osteoporose documentada, transtorno de humor bipolar, arritmias, coronariopatias, insuficiência renal crônica em diálise, Cushing, obesidade grau III e glaucoma (CUNHA; TRINTA, 2017).

Na fase crônica, o Ministério da Saúde recomenda a utilização de hidroxicloroquina e metotrexato, sendo a hidroxicloroquina a primeira escolha, porque, apesar de ambos os medicamentos não terem sido estudados para a comprovação científica de eficácia nos pacientes com chikungunya, há experiência positivas com a utilização de hidroxicloroquina em outras doenças reumáticas crônicas, além de seu potencial ação antiviral e ser droga mais segura quando comparada ao uso de metotrexato (BRASIL, 2017b).

Deve-se lembrar que o metotrexato possui muitas reações adversas que merecem atenção redobrada como mielotoxicidade, hepatotoxicidade, efeitos

gastrointestinais etc. É necessário o ajuste da dose em pacientes com alterações de função renal, sendo contraindicado naqueles com *clearance* de creatinina menor que 30 ml/min (THIBERVILLE *et al.*, 2013).

A hidroxicloroquina apresenta como reações adversas distúrbios visuais, hematológicos, alopecia, entre outros. Em caso de necessidade de uso prolongado, a avaliação oftalmológica deverá ser oferecida dentro do primeiro ano do início da droga e deverá seguir o controle oftalmológico padrão recomendado após cinco anos (CUNHA; TRINTA, 2017).

Outros medicamentos podem ser utilizados para o tratamento da dor e inflamação muscular e articular nas fases pós-aguda e crônica, como o Ibuprofeno 600 mg 8/8h e o Naproxeno 10 a 20 mg/kg/dia de 12/12h por exemplo, desde que observadas a compatibilidade do tratamento com comorbidade e reações adversas (Brasil, 2017b).

No caso de paciente gestante, o paracetamol é a primeira escolha para aliviar a dor musculoesquelética e febre causada pela infecção do CHIKV, respeitando-se a dosagem máxima diária. A partir da 24^a semana de gestação, todos os AINEs (incluindo aspirina e AINEs tópicos) são contraindicados devido aos riscos de insuficiência renal fetal e fechamento do ducto arterial. Não há indicação para realização de parto através de cesariana para prevenir a transmissão do CHIKV ao recém-nascido; contudo, o monitoramento neonatal por cinco dias deve ser realizado na mesma maternidade que a mãe (Simon *et al.*, 2015).

Crianças com chikungunya devem ser tratadas sintomaticamente como os adultos, evitando a administração de AINES em bebês menores de três meses de idade e/ou antes de completar 10 dias de sintomas. A codeína não é recomendada para crianças menores de 12 anos de idade e deve ser reservado apenas para os casos refratários ao paracetamol (OKEOMA, 2016).

2.7 Metabolômica

Metabolômica faz parte de um conjunto de ciências denominadas ciências Ômicas. Dentre estas ciências, encontram-se, além da metabolômica, a proteômica, a lipidômica, a genômica e a transcriptoma. A genômica estuda o genoma de um organismo e suas possíveis alterações, as quais podem culminar em doenças ou, às vezes, apenas em alterações genéticas e/ou fenótipas. A transcriptoma identifica o

conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular, sendo assim, trata-se do reflexo direto da expressão dos genes (BIAZON, 2018; KROLL, 2013).

A proteômica é a ciência que busca encontrar proteínas e/ou peptídeos, de um determinado organismo, codificados pelos genes e suas possíveis alterações ao sofrerem alguma ação externa ou interna. Da mesma forma, agem a lipidômica e a metabolômica, porém, respectivamente, com lipídios e com metabólitos (LEVY, 2005; CANUTO, 2018).

A metabolômica é a ciência Ômica que mais gera dados, pois as espécies de compostos possíveis de serem identificados são muitos: carboidratos, álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos e lipídios. Sendo assim, qualquer análise de metabolômica, por mais simples que seja, é difícil de interpretar e de ser escrita para o que um terceiro a leia e compreenda (BYERS *et al.*, 2019).

O correto fluxo de trabalho da metabolômica é um dos fatores determinantes para a obtenção de sucesso nas análises. Antes da abordagem deste fluxo, é importante compreender que existe dois tipos de análise metabolômica: *Untargeted* e *Targeted*. A análise do tipo *untargeted*, em português, é denominada global. Trata-se de uma análise qualitativa e quantitativa na qual se pretende identificar quais são os metabólitos existentes em um organismo em uma determinada rota metabólica ou quais destes estão alterados em um determinado organismo ao ser exposto à alguma alteração interna ou externa. Enfim, análises *untargeted* visam descobrir e as análises alvo (*targeted*) visam quantificar um determinado metabólito ou conjunto, a fim de compreender o quanto ele está elevado ou diminuído em uma determinada situação (NUNES; CANUTO, 2020).

O passo a passo do fluxo de trabalho metabolômico vai depender se a análise é *targeted* ou *untargeted*. Quando a análise é *untargeted* deve-se primeiramente obter as amostras, sejam elas frescas ou de biobancos. Podem ser soro, células, urina, entre outros fluidos ou sólidos biológicos. As amostras devem ser preparadas, normalmente com procedimentos que envolvem solventes orgânicos para evitar que reações enzimáticas continuem ocorrendo e alterem o metaboloma (conjuntos de metabólitos presentes ou alterados em um sistema biológico), pode-se também realizar congelamento. Nas análises *targeted*, deve-se iniciar com a seleção dos

metabólitos a serem quantificados e depois realizar o preparo da amostra como mencionado acima (BYERS *et al.*, 2019).

A seguir, independentemente do tipo de análises, realiza-se a análise instrumental que pode ser feita por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou por Espectrometria de Massa (MS). A MS pode ser empregada através da infusão direta dos extratos (DIMS, do inglês, *direct infusion mass spectrometry*) ou através da ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS, do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*). A DIMS tem sido acoplada a cromatografia gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*) ou cromatografia líquida de alta eficiência (LC, do inglês, *liquid chromatography*) ou ainda eletroforese capilar (CE, do inglês, *capillary electrophoresis*) para evitar problemas de supressão de ionização dos sinais obtidos nas análises. O próximo passo é realizar o processamento dos dados e, em seguida, a análise estatística (CANUTO, 2018).

A espectrofotometria de massa pode ser definida como a análise da matéria através da formação de íons em fase gasosa e conseqüentemente caracterizados de acordo com sua massa, carga, estrutura e propriedades físico-químicas. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotometria de massas pode ser utilizada em aplicações forenses, ambientais, substâncias químicas, farmacêuticas, alimentícias e dentre outras áreas (FREITAG, c2022).

A RMN possui baixa sensibilidade e seletividade, enquanto MS é uma abordagem mais comumente utilizada para estudos tanto direcionados como não direcionados, apresentando maior sensibilidade e seletividade, bem como a capacidade de detectar mais metabólitos em uma única execução do que RMN. Além disso, o MS combinado com um método de separação cromatográfica, como cromatografia líquida (LC) melhora a resolução e é capaz de separar e detectar uma grande variedade de moléculas e, portanto, geralmente bem adequado para análises *untargeted* de moléculas biológicas (EMWAS, 2015).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), também conhecida como High Performance Liquid Chromatography (HPLC) é o tipo mais utilizado de cromatografia por eluição. Nela, a fase móvel é um solvente líquido, o qual contém a amostra na forma de uma mistura de solutos. A fase estacionária pode ser composta por um líquido ou um gás. O equipamento para a realização desse tipo de cromatografia é denominado de cromatógrafo líquido e é composto por sistema de reservatório de fase móvel, sistema de bombeamento de fase móvel, sistema de

injeção, sistema analítico constituído pela coluna cromatográfica, sistema de detecção (a detecção pode ser por UV, fluorescência, espectrofotometria de massas entre outros) e sistema de aquisição e registro de dados (SKOOG *et al.*, 2006).

Existem dois tipos de eluição: a isocrática (a composição da fase móvel (%B) se apresenta constante durante todo o processo) e a gradiente (a composição da fase móvel (%B) pode ser alternada durante a análise). As bombas do cromatógrafo podem ser binárias, quaternárias, entre outros. Contudo, se forem binárias, há dois pistões e canais (canal A e canal B), os quais são responsáveis por todas as funções essenciais que fazem parte do sistema de fluxo dos solventes. Sendo assim, quando se diz %B, estará indicando a porcentagem de solvente que irá passar pelo canal B (FREITAG, c2022).

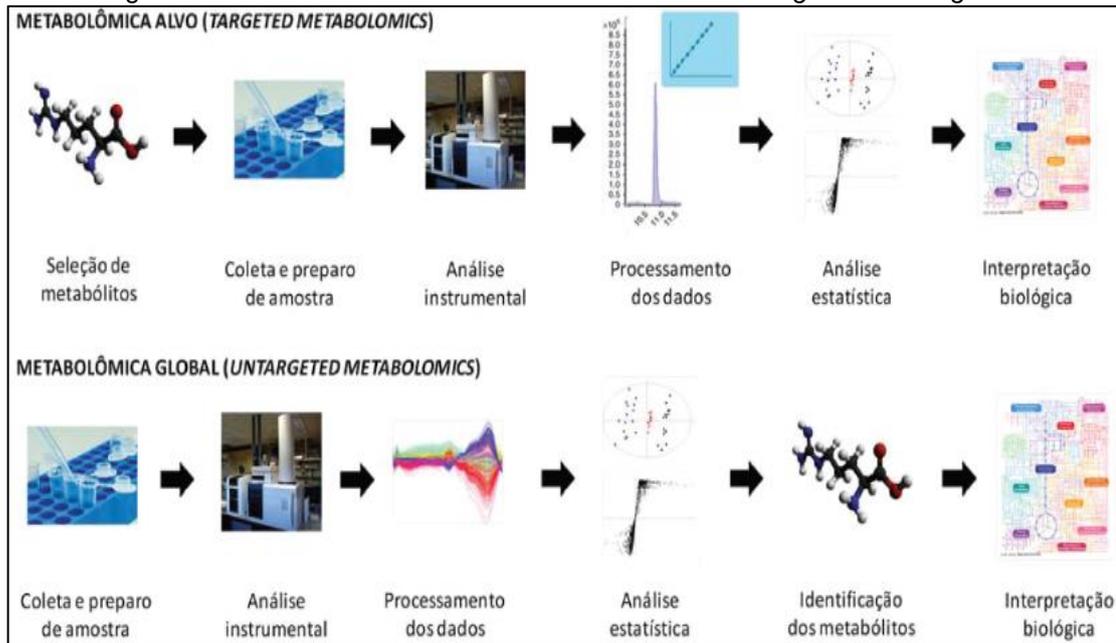
Continuando o fluxo de trabalho da metabolômica, as análises *untargeted* prosseguem-se então a identificação dos metabólitos, utilizando os softwares adequados: metlin, pubchem, Human Metabolome Database (HMDB), entre outros. Por fim, ambos os tipos de análises devem ser interpretados biologicamente. A figura 5 apresenta um esquema acerca do fluxo de trabalho de cada tipo de análise metabolômica (CANUTO *et al.*, 2015).

A metabolômica revela biomarcadores que diferenciam estados diferentes de uma mesma doença e os resultados mostram semelhanças nas alterações metabólicas causadas por vírus diferentes. Contudo, é difícil construir um perfil generalizado das alterações metabólicas induzidas por qualquer vírus. Os estudos de metabolômica podem variar em muitos aspectos, desde os aspectos estatisticamente significantes, até mudanças nos níveis de metabólitos. Inconsistências entre os estudos podem surgir devido a diferenças na amostra, tempos de coleta e métodos de preparação, controles, genótipos de vírus, populações de hospedeiros (incluindo genética e dieta), estágio da doença, métodos de coleta de dados e métodos analíticos (BYERS *et al.*, 2019).

Não há ainda um método de normalização padronizado para realização de estudos metabolômicos, o que também leva bastante a variação de resultados. A *Metabolomics Standards Initiative* (MSI), criada para orientar técnicas analíticas e práticas de relatório, é um excelente passo em direção à padronização dos métodos da metabolômica. No entanto, o MSI não é abrangente e exigirá atualizações adicionais à medida que o campo progride (NUNES; CANUTO, 2020).

A grande vantagem é que as alterações metabólicas tendem a ocorrer mais rapidamente do que as sorológicas e podem ser detectadas após o tempo limitado em que o RNA viral pode ser detectado por PCR no soro. Além disso, a sensibilidade das técnicas metabolômicas permite que os pesquisadores identifiquem biomarcadores que sinalizem a progressão de uma determinada doença (BYERS *et al.*, 2019).

Figura 5: Fluxo de trabalho de análises metabolômicas *targeted* e *untargeted*.



Fonte: CANUTO,2018.

Os arbovírus das famílias *Flaviviridae* (Dengue e Zika) e *Togaviridae* (Chikungunya) são vírus que alteram significativamente o ambiente metabólico do hospedeiro para suas vantagens replicativas. As vias metabólicas do hospedeiro manipuladas por vírus dependem do ciclo de vida do vírus, das defesas imunológicas ativadas, bem como os tecidos e tipos de células infectadas. Muitos metabólitos podem estar em *down regulation* e em *up regulation* nos indivíduos infectados em relação à sujeitos saudáveis (BYERS *et al.*, 2019).

Os vírus Dengue são aqueles mais estudados e que tem biomarcadores mais definidos, sejam por metabolômica ou por outro tipo de estudo. O ZIKV, apesar de ter sido menos estudado, é possível encontrar alguns artigos que estudaram suas alterações no metaboloma do hospedeiro. Até o presente momento, há apenas um estudo no mundo que utilizou abordagem metabolômica para avaliar as alterações metabólicas decorrentes da infecção por CHIKV. O trabalho foi realizado por

SHRINET e colaboradores (2016) na Índia e as análises foram conduzidas através de RMN. As amostras de soro foram agrupadas em mono-infectadas para dengue, mono-infectadas para chikungunya e co-infectadas e demonstrou-se que chikungunya gera perturbações de importantes vias energéticas, como o ciclo do ácido cítrico e possíveis biomarcadores de dor e inflamação como a hipoxantina. Mesmo com achados tão interessantes, pode ser que o perfil metabólico traçado seja restrito à Índia e isto reforça a necessidade da realização de mais estudos na área (BYERS *et al.*, 2019; CANUTO, 2018; SHRINET *et al.*, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

A dor articular causada por CHIKV na fase aguda é relatada de maneira muito debilitante, acarretando transtornos não só à saúde física e mental, mas também à situação socioeconômica do paciente. O paciente apresenta dificuldades em realizar suas atividades cotidianas, sejam domésticas ou profissionais. A demora no atendimento nas unidades de saúde, na realização do diagnóstico e a falta de disponibilidade de medicamentos nestas unidades, muitas vezes, levam o enfermo a procurar por uma alternativa, realizando assim automedicação.

O diagnóstico clínico é muito difícil de se realizar, principalmente na fase aguda, uma vez que pode ocorrer com frequência de o paciente com CHIKV apresenta sinais e sintomas similares a outras arboviroses. O diagnóstico laboratorial é o único que pode levar a certeza de qual infecção se trata. Atualmente, encontram-se disponíveis o ELISA IgM e IgG anti-CHIKV e o RT-PCR, os quais necessitam serem realizados no momento adequado da infecção, correndo o risco da obtenção de falsos positivos ou negativos. Além disso, levam tempo a ficarem prontos os resultados, principalmente em períodos de surtos, que geram elevada demanda aos laboratórios, sendo que muitas vezes o indivíduo recebe o diagnóstico depois da cura ou já tendo ao menos iniciado o tratamento.

Sendo assim, o presente estudo justifica-se pelo fato de que seria importante ter biomarcadores que pudessem ser utilizados juntamente com diagnóstico clínico, antes do diagnóstico laboratorial, obtendo de maneira mais rápida o prognóstico do paciente e iniciando precocemente o tratamento a fim de evitar agravos e cronicidade. Além disso, descobrir a influência do vírus na alteração do metabolismo humano pode auxiliar na pesquisa de novos fármacos que tenham estes metabólitos como alvo de suas terapias. Saber em que parte da cascata celular o vírus interfere, revela peculiaridades da fisiopatologia viral, podendo levar a descobertas futuras de como o ser humano pode interferir ou não na produção de algum metabólito.

A dor articular debilitante e a cronicidade são os fatores mais marcantes da doença, logo, compreender as alterações metabólicas decorrentes da doença podem levar ao encontro de biomarcadores destes dois graves problemas possíveis de ocorrerem nos indivíduos acometidos pelo vírus. Existe no mundo inteiro apenas um trabalho de análise metabólica do vírus CHIKV, sendo o presente estudo o segundo no mundo a realizar tal análise e o primeiro no Brasil.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Determinar o perfil metabolômico sérico durante a fase aguda da infecção pelo CHIKV e identificar biomarcadores candidatos para o prognóstico de gravidade e cronicidade da doença.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar metabólitos sub-regulados e super-regulados nos pacientes infectados pelo CHIKV na fase aguda, em relação a pacientes com sintomatologia similar e indivíduos saudáveis.
- Identificar as vias perturbadas pela infecção e os metabólitos envolvidos.
- Identificar possíveis metabólitos biomarcadores do prognóstico de gravidade e cronicidade.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo e localidade

Trata-se de um estudo transversal analítico, sendo a amostragem não-probabilística por conveniência em surto de chikungunya ocorrido em Feira de Santana e região em 2015. O estudo foi realizado em três unidades de saúde: Policlínica Doutor Francisco Martins da Silva localizada no bairro Rua Nova da cidade Feira de Santana (FSA) – BA- Brasil, Centro de saúde Dr. José Maria Magalhães Neto do município de Riachão do Jacuípe (RJP- localizado a 77,1 Km de FSA) e Unidade de Saúde da família da comunidade rural Chapada, localizada a 17,1 Km de RJP.

5.2 Critérios de inclusão

Amostras de sujeitos com diagnóstico laboratorial positivo ou negativo para CHIKV realizado através qRT-PCR e/ou IgM Anti-CHIKV, que tenham passado por consulta médica e entrevista com questionário por no mínimo os dois momentos (M):

- M0- primeira parte da fase aguda, com 0 a 10 dias de sintomas;
- M1- segunda parte da fase aguda, com 11 a 21 dias de sintomas;

Para serem inclusas, as amostras também necessitavam ser de indivíduos que tiveram dor articular, mesmo que a artralgia não tenha persistido por todas as fases e que tivesse amostra de pelo menos o M0, prezando-se, porém, por sujeitos que tivessem amostras dos dois momentos (M0 e M1).

Os sujeitos tinham mais de 18 anos e concordaram na época em participar do estudo por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

Foram também incluídas 15 amostras de sujeitos saudáveis doadores de sangue sorteadas de biobanco da Faculdade de medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para que estas pudessem ser utilizadas como grupo controle (CG).

5.3 Critérios de exclusão

Excluiu-se amostras cujo volume era insuficiente para realização das análises metabôlicas e aquelas de sujeitos cuja confirmação laboratorial se deu apenas por IgG Anti-CHIKV positivo, devido ao fato deste anticorpo não caracterizar doença aguda, não podendo ter-se a certeza de que o indivíduo teria tido amostra da fase M0.

Foram excluídos três sujeitos, por serem positivos apenas para IgG anti-CHIKV, seis sujeitos (portadores de problemas cognitivos) por não serem capazes de compreender os objetivos do projeto e a entrevista baseada no questionário, o que comprometeria a validade do estudo e um por não ter tido dor articular em nenhum momento da infecção.

5.4 População de estudo

No período de 2015 a 2018, 240 sujeitos com suspeita clínica de chikungunya foram atendidos pela equipe de pesquisadores nas unidades de saúde citadas anteriormente. Destes, 191 (79,6%) sujeitos obtiveram resultado positivo para pelo menos um dos três marcadores de diagnóstico para CHIKV e 49 (20,4%) apresentaram resultado negativo para todos eles.

Após as primeiras exclusões, restaram amostras de 181 sujeitos positivos e 49 negativos.

Foi possível realizar a seleção das amostras, tanto positivas como negativas, conforme vê-se no quadro 2 a seguir. Cinco sujeitos positivos para chikungunya e elegíveis para o presente estudo foram excluídos por não apresentarem quantidade suficiente de amostra.

Ao todo, foram selecionadas amostras de 25 sujeitos positivos para chikungunya, os quais compuseram o grupo CHIKV+, 19 sujeitos negativos para chikungunya, grupo CHIKV- e 15 amostras de sujeitos saudáveis que compuseram o grupo controle (CG), totalizando amostras de 59 sujeitos. Tanto para o grupo CHIKV+, quanto para o grupo CHIKV-, os sujeitos de M1 são os mesmos de M0, porém alguns sujeitos tiveram amostras faltando no M1. O total de 99 amostras séricas foram utilizadas para a análise metabôlica *untargeted* (Figura 6).

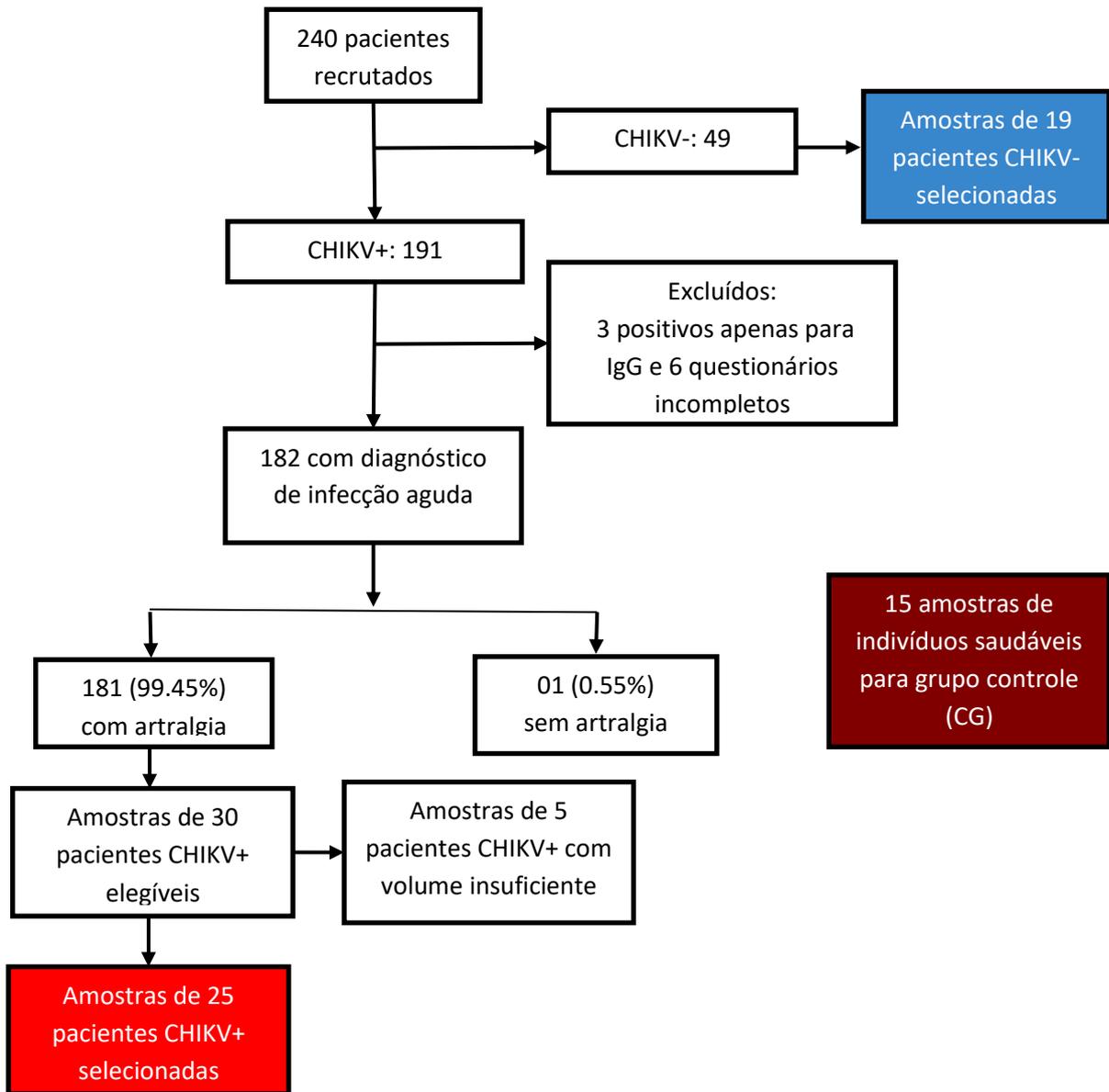
Quadro 2: Agrupamento das amostras selecionadas

Grupo CHIKV+		Grupo CHIKV-		CG
Momento	Número de amostras	Momento	Número de amostras	Número de amostras
M0	25	M0	19	15
M1	22	M1	18	

Dentre os 25 sujeitos positivos para CHIKV, nenhum apresentou resultado positivo apenas para qRT-PCR, oito apresentaram-se positivo apenas para IgM anti-CHIKV e 17 positivaram para ambos os exames. Todos os sujeitos foram testados através de qRT-PCR por duas vezes e todas as amostras de cada momento foram testada para IgM anti-CHIKV, sendo o diagnóstico bem preciso e exato devido às diversas confirmações realizadas. Eles foram também testados para DENV e ZIKV através de qRT-PCR triplex, pesquisa de NS1 (dengue) e sorologia IgM anti-DENV e não houve nenhuma positividade para DENV e nem para ZIKV. Dentre os 25 pacientes com chikungunya selecionados, 16 eram do sexo feminino e 9 do sexo masculino e as idades destes na época da infecção variavam entre 18 e 74 anos.

Já nos 19 pacientes negativos para chikungunya, porém com sintomas similares, a idade variava entre 22 e 74 anos e 12 eram do sexo feminino e 7 do sexo masculino. Duas mulheres CHIKV- apresentaram-se positivas para zika através de qRT-PCR triplex. As amostras de todos os pacientes foram testadas também para dengue através de qRT-PCR triplex, pesquisa de NS1 e sorologia IgM anti-DENV, porém não houve nenhum positivo.

Figura 6: Fluxograma do número total de sujeitos e seleção dos mesmos de acordo com os critérios de elegibilidade do presente estudo



5.5 Procedimentos do estudo

Os sujeitos passaram por entrevista, através de questionário estruturado (Anexo A), feita de forma prospectiva, com aqueles que tivessem de 0 a 21 dias de sintomas. Eles definiram a intensidade da própria dor de acordo com a Escala Analógica Visual (VAS- do inglês *Visual Analogue Scale*) contida no questionário. A VAS mede a intensidade da dor em uma escala que vai de 0, quando não há dor, até 10, que representa a maior sensação dolorosa, muito utilizada em reumatologia para definição de intensidade de dores musculoesqueléticas e articulares.

A VAS possui imagens de “rostos” onde eles sorriem na intensidade 0 e vão diminuindo o sorriso até se tornarem extremamente tristes na intensidade 10 (figura 2 desta tese). Na parte do questionamento dos locais de dores articulares, dispôs-se de imagens de esqueletos. Estas imagens tornam o questionário mais compreensível para o sujeito, garantindo a qualidade das informações colhidas.

O questionário possuía perguntas acerca das comorbidades pré-existentes, sintomas gerais da doença: febre, cefaleia, dor retro orbital, mialgia, artralgia, prostração, exantema, dentre outros. Para processar a caracterização epidemiológica, foram coletados dados como gênero, idade e grau de escolaridade.

Também se perguntou sobre as articulações afetadas com percepção dolorosa e/ou edema, tipo de dor, período do dia que a dor era maior, simetria e bilateralidade das articulações comprometidas e tipos de comprometimentos reumatológicos presentes. O questionário foi aplicado pelos pesquisadores do grupo, grupo composto por enfermeiros, farmacêuticos bioquímicos, biomédicos, biólogos e médicos.

Em seguida, os sujeitos passaram por consulta com os médicos da equipe, assim a intensidade das dores foi definida através da VAS, as articulações comprometidas e o tipo de comprometimento foram confirmados através de exame físico. Logo após, coletou-se uma amostra de sangue para o diagnóstico sorológico e molecular da infecção e algumas destas amostras foram posteriormente selecionadas para o presente estudo.

As amostras foram encaminhadas para o laboratório central do município de Feira de Santana. Em seguida, o soro foi separado por centrifugação (3.000 rpm/5 minutos) e mantido em refrigeração -20°C até o momento do transporte para a Fiocruz Rio de Janeiro-RJ. A sorologia foi realizada com um teste de ELISA comercial, de acordo com as instruções do fabricante (Euroimmun®, Alemanha). O RNA viral foi pesquisado através da técnica de PCR em tempo real triplex (dengue, chikungunya e Zika), conforme protocolo especificado pelo fabricante do Kit ZDC®. Após o diagnóstico, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C, de modo a manter a devida conservação das amostras para uso futuro.

5.6 Análise metabólica

5.6.1 Desenho do estudo metabólico

Foram selecionadas amostras apenas de sujeitos que apresentaram artralgia, entrevista completa e realizaram as consultas médicas no mínimo nos dois momentos e que tenham coletado sangue ao menos no M0.

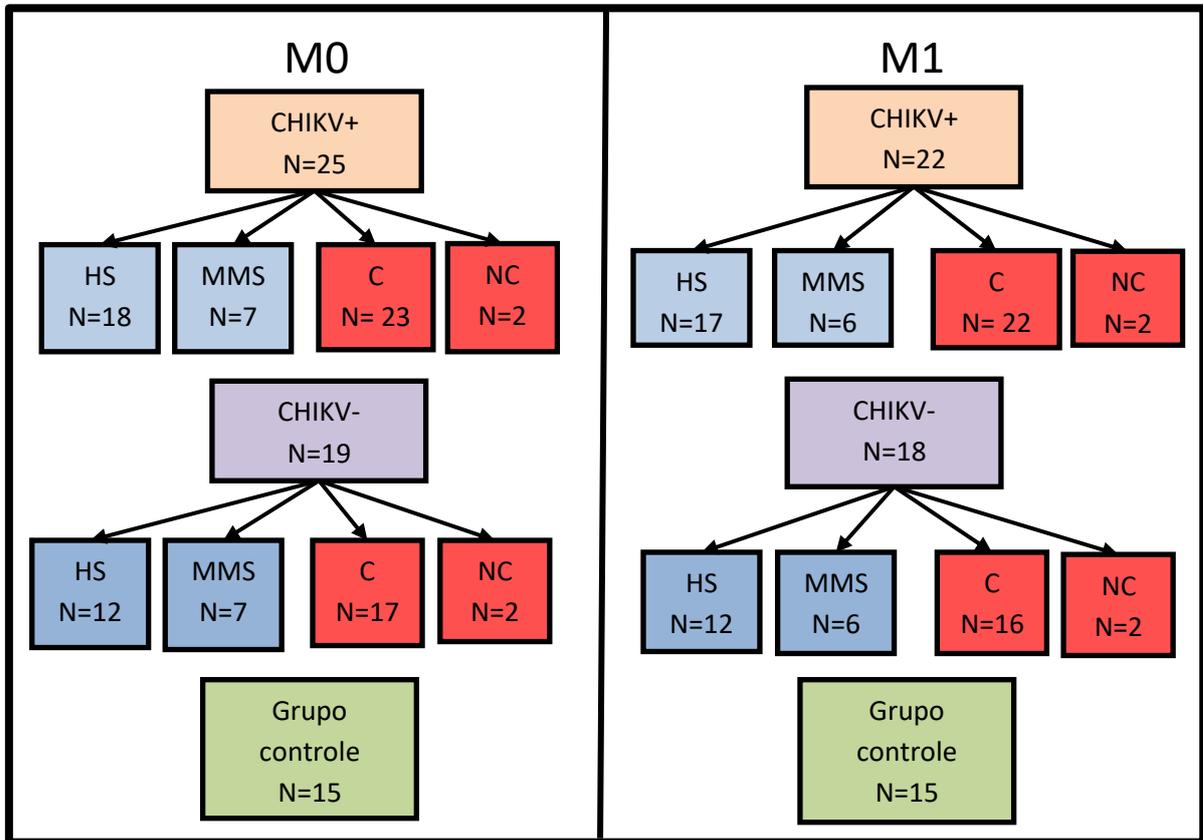
As amostras selecionadas foram divididas em três grupos:

- CHIKV+: amostras positivas para CHIKV por sorologia e/ou pesquisa de RNA;
- CHIKV-: amostras de pacientes que procuraram a UBSF com sinais e sintomas sugestivos de chikungunya, mas que obtiveram resultado negativo nos exames, os quais foram repetidos diversas vezes.
- CG: amostras de controles saudáveis

Os grupos CHIKV+ e CHIKV- foram ainda subdivididos segundo a intensidade da artralgia mensurada pela VAS e a cronicidade. Se o sujeito teve artralgia intensa, era inserido no subgrupo *Hight Severity* (HS) e, em caso de artralgia leve a moderada, subgrupo *Mild to Moderate Severity* (MMS). Os sujeitos que atingiram a cronicidade compuseram o subgrupo *Cronic* (C), e aqueles que tiveram o fim da percepção dolorosa antes de três meses, fizeram parte do subgrupo *Non cronic* (NC). Ressalta-se que estes subgrupos se entrelaçam, ou seja, um sujeito pode, por exemplo, ser positivo para CHIKV (CHIKV+) e ter apresentado dor elevada, sendo enquadrado no subgrupo *Hight Severity* (HS) e ter apresentado percepção dolorosa por mais de três meses, o que o coloca no subgrupo C. A figura 7 representa esquematicamente a divisão dos grupos e subgrupos e o número de amostras alocadas em cada.

Vale ressaltar que os sujeitos CHIKV-, para serem selecionados, deveriam cumprir os mesmos critérios que os CHIKV+ (Ter tido dor articular, ter feito entrevista, preenchido completamente o questionário, ter feito consulta médica e coleta de sangue por no mínimo o M0). Assim cada paciente CHIKV+ e CHIKV- teriam uma ou duas amostras cada um e teriam as mesmas condições, exceto o resultado da sorologia e do RT-PCR. Os CHIKV- possuíam outra patologia com sintomatologia similar a chikungunya, porém não detectada, podendo ser viral ou não.

Figura 7: representação esquemática da divisão dos grupos e subgrupos nos momentos 0 e 1. Em amarelo o grupo positivo para CHIKV, lilás o grupo negativo para CHIKV e em verde o grupo controle. Em azul os subgrupos relativos à intensidade da percepção dolorosa e em vermelho os subgrupos relativos à cronicidade. HS-subgrupo *Hight Severity*; MMS-subgrupo *Mild to Moderate Severity*; C-subgrupo *Cronic*; NC-subgrupo *Non cronic*.



5.6.2 Extração dos metabólitos

Para a extração dos metabólitos utilizou-se uma metodologia *in house*, na qual adicionou-se 100 μL de soro em microtubo de 2 mL e 1000 μL de metanol grau espectroscópico e em seguida, a mistura foi incubada por quatro horas em ultrafreezer (-80°C). Este procedimento visa precipitar moléculas grandes em abundância, como as proteínas, de modo a evitar que elas interfiram na identificação dos metabólitos. Em sequência, centrifugou-se por 15 min à 13000 g e o sobrenadante (parte onde ficam os metabólitos menores que se pretende identificar) foi então transferido para outro microtubo de 2 mL. O próximo passo foi inserir os microtubos em concentrador a vácuo por 30 min, para concentrar a amostra.

Por fim, tratou-se de ressuspender as amostras em 700 µL de metanol grau espectroscópico e filtrá-las em filtro de ponta de seringa, com poro de 0,22 micrometros, para proceder então às análises de espectrometria de massa.

5.6.3 CLAE/EM

As análises foram do tipo CLAE/EM- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenado ao Espectrômetro de Massa. O CLAE era da marca Agilent®, modelo Infinity 1260, hifenado ao espectrômetro de massa de alta resolução do tipo Q-TOF, modelo 6520 B, com fonte de ionização por *electrospray* (IES). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 3mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 µm, a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% vv-1) (A) e metanol (B), com o gradiente: 10% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 98% de B (10-17 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5KV.

A identificação dos constituintes foi realizada levando em consideração a massa de alta resolução (considerando o erro com a massa exata menor que 10 ppm), sendo estes dados cruzados com banco de dados e a literatura.

5.7 Análise estatística

O software MassHunter Qualitative v. 10.0 foi utilizado para processar os dados brutos. A ferramenta "*Molecular feature extraction* (MFE)" foi utilizado para extração dos espectros de massa e conversão para extensão CEF. O software Agilent Mass Profiler Professional (MPP) v. B.13.1.1 foi utilizado para filtrar e alinhar os compostos moleculares extraídos. Os filtros utilizados foram: abundância absoluta mínima = 10000 contagens; número mínimo de íons permitidos = 2; todas as cargas permitidas. Os parâmetros de alinhamento foram: tolerância do tempo de retenção de 0,15 min; janela de massa 15 ppm + 2mDa. Foram considerados somente os compostos moleculares presentes em 100% das amostras dos sujeitos de pelo menos um dos grupos (CHIKV+, CHIKV- ou CG) para análises posteriores de dados e com coeficiente de variância < 25%.

As análises estatísticas foram realizadas com os valores transformados em \log_2 . Utilizou-se os testes de *Anova*, pós teste de *Tukey HSD*, *Multiple Testing Correction: Benjamini-Hochberg*, considerando estatisticamente significante apenas composto cujo valor de *p* fosse menor que 0.01. Foi considerado um *Fold change* > 5.00.

Após análise estatística, os metabólitos foram identificados por meio dos bancos de dados METLIN, PubCHEM, HMDB, Metabolomics work bench e por busca na literatura, a fim compreender as vias metabólicas as quais fazem parte os compostos encontrados.

5.8 Considerações éticas

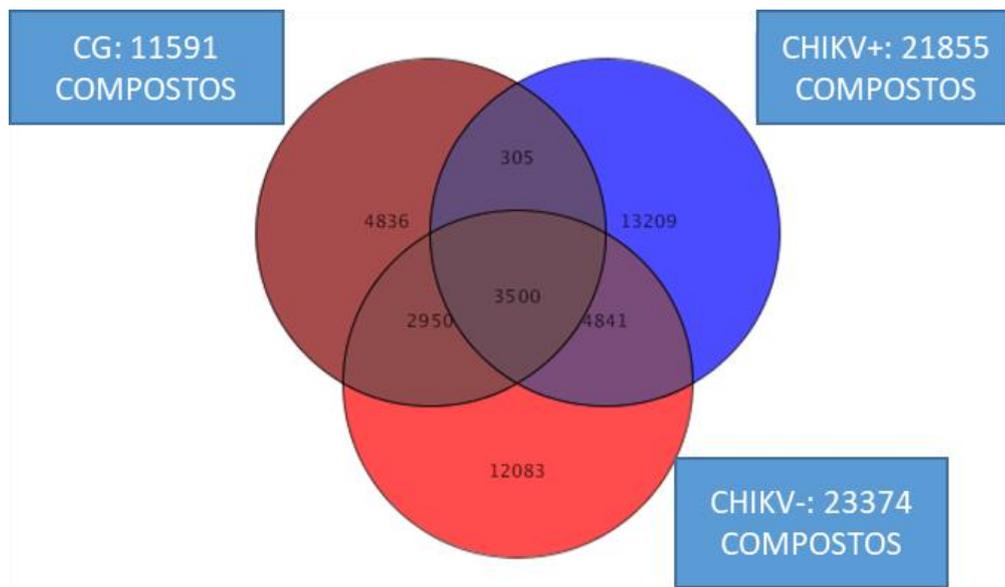
Este estudo teve a aprovação do comitê de ética da Universidade Estadual de Feira de Santana sob o número 1.450.762 (Anexo B).

6 RESULTADOS

6.1 Análise metabolômica geral

Na análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenado ao Espectrômetro de Massa (CLAE/EM), foram encontrados no total 41.724 compostos, sendo que 24.805 eram compostos comuns aos três grupos e não possuíam relevância científica. Já no grupo CHIKV+ foram detectadas 13.209 substâncias exclusivas, 12.083 no grupo CHIKV- e 4.836 no CG (Figura 8).

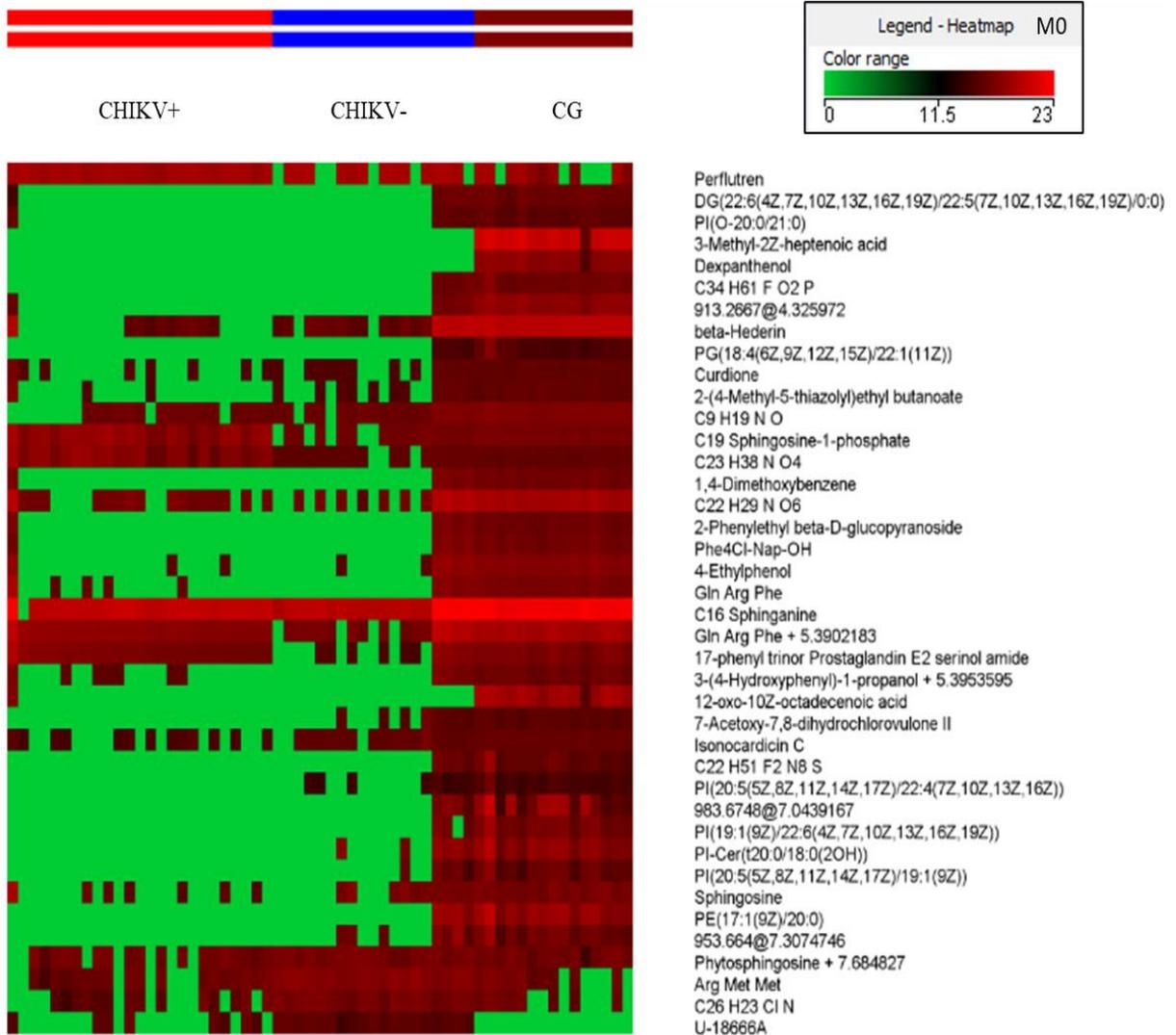
Figura 8: Diagrama dos compostos encontrados na análise CLAE/EM sem ainda ter filtros e análises estatísticas.



6.2 Perfil metabolômico identificado no M0

Após a realização dos filtros e análises estatísticas, foram identificados 40 compostos estatisticamente significantes no momento M0 (primeira parte da fase aguda, com 0 a 10 dias de sintomas), conforme o *Heatmap* a seguir (Figura 9). Nota-se pelo mapa que as amostras do grupo CHIKV+ possuem grande quantidade de compostos sub-regulados em relação ao CG e ao CHIKV-, porém há uma certa similaridade na regulação de alguns compostos entre os grupos CHIKV+ e CHIKV-, os quais são grupos de sujeitos que apresentavam artralgia, independentemente se positivo ou negativo para chikungunya nas várias testagens.

Figura 9: Heatmap dos 40 compostos considerados estatisticamente significantes após análise estatística no M0. Estes compostos foram identificados como presentes em 100% dos sujeitos em pelo menos um dos grupos (CHIKV+, CHIKV- ou CG), apresentaram valor de $p < 0,01$ e Fold change $> 5,00$. As partes verdes no mapa indicam a sub-regulação daquele composto, enquanto as da cor vinho possuem uma regulação mediana e a cor vermelha significa super-regulação.



Em seguida fez-se a identificação dos metabólitos do mapa através de ferramentas como METLIN, PubCHEM, HMDB, Metabolomics work bench e também pesquisa em artigos científicos internacionais disponíveis em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>. Para haver maior confiabilidade nos compostos encontrados, a análise de fragmentação dos compostos identificados será realizada subsequentemente.

Após a pesquisa, restaram 18 das 40 substâncias identificadas com estatisticamente relevantes no M0, pois 14 compostos não foram encontrados nas

pesquisas e oito compostos não resultaram como parte do metaboloma humano, ou seja, pertencem a animais, plantas ou minerais. O quadro 3 a seguir detalha as 18 substâncias encontradas na pesquisa quanto ao valor de p significativo, se estavam em sub ou super-regulação no grupo CHIKV+ em relação aos grupos CHIKV- e CG, a natureza biológica e o link de acesso do(s) site onde foram encontrados.

Quadro 3: Detalhamento dos 18 compostos encontrados no M0 após pesquisa em ferramentas especializadas em metabolômica e artigos científicos internacionais

N.º	Composto	Valor de p	Regul CHIKV + vs Controle	Regul CHIKV +vs CHIKV-	Informação biológica	Link
1	Perflutren	0,0048	up	up	Oriundo do plasma e é utilizado para produzir contraste para diagnóstico	Banco de dados Metabolome Humano: Mostrando metabocard para Perflutren (HMDB0014696)
2	DG(22:6 (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	1,03E-14	down	down	Diglicerídeo precursor dos triglicerídeos	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0007787
3	PI(O-20:0/21:0)	3,12E-14	down	down	É fosfatidilinositol com um álcool graxo	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52928480 http://www.swisslipids.org/#/entity/SLM:00109281/?chemInfo
4	Dexpanthenol	0	down	down	Álcool derivado do ácido pantotênico, um componente das vitaminas do	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/131204

					complexo B e essencial para o epitélio em funcionamento normal. Precursor de Coenzima A e está envolvido na produção da Acetilcolina.	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004231
5	PG(18:4 (6Z,9Z,12Z,15Z)/22:1(11Z))	3,26E-17	down	down	Glicerofosfolípido	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52926717
6	C19 Sphingosine-1-phosphate	3,16E-04	up	up	Esfingolípido	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52931109
7	Gln Arg Phe	9,61E-09	down	down	Peptídeo que tem alta atividade de inibição da ECA, agindo com hipotensor	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21348305/ https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122223629
8	C16 Sphinganine	0,007	down	down	Esfingolípido	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/656816
9	17-phenyltrilor Prostaglandin E2 serinol amide	2,60E-07	up	up	Monoglicerídeo endógeno. Pode ser metabolizado pela COX-2 para formar ésteres 2-glicerílicos de prostaglandina (PG). 17-fenil trilor PGF2α serinol amida é um análogo estável do PGF2α 2-gliceril éster que incorpora uma substituição de 17-fenil que aumenta a atividade. A atividade biológica	https://www.caymanchem.com/product/10004237

					da 17-fenil trinor PGF2 α serinol amida ainda não foi determinada.	
10	12-oxo-10Z-octadecenoic acid	1,02E-30	Down	up	É um lipídio	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5312911
11	7-Acetoxy-7,8-dihydrochlorovulone II	8,11E-14	Down	Down	É um lipídio	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10950272
12	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	3,10E-14	Down	Down	Diacilglicerofosfoinosítóis (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52928098
13	PI(19:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	3,38E-19	Down	Down	Diacilglicerofosfoinosítóis (Lipídio)	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23882219/ https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52927464
14	PI-Cer(t20:0/18:0(2OH))	1,01E-14	Down	Down	Ceramidafosfoinositol (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/70699115
15	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/19:1(9Z))	1,22E-15	Down	Down	Diacilglicerofosfoinosítóis (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52928087
16	Sphingosine	1,17E-05	Down	Down	Esingolipídeo-classe de lipídios da membrana celular que incluem a esfingomielina. Participa de várias reações enzimáticas	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280335

					e atua como sinalizador.	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000252
17	PE(17:1(9Z)/20:0)		Down	Down	Diacilglicerofosfoetanolamina (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52924280
18	Arg Met Met		up	Down	peptídeo	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/145453897

Perflutren, C19 Sphingosine-1-phosphate e 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide foram as únicas 3 substâncias em super-regulação no grupo CHIKV+ em relação ao CHIKV- e ao CG também. O Perflutren é um componente encontrado no plasma sanguíneo humano e encontrava-se super regulado no grupo CHIKV+ 55,8 vezes em relação ao grupo CHIKV- e 104,7 vezes em relação ao CG. O C19 Sphingosine-1-phosphate é um esfingolípido e sua super regulação no CHIKV+ foi de 48,5 vezes em relação ao CHIKV- e de 2,77 em relação ao CG. Por fim a 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide, prostaglandina endógena de natureza monoglicerídea, apresentou super de regulação de 382,6 e 1,02 em relação, respectivamente, ao CHIKV- e CG.

Em sub-regulação no grupo CHIKV+ em relação ao CHIKV- e ao CG foram encontrados 13 compostos:

- DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
- PI(O-20:0/21:0)
- Dexpanthenol
- PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:1(11Z))
- Gln Arg Phe
- C16 Sphinganine
- 7-Acetoxy-7,8-dihydrochlorovulonell,
- PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))
- PI(19:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))
- PI-Cer(t20:0/18:0(2OH))
- PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/19:1(9Z))

- Sphingosine
- PE(17:1(9Z)/20:0)

São todos compostos lipídios, exceto o Gln Arg Phe o qual é um peptídeo e o Dexpanthenol que é um álcool. Muitos destes lipídios estão envolvidos na formação da membrana plasmática ou epitélio.

Já o lipídio 12-oxo-10Z-octadecenoic acid, encontra-se super-regulado no grupo CHIKV+ em relação ao grupo controle e reduzido em relação ao CHIKV-. Já o peptídeo Arg Met Met há uma regulação reduzida no grupo CHIKV+ em relação ao CG e uma super regulação em relação ao CHIKV-.

Em seguida, foi realizada a média da regulação de cada um dos 18 compostos nos subgrupos de sujeitos com dor de elevada intensidade (*High Severity- HS*) e dor de intensidade leve a moderada (*Mild to Moderate Severity- MMS*) tanto nos sujeitos que resultaram positivos quanto aqueles que resultaram negativos para chikungunya. Fez-se também a média da regulação de cada composto no CG. Por fim, comparou-se a média de regulação dos 5 subgrupos conforme o quadro 4 a seguir.

Quadro 4: Média da regulação dos 18 compostos encontrados estatisticamente significativos nos 5 subgrupos quanto a intensidade da dor

N.º	Composto	Regul CHIKV + vs Controle	Regul CHIKV + vs CHIKV -	Média regul CHIKV+ HS (N=18)	Média regul CHIKV+ MMS (N=7)	Média regul CHIKV- HS (N=12)	Média regul CHIKV - MMS (N=7)	Média regul CG (N=15)
1	Perflutren	up	up	18,79	18,78	11,11	16,20	12,08
2	DG(22:6(4Z, 7Z,10Z,13Z, 16Z,19Z)/22 :5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z) /0:0)	down	down	0	0	16,51	4,66	16,32
3	PI(O-20:0/21:0)	down	down	0	0	2,63	4,51	15,74
4	Dexpanthenol	down	down	0	0	0	0	17,64
5	PG(18:4(6Z, 9Z,12Z,15Z) /22:1(11Z))	down	down	0	0	2,46	4,28	15,21
6	C19 Sphingosine	up	up	17,86	17,79	9,71	16,57	16,85

	-1-phosphate							
7	Gln Arg Phe	down	down	13,85	7,33	2,92	4,94	16,95
8	C16 Sphinganine	down	down	20,17	17,71	20,23	20,58	22,51
9	17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide	up	up	17,30	17,30	7,99	9,31	17,02
10	12-oxo-10Z-octadecenoic acid	Down	up	0	0	0	0	18,46
11	7-Acetoxy-7,8-dihydrochlorovulone II	Down	Down	0	0	6,50	6,71	15,62
12	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	Down	Down	0	0	5,90	6,24	14,85
13	PI(19:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	Down	Down	0	0	2,71	2,47	16,78
14	PI-Cer(t20:0/18:0(2OH))	Down	Down	0	0	4,26	7,70	17,68
15	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/19:1(9Z))	Down	Down	0	0	3,89	4,75	16,09
16	Sphingosine	Down	Down	2,61	9,52	5,64	14,38	16,82
17	PE(17:1(9Z)/20:0)	Down	Down	0	0	2,95	5,31	18,11
18	Arg Met Met	up	Down	13,57	6,91	17,44	17,51	11,03

Os peptídeos Gln Arg Phe e Arg Met Met apresentam, em média, uma regulação quase dobrada no grupo positivo com dor elevada (HS) em relação aos positivos com leve a moderada (MMS), enquanto o Sphingosine apresenta uma regulação 3,65 vezes menor no grupo CHIKV+ HS em relação ao CHIKV+ MMS.

Ao comparar o CHIKV+ HS com o CHIKV- HS, nota-se que Perflutren, C19 Sphingosine-1-phosphate e 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide

apresentam-se com, em torno, de o dobro de regulação no primeiro grupo em relação ao segundo e o Gln Arg Phe encontra-se 4,74 vezes maior em CHIKV+ HS comparado ao CHIKV- HS. Em relação à sub-regulação, 11 compostos (10 lipídeos e um peptídeo) encontravam-se reduzidos nos sujeitos com dor elevada e positivos para chikungunya em relação aos negativos com dor elevada. Nota-se então maior diferença de alterações metabólicas ao se comparar sujeitos positivos e negativos para chikungunya, do que ao se comparar ambos os grupos positivos (HS e MMS), mesmo que a intensidade da dor seja diferente.

Onze compostos (10 lipídeos e 1 peptídeo) apresentaram-se reduzidos nos sujeitos CHIKV+ MMS em relação ao CHIKV- MMS. Gln Arg Phe e 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide apresentaram-se cerca de duas vezes mais regulados nos CHIKV+ MMS em relação ao CHIKV- MMS.

Na comparação com o grupo controle, o grupo CHIKV+ HS teve apenas o Perflutren super-regulado e 12 composto (11 lipídios e um álcool) com baixa regulação. O grupo CHIKV+ MMS também teve apenas o Perflutren super regulado e apresentou 14 compostos (13 lipídios e um peptídeo) com baixa regulação.

Por fim, foi realizada a média da regulação de cada um dos 18 compostos nos subgrupos de sujeitos que chegaram a fase crônica (C) e daqueles que se curaram das dores musculoesqueléticas nas fases aguda e pós-aguda (NC- non cronic), tanto nos sujeitos que resultaram positivos quanto aqueles que resultaram negativos para chikungunya. Utilizou-se também a média da regulação de cada composto no CG para fins de comparação com os outros subgrupos conforme o quadro 5 a seguir.

Quadro 5: Média da regulação de cada um dos 18 compostos encontrados estatisticamente significativos nos 5 subgrupos quanto a cronicidade

N.º	Composto	Regul CHIKV + vs Controle	Regul CHIKV + vs CHIKV -	Média regul CHIKV+ C (N=23)	Média regul CHIKV+ NC (N=2)	Média regul CHIKV- C (N=17)	Média regul CHIKV - NC (N=2)	Média regul CG (N=15)
1	Perflutren	up	up	18,80	18,63	13,39	9,59	12,08
2	DG(22:6(4Z, 7Z,10Z,13Z, 16Z,19Z)/22 :5(7Z,10Z,1	down	down	0,64	0	2,92	8,04	16,32

	3Z,16Z,19Z) /0:0)							
3	PI(O- 20:0/21:0)	down	down	0,70	0	2,78	7,92	15,74
4	Dexpanthen ol	down	down	0	0	0	0	17,64
5	PG(18:4(6Z, 9Z,12Z,15Z) /22:1(11Z))	down	down	0	0	2,62	7,49	15,21
6	C19 Sphingosine -1- phosphate	up	up	17,81	18,12	12,69	8,40	16,85
7	Gln Arg Phe	down	down	2,92	8,07	3,07	8,79	16,95
8	C16 Sphinganine	down	down	19,42	20,18	20,26	21,12	22,51
9	17-phenyl trinor Prostaglandi n E2 serinol amide	up	up	17,06	17,00	8,41	8,99	17,02
10	12-oxo-10Z- octadecenoic acid	Down	up	0,76	0	0	0	18,46
11	7-Acetoxy- 7,8- dihydrochlor ovulone II	Down	Down	0	0	6,42	7,91	15,62
12	PI(20:5(5Z,8 Z,11Z,14Z,1 7Z)/22:4(7Z, 10Z,13Z,16 Z))	Down	Down	0	0	5,84	7,58	14,85
13	PI(19:1(9Z)/ 22:6(4Z,7Z, 10Z,13Z,16 Z,19Z))	Down	Down	0	0	1,91	8,66	16,78
14	PI- Cer(t20:0/18 :0(2OH))	Down	Down	0	0	5,11	9,11	17,68
15	PI(20:5(5Z,8 Z,11Z,14Z,1 7Z)/19:1(9Z))	Down	Down	0	0	3,71	8,39	16,09
16	Sphingosine	Down	Down	4,23	8,22	8,99	8,40	16,82
17	PE(17:1(9Z) /20:0)	Down	Down	0	0	3,18	9,32	18,11
18	Arg Met Met	up	Down	12,02	8,09	17,50	17,17	11,03

O peptídeo Gln Arg Phe e o lipídio Sphingosine apresentam-se, em média, em baixa regulação de 2,76 e 1,94 vezes, respectivamente, no grupo positivo crônico (C) em relação ao positivo não crônico (NC). Ao se comparar o CHIKV+ C com o CHIKV- C, nota-se que apenas o 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide mostrou-se com super regulação (2 vezes) no primeiro grupo em relação ao segundo e 10 lipídeos estavam em sub-regulação. Sendo assim, há diferença significativa em apenas dois compostos quando se compara sujeitos CHIKV+ mesmo com a diversidade de cronicidade entre os grupos, já quando se compara crônicos positivos com crônicos negativos há diferença em 11 compostos.

Perflutren, C19 Sphingosine-1-phosphate e 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide apresentaram-se cerca de duas vezes mais regulados nos sujeitos CHIKV+ NC em relação ao CHIKV- NC e dez lipídeos apresentaram-se reduzidos.

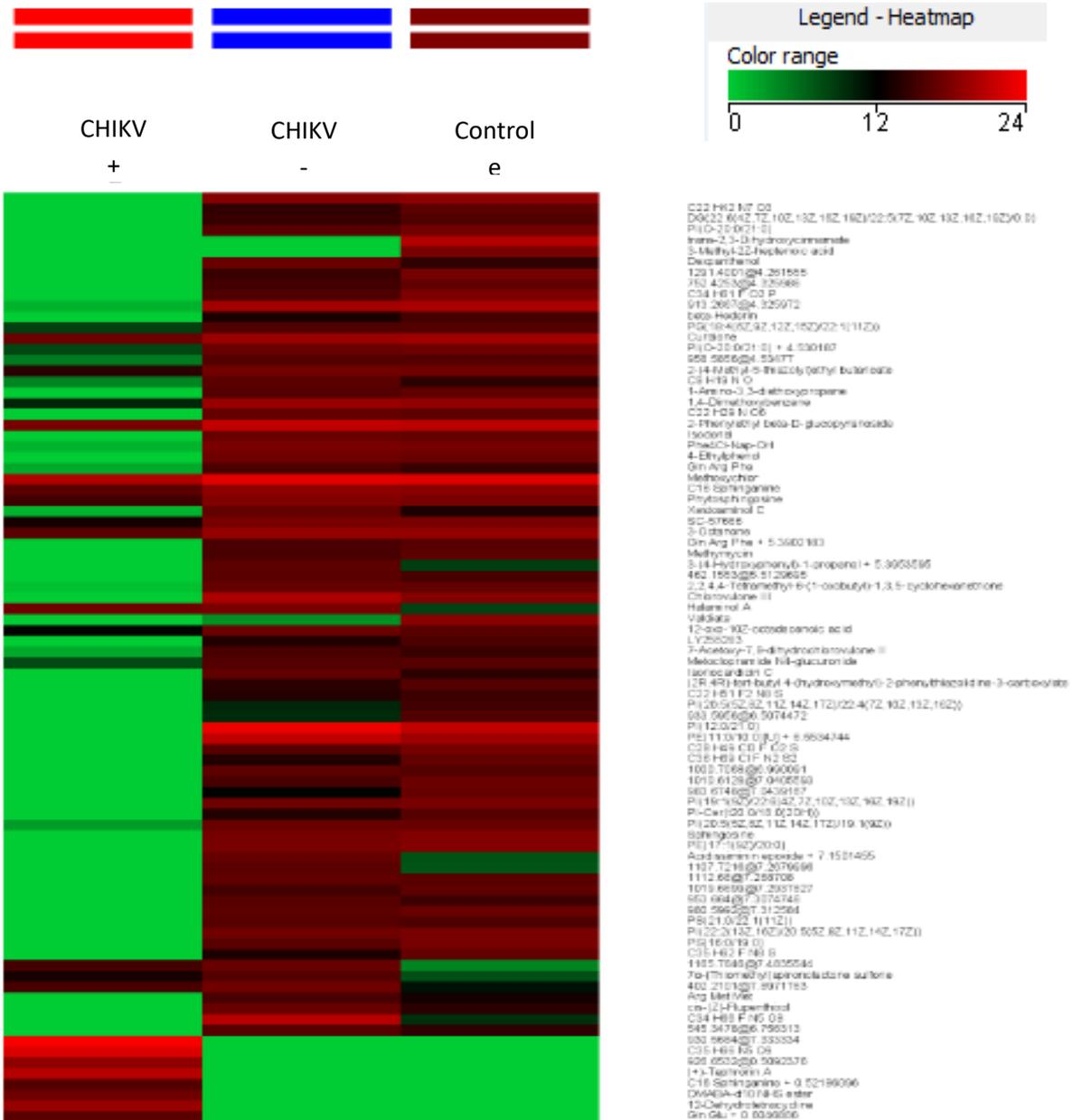
Na comparação com o grupo controle, o grupo CHIKV+ C teve 13 compostos (11 lipídios, um álcool e um peptídeo) com baixa regulação e o grupo CHIKV+ NC apresentou a mesma alteração metabólica.

6.3 Perfil metabolômico identificado no M1

Foram identificados 86 compostos estatisticamente significantes no M1 (parte final da fase aguda, com 11 a 22 dias de sintomas), conforme o Heatmap a seguir (Figura 10). Nota-se pelo mapa que, assim como no M0, as amostras do grupo CHIKV+ possuem grande quantidade de compostos em sub-regulação em relação ao CG e ao CHIKV-, porém há não similaridade na regulação da maioria dos compostos entre os grupos CHIKV+ e CHIKV-.

Após pesquisa nas ferramentas PubCHEM, HMDB, Metabolomics work bench e artigos científicos internacionais disponíveis em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, restaram 20 das 86 substâncias identificadas com estatisticamente relevantes no M1, pois 43 compostos não foram encontrados nas pesquisas e 23 compostos não resultaram como parte do metaboloma humano, ou seja, pertencem a animais ou plantas. O quadro 6 detalha as 20 substâncias encontradas na pesquisa quanto ao valor de p, se encontram-se em baixa ou super regulação no grupo CHIKV+ em relação aos grupos CHIKV- e CG, a natureza biológica e o link de acesso do(s) site onde foram encontrados.

Figura 10: Heatmap dos 86 compostos considerados estatisticamente significantes após análise estatística no M1. Estes compostos foram identificados como presentes em 100% dos sujeitos em pelo menos um dos grupos (CHIKV+, CHIKV- ou CG), apresentaram valor de $p < 0,01$ e Fold change $> 5,00$. As partes verdes no mapa indicam baixa regulação daquele composto, enquanto as da cor vinho possuem uma regulação mediana e a cor vermelha significa super-regulação.



Quadro 6: Detalhamento dos 20 compostos encontrados no M1 após pesquisa em ferramentas especializadas em metabolômica e artigos científicos internacionais.

N.º	Composto	Valor de p	Regul CHIKV+ vs Control e	Regul CHIKV+ vs CHIKV-	Informação biológica	Link

1	DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	1,96E-23	down	down	Diglicerídeo (DAG). Ele começa com o glicerol-3-fosfato, que é derivado principalmente do fosfato de diidroxiacetona, um produto da glicólise (geralmente no citoplasma das células do fígado ou do tecido adiposo). Diacilgliceróis são precursores dos triacilgliceróis.	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0007787 https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/53478538
2	PI(O-20:0/21:0)	4,77E-30	down	down	Glicerofosfoinositol	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52928480
3	Dexpanthenol	0	down	down	Álcool derivado do ácido pantotênico, um componente das vitaminas do complexo B e essencial para o epitélio em funcionamento normal. Precursor de Coenzima A e está envolvido na produção da Acetilcolina.	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004231
4	PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:1(11Z))	2,64E-23	down	down	Diacilglicerofosfoglicerol	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52926717
5	4-Ethylphenol	3,98E-25	down	down	É um álcool presente em todas as	https://hmdb.ca/metabolites/H

					espécies vivas, desde bactérias até humanos. Presente na membrana celular.	MDB0029306
6	Phytosphingosine	0,0043	down	down	Fosfolípídio, um dos principais componentes de todas as membranas biológicas; Metabólitos esfingolipídicos, como esfingosina e ceramida, são compostos altamente bioativos e estão envolvidos em diversos processos celulares, incluindo interação célula-célula, proliferação celular, diferenciação e apoptose.	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0004610
7	Xestoaminol C	1,15E-04	down	down	Aminoálcool. Os metabólitos secundários são não essenciais que podem servir como moléculas de defesa ou sinalização.	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0304813
8	12-oxo-10Z-octadecenoic acid	3,86E-19	down	down	Lipídio	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5312911
9	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	4,77E-30	down	down	Diacilglicerofosfoinositóis (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/

						d/5292809 8
10	PI(12:0/21:0)	6,52E-14	down	down	Fosfatidilinositol	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5292748 5
11	PI(19:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	7,97E-16	down	down	Diacilglicerofosfoinositóis (Lipídio)	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23882219/ https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5292746 4
12	PI-Cer(t20:0/18:0(2OH))	0	down	down	Ceramida-fosfoinositol (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7069911 5
13	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/19:1(9Z))	1,96E-23	down	down	Diacilglicerofosfoinositóis (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5292808 7
14	Sphingosine	6,77E-17	down	down	Esfingolípido-classe de lipídios da membrana celular que incluem a esfingomiéline. Participa de várias reações enzimáticas e atua como sinalizador.	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280335 https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000252
15	PE(17:1(9Z)/20:0)	0	down	down	Diacilglicerofosfoetanolamina (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5292428 0

16	PS(21:0/22:1(11Z))	0	down	down	Diacilglicerofosfo serina (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52925809
17	PI(22:2(13Z,16Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	2,51E-29	down	down	Diacilglicerofosfo inositol (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52928202
18	PS(16:0/19:0)	0	down	down	Diacilglicerofosfo serina (Lipídio)	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52926075
19	Arg Met Met	0,0055	down	down	Pepitídeo	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/145453897
20	PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	0	up	up	Glicerofosfolipídeo extremamente importantes como intermediários na biossíntese de triacilgliceróis e fosfolipídios.	https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0115416 https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/52929431

PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) foi a única substância em super-regulação no grupo CHIKV+ em relação ao CHIKV- e em relação ao CG também. Este componente é um glicerofosfolipídeo extremamente importante como intermediário na biossíntese de triacilgliceróis e fosfolipídios e encontravam-se super regulado no grupo CHIKV+ 79.203,75 vezes tanto em relação ao grupo CHIKV- quanto em relação ao CG.

Todos os demais 19 composto encontravam-se em sub-regulação no grupo CHIKV+ em relação ao CHIKV- e ao CG. São todos compostos lipídicos, exceto quatro deles: os álcoois Dexpanthenol e 4-Ethylphenol, o aminoácido Xestoaminol C e o

peptídeo Arg Met Met. Muitos destes lipídios estão envolvidos na formação da membrana plasmática ou epitélio. Não foram detectados compostos super regulados no grupo CHIKV+ em relação ao grupo controle e reduzido em relação ao CHIKV- e vice e versa.

Doze compostos (10 lipídios, um álcool e um peptídeo) encontrados nas pesquisas do M1 também se encontravam no M0. São eles:

- DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
- PI(O-20:0/21:0)
- Dexpanthenol (álcool)
- PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:1(11Z))
- 12-oxo-10Z-octadecenoic acid
- PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))
- PI(19:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))
- PI-Cer(t20:0/18:0(2OH))
- PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/19:1(9Z))
- Sphingosine
- PE(17:1(9Z)/20:0)
- Arg Met Met (peptídeo)

Todos estes compostos encontravam-se em baixa regulação no CHIKV+ em relação ao CHIKV- e ao CG, tanto no M0 como no M1, exceto o 12-oxo-10Z-octadecenoic acid que no M0 apresentava-se com baixa regulação apenas em relação ao CG e em up regulation em relação ao CHIKV- e o Arg Met Met que no M0 apresentava-se com super-regulação em relação ao CG e em sub-regulação em relação ao CHIKV-.

Assim como no M0, no M1 também se fez a comparação da média da regulação de cada um dos 20 compostos nos subgrupos de sujeitos com dor de elevada intensidade (*Hight Severity- HS*) e dor de intensidade leve a moderada (*Mild to Moderate Severity- MMS*) tanto nos sujeitos que resultaram positivos quanto aqueles que resultaram negativos para chikungunya. Fez-se também a média da regulação de cada composto no CG (Quadro 7).

Quadro 7: Média da regulação de cada um dos 20 compostos encontrados estatisticamente significativos nos 5 subgrupos quanto a intensidade da dor

N.º	Composto	Regul CHIKV+ vs Controle	Regul CHIKV+ vs CHIVK-	Média regul CHIKV+ HS (N=17)	Média regul CHIKV+ MMS (N=6)	Média regul CHIKV- HS (N=12)	Média regul CHIKV- MMS (N=6)	Média regul CG (N=15)
1	DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	down	down	0	0	13,44	16,00	16,32
2	PI(O-20:0/21:0)	down	down	0	0	14,18	15,47	15,74
3	Dexpanthenol	down	down	0	0	0	0	17,64
4	PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:1(11Z))	down	down	0	0	13,70	12,50	15,21
5	4-Ethylphenol	down	down	1,81	0	17,71	17,77	17,45
6	Phytosphingosine	down	down	17,07	14,18	18,61	18,88	18,47
7	Xestoaminol C	down	down	14,86	15,60	18,07	18,03	17,66
8	12-oxo-10Z-octadecenoic acid	down	down	0	0	3,91	2,56	18,45
9	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	down	down	0	0	13,41	14,25	14,85
10	PI(12:0/21:0)	down	down	0	0	10,35	7,77	15,82
11	PI(19:1(9Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	down	down	0	0	12,30	10,80	16,78
12	PI-Cer(t20:0/18:0(2OH))	down	down	0	0	17,16	17,20	17,68
13	PI(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	down	down	0	0	12,99	15,11	16,09

	Z,17Z)/19:1(9Z))							
14	Sphingosine	down	down	2,76	2,52	16,95	16,73	16,82
15	PE(17:1(9Z)/20:0)	down	down	0	0	17,54	17,60	18,11
16	PS(21:0/22:1(11Z))	down	down	0	0	16,39	16,40	16,89
17	PI(22:2(13Z,16Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	down	down	0	0	16,13	15,95	15,66
18	PS(16:0/19:0)	down	down	0	0	17,23	17,30	17,70
19	Arg Met Met	down	down	14,92	16,68	17,28	17,21	11,03
20	PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))	up	up	16,23	16,33	0	0	0

Somente o álcool 4-Ethylphenol se apresenta com super regulação no grupo positivo com dor elevada (HS) em relação ao grupo positivo com dor leve a moderada (MMS) e nenhum composto se encontra em baixa regulação no grupo CHIKV+ HS em relação ao CHIKV+ MMS.

Ao comparar o CHIKV+ HS com o CHIKV- HS, nota-se que 14 compostos lipídicos e o álcool 4-Ethylphenol se apresentam com baixa regulação no primeiro grupo em relação ao segundo e o PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) encontra-se 16,23 vezes maior em CHIKV+ HS comparado ao CHIKV- HS. Nota-se então que, assim como no M0, há maior diferença de alterações metabólicas ao se comparar sujeitos positivos e negativos para chikungunya do que ao se comparar ambos os grupos positivos (HS e MMS), mesmo que a intensidade da dor seja diferente.

Catorze compostos lipídicos e o álcool 4-Ethylphenol apresentaram-se reduzidos nos sujeitos CHIKV+ MMS em relação ao CHIKV- MMS. Nenhum composto apresentou-se super regulado na comparação dos dois grupos em questão.

Na comparação com o grupo controle, o grupo CHIKV+ HS teve apenas o PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) 16,23 vezes super regulado

e 16 composto (15 lipídios e um álcool) com baixa regulação. O grupo CHIKV+ MMS também teve apenas o PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) super regulado (16,33 vezes) e apresentou 16 compostos (15 lipídios e um álcool) com baixa regulação.

Por fim, foi realizada a média da regulação de cada um dos 20 compostos nos subgrupos de sujeitos que chegaram a fase crônica (C) e daqueles que se curaram das dores musculoesqueléticas nas fases aguda e pós-aguda (NC- non cronic), tanto nos sujeitos que resultaram positivos quanto aqueles que resultaram negativos para chikungunya. Utilizou-se também a média da regulação de cada composto no CG para fins de comparação com os outros subgrupos conforme o quadro 8 a seguir.

Quadro 8: Média da regulação de cada um dos 20 compostos encontrados estatisticamente significativos nos 5 subgrupos quanto a cronicidade

N.º	Composto	Regul CHIKV+ vs Controle	Regul CHIKV+ vs CHIVK-	Média regul CHIKV+ C (N=22)	Média regul CHIKV+ NC (N=2)	Média regul CHIKV- C (N=16)	Média regul CHIKV- NC (N=2)	Média regul CG (N=15)
1	DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	down	down	0	0	14,08	15,99	16,32
2	PI(O-20:0/21:0)	down	down	0	0	14,47	15,70	15,74
3	Dexpanthanol	down	down	0	0	0	0	17,64
4	PG(18:4(6Z,9Z,12Z,15Z)/22:1(11Z))	down	down	0	0	13,06	15,25	15,21
5	4-Ethylphenol	down	down	1,40	0	17,73	17,76	17,45
6	Phytosphingosine	down	down	15,50	8,69	18,66	19,04	18,47
7	Xestoaminol C	down	down	13,61	15,51	18,11	17,60	17,66
8	12-oxo-10Z-octadecenoic acid	down	down	0	0	3,89	0	18,45

9	PI(20:5(5Z, 8Z, 11Z, 14 Z, 17Z)/22: 4(7Z, 10Z, 13Z, 16Z))	down	down	0	0	14,53	6,94	14,85
10	PI(12:0/21: 0)	down	down	0	0	9,81	6,93	15,82
11	PI(19:1(9Z)/22:6(4Z, 7 Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z))	down	down	0	0	13,27	0	16,78
12	PI- Cer(t20:0/1 8:0(2OH))	down	down	0	0	17,33	15,87	17,68
13	PI(20:5(5Z, 8Z, 11Z, 14 Z, 17Z)/19: 1(9Z))	down	down	0	0	14,51	7,17	16,09
14	Sphingosin e	down	down	2,82	0	16,94	16,43	16,82
15	PE(17:1(9 Z)/20:0)	down	down	0	0	17,72	16,23	18,11
16	PS(21:0/22 :1(11Z))	down	down	0	0	16,58	14,90	16,89
17	PI(22:2(13 Z, 16Z)/20: 5(5Z, 8Z, 11 Z, 14Z, 17Z))	down	down	0	0	16,22	14,91	15,66
18	PS(16:0/19 :0)	down	down	0	0	17,41	16,02	17,70
19	Arg Met Met	down	down	13,75	17,00	17,31	16,89	11,03
20	PA(22:6(4 Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19 Z)/20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14 Z))	up	up	14,81	16,11	0	0	0

Phytosphingosine e Sphingosine se apresentam com super regulação no grupo positivo crônico (C) em relação ao grupo positivo não crônico (NC) e nenhum composto se encontra em baixa regulação no grupo CHIKV+ C em relação ao CHIKV+ NC.

Ao comparar o CHIKV+ C com o CHIKV- C, nota-se que 14 compostos lipídicos e o álcool 4-Ethylphenol se apresentam com baixa regulação no primeiro

grupo em relação ao segundo e não há nenhum composto em super regulação. Nota-se então que, assim como no M0 e na variável dor, a variável cronicidade também apresenta maior quantidade de metabólitos alterados ao se comparar sujeitos positivos e negativos para chikungunya do que ao se comparar ambos os grupos positivos (C e NC).

Apenas o lipídio PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) apresentou-se super regulado nos sujeitos CHIKV+ NC em relação ao CHIKV- NC. Catorze compostos lipídicos e o álcool 4-Ethylphenol apresentaram-se reduzidos na comparação dos dois grupos em questão.

Na comparação com o grupo controle, o grupo CHIKV+ C teve apenas o PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) 14,81 vezes super regulado e 16 composto (15 lipídios e um álcool) com baixa regulação. O grupo CHIKV+ NC também teve apenas o PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)) super regulado (16,11 vezes) e apresentou 17 compostos (16 lipídios e um álcool) com baixa regulação.

6.4 Vias perturbadas

Após a identificação de compostos desregulados durante a infecção, fez-se a correlação destes com as vias perturbadas através de pesquisa na literatura. O quadro 9 a seguir mostra as vias perturbadas e os compostos envolvidos em cada uma delas no M0. No M1 da doença foram identificadas como perturbadas as mesmas vias do M0, acrescentando-se a biossíntese da cardiolipina, conforme descrito no quadro 10.

Quadro 9: Vias perturbadas durante a infecção por CHIKV no M0 e respectivos compostos envolvidos na perturbação

Via perturbada	Compostos envolvidos
Metabolismo dos ácidos graxos	• DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
<i>De Novo Biosynthesis</i> dos triglicerídeos	• DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
Biossíntese da fosfatidilcolina	• DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)

Biossíntese da fosfatidiletanolamina	<ul style="list-style-type: none"> DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
Ciclo do TCA	<ul style="list-style-type: none"> DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0) Dexpanthenol
Biossíntese do pantotenato e da CoA	<ul style="list-style-type: none"> Dexpanthenol
Metabolismo do amido e da sacarose	<ul style="list-style-type: none"> Sphingosine

Quadro 10: Vias perturbadas durante a infecção por CHIKV no M1 e respectivos compostos envolvidos na perturbação

Via perturbada	Compostos envolvidos
Metabolismo dos ácidos graxos	<ul style="list-style-type: none"> DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
<i>De Novo Biosynthesis</i> dos triglicerídeos	<ul style="list-style-type: none"> DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0) PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))
Biossíntese da fosfatidilcolina	<ul style="list-style-type: none"> DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
Biossíntese da fosfatidiletanolamina	<ul style="list-style-type: none"> DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)
Ciclo do TCA	<ul style="list-style-type: none"> DG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/22:5(7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0) Dexpanthenol
Biossíntese do pantotenato e da CoA	<ul style="list-style-type: none"> Dexpanthenol
Metabolismo do amido e da sacarose	<ul style="list-style-type: none"> Sphingosine
Biossíntese da cardiolipina	<ul style="list-style-type: none"> PA(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))

7 DISCUSSÃO

Há apenas um estudo publicado no mundo inteiro envolvendo metabolômica para compreensão da infecção por CHIKV. O mesmo foi realizado nas cidades de Nova Delhi e Mumbai na Índia no ano de 2016 por SHRINET e colaboradores. Logo, o presente trabalho é o primeiro no Brasil e o segundo do mundo a procurar identificar as alterações metabólicas dos sujeitos acometidos por chikungunya.

Na análise metabolômica do presente estudo, 13 compostos foram detectados em sub-regulação durante o M0 no CHIKV+ em relação ao CHIKV- e ao CG, sendo que 12 deles são lipídios.

Devido à escassez de estudos de metabolômica com o CHIKV, é válido comparar o presente trabalho com outros que avaliaram alterações metabólicas em doenças similares.

Diversos estudos metabolômicos da infecção por DENVs demonstraram que os acometidos apresentam alterações na regulação de lipídios, muitos deles presentes na composição da membrana celular (glicerofosfolipídios e esfingolipídios), corroborando com os achados deste estudo, uma vez que dengue também é uma arbovirose e com sintomatologia similar com a fase aguda de chikungunya. Fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS) e esfingomiéline (SM) são os principais componentes das membranas celulares. No soro, os ácidos graxos esterificados são encontrados principalmente em ésteres de colesterol, triacilgliceróis e glicerofosfolipídios (BRADBURY *et al.*, 2019; CALDER; GRIMBLE, 2002; IUPAC, c2022; TALLIMA; EL RIDI, 2018; VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008).

KHEDR *et al.* (2015) utilizaram lipidômica GC-MS direcionada para analisar ácidos graxos esterificados no sangue de pacientes com dengue na Arabia Saudita em 2015 e detectaram uma reduzida importante da maioria dos ácidos graxos em comparação com o sangue de um grupo de voluntários saudáveis. Nos estudos de CUI *et al.* (2013) na Singapura através de lipidômica GC-MS e VOGEL *et al.* (2016) na Nicarágua e no México utilizando metabolômica HILIC-MS, foram encontrados glicerofosfolipídios séricos reduzidos durante a infecção por vírus Dengue. Sendo assim estes três estudos de dengue corroboram com os achados do presente estudo sobre chikungunya.

Os ácidos graxos são liberados dos glicerofosfolipídeos pelas fosfolipases produzindo lisofosfolipídios (LPL). Os ácidos graxos são então conjugados à coenzima A (CoA). A gordura acil é ligada a carnitina para transporte para a matriz mitocondrial, onde podem sofrer oxidação gerando acetil-CoA. O acetil-CoA pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para gerar NADH que irá produzir trifosfato de adenosina (ATP) durante a fosforilação oxidativa, ou o acetil-CoA pode ser usado para construir novos ácidos graxos e glicerofosfolipídios (SHINDOU *et al.*, 2009).

Produtos de β -oxidação, incluindo acetil-CoA, podem ser usados para produzir ácidos graxos e glicerofosfolipídios que compõem as novas membranas que os flavivírus induzem a abrigar seus complexos de replicação. As membranas são importantes para cada parte dos ciclos de vida de flavivírus e togavírus, incluindo entrada, replicação, montagem e saída (KNIPE; HOWLEY, 2013; ZHANG *et al.*, 2018).

Os glicerofosfolipídios, durante a infecção, são elevados dentro das células humanas e reduzidos no soro do hospedeiro, provavelmente devido à utilização intracelular dos glicerofosfolipídios, esgotando-os no soro. A infecção altera os níveis de glicerofosfolipídios que curvam as membranas e/ou controlam a fluidez da destas, como PI, PE, LPL e esfingolipídios. Flavivírus e togavírus necessitam de membranas curvas e flexíveis para as esférulas de replicação e envelopes de vírions (CHOTIWAN *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2013; KHEDR *et al.*, 2015; LIEBSCHER *et al.*, 2018; MCMAHON; BOUCROT, 2015; VOGÉ *et al.*, 2016; WEAVER *et al.*, 2018).

No M0, ao se comparar o CHIKV+ HS com CHIKV- HS, CHIKV+ MMS com CHIKV- MMS e CHIKV+ C com o CHIKV- C, detectou-se que vários destes lipídeos encontraram-se reduzidos nos primeiros grupos em relação aos segundos, o que demonstra que essa sub-regulação ocorre em favor da perpetuação do CHIKV e que contribuem para progressão para a fase crônica.

Dez lipídios que estavam em sub-regulação no M0 continuaram assim no M1, demonstrando que o vírus persiste consumindo estes lipídios no interior da célula a qual ele invadiu e esgotando os mesmos no soro. Mesmo porque, conforme estes lipídios são importantes para a entrada, replicação, montagem e saída dos novos vírus gerados. No M1, também se nota diversos compostos lipídicos com baixa regulação na comparação do CHIKV+ HS com o CHIKV- HS e no CHIKV+ MMS em relação ao CHIKV- MMS.

Além disso, a liberação de ácidos graxos poli-insaturados de seu reservatório de glicerofosfolipídios estimulam a produção aumentada de moléculas de sinalização

pró e anti-inflamatórias, como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, lipoxinas e resolvinas. Isso justificaria a super regulação de *17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide* (17-phenyl trinor PGF2 α -SA) no grupo CHIKV+ no M0 pois, apesar de a atividade biológica deste composto não ter sido bem definida ainda, ele é um monoglicerídeo endógeno que pode ser metabolizado pela COX-2 para formar ésteres 2-glicerílicos de prostaglandina (PG), substância de caráter pró-inflamatório, o que seria compatível com o quadro de dor apresentado pelos pacientes com chikungunya, logo o 17-phenyl trinor PGF2 α -AS é um possível biomarcador de dor do momento inicial de fase aguda de chikungunya. Ao se comparar o CHIKV+ HS com o CHIKV-HS, nota-se que o 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide apresenta-se com, em torno, o dobro de regulação no primeiro grupo em relação ao segundo. (CALDER; GRIMBLE, 2002; DAS, 2006; KOZAK; CREWS; MORROW, 2002).

O peptídeo Gln Arg Phe encontra-se 4,74 vezes maior em CHIKV+ HS comparado ao CHIKV- HS. Trata-se de um peptídeo que tem alta atividade de inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) e age com hipotensor. Como se encontra reduzido no CHIKV+, é sugestivo de que a infecção por CHIKV aumente a pressão arterial ou ao menos dificulte o seu controle. Em trabalho anterior com o mesmo grupo de pacientes positivos para CHIKV, notou-se que os sujeitos que possuíam hipertensão arterial como comorbidade prévia, apresentavam uma piora da mesma durante a infecção (MONTALBANO, 2017; PUBCHEM, c2022).

Diversos estudos sugerem que alguns fatores pré-existent ou que ocorrem na fase aguda, ou antes mesmo da infecção, se encontram relacionados com a cronicidade e com a artralgia persistente, são eles sexo feminino, idade avançada, intensidade de algumas manifestações da fase aguda (febre alta, artrite em seis ou mais articulações, depressão e viremia alta), falta de repouso durante os primeiros dias da doença, o não tratamento da dor inicial e a pré-existência de comorbidades musculoesqueléticas e hipertensão (CUNHA; TRINTA, 2017; GERARDIN *et al.*, 2013; JAIN, *et al.*, 2017; MONTALBANO, 2017; SCHILTE, *et al.*, 2013; SIMON *et al.*, 2015; SISSOKO *et al.*, 2009).

Isso ressalta a importância da realização precoce de tratamento da dor musculoesquelética, uma vez que o não tratamento pode colaborar com a cronicidade. Sendo assim, se o 17-phenyl trinor PGF2 α -AS é um biomarcador de dor, logo ele também seria um biomarcador de cronicidade, uma vez que a gravidade da dor na fase inicial da doença é um fator que colabora com a cronicidade. Na comparação do

CHIKV+ C com o CHIKV- C, nota-se que o 17-phenyl trinor Prostaglandin E2 serinol amide mostrou-se com super regulação em cerca de 2 vezes no primeiro grupo em relação ao segundo. O Gln Arg Phe é um biomarcador de cronicidade, uma vez que sua *down regulation* pode gerar ou piorar hipertensão, conforme mencionado anteriormente. Inclusive, ao se comparar o grupo positivo crônico (C) em relação ao positivo não crônico (NC) no M0, verificou-se baixa regulação de 2,76 deste peptídeo, confirmando assim a relação de sua *down regulation* na fase inicial da doença com a cronicidade.

O 17-phenyl trinor PGF2 α -AS deixa de estar super regulado no M1. CUI et al. colaboradores demonstraram em soros humanos que alguns distúrbios metabólicos induzidos por DENVs são maiores no início da infecção, e lentamente retornam a níveis saudáveis ao longo do tempo, o que também acontece com chikungunya, mesmo havendo as fase crônica, pois a viremia pode durar até 14 dias, o que justificaria a redução das alterações metabolômicas de alguns compostos na segunda parte da fase aguda (M1) (BRITO *et al.*, 2020; CUI *et al.*, 2013; MONTALBANO, 2017; THE HUMAN METABOLOME DATABASE, c2022; THIBERVILLE *et al.*, 2013).

Em relação aos demais composto da fase M0, não foi possível estabelecer na literatura o porquê exatamente da alteração da regulação de alguns deles. Sabe-se que o *perflutren* é um composto oriundo do plasma humano e é utilizado para produzir contraste para diagnóstico. O seu aumento no grupo CHIKV+ pode ser apenas um artefato da análise no espectrômetro de massa como também poderia ser um biomarcador de dor e/ou febre, uma vez que se eleva somente no primeiro momento da fase aguda e se estabiliza no momento seguinte. O composto Arg Met Met é um peptídeo sem ação biológica definida (THE HUMAN METABOLOME DATABASE, c2022).

SHRINET *et al.* (2016) agruparam amostras de soro sanguíneo humano em mono-infectadas para dengue, mono-infectadas para chikungunya e co-infectadas. Eles identificaram nas amostras infectadas por CHIKV nove metabólitos com *up regulation* (Azelaic acid, Mandelic acid, Methylguanidine, D-Maltose, Ethanol, 2-Hydroxycaproic acid, Gluconolactone, Carnitine e Galactitol) e dois metabólitos (Ethanolamine, 1,3-Diaminopropane) com *down regulation* em relação ao grupo controle. Nas amostras infectadas por DENV, doze metabólitos foram encontrados com aumento em seus níveis (Dimethylglycine, 2-ketobutyric acid, D-Serine, Glyceric acid, D-Mannose, Myoinositol, Sucrose, D-maltose, β -D-Fructose, Oxaloacetic Acid,

Formic Acid, Gluconolactone e Methylmalonic acid) e dois (N-Methyl-aminoisobutyric acid e Sarcosine) foram encontrados em níveis reduzidos quando comparados ao conjunto saudável.

Para verificar a semelhança e/ou diferença entre os achados do presente estudo e do estudo de SHRINET *et al.* (2016), verificou-se se havia componentes igualmente identificados em ambos os estudos tomando-se o cuidado de analisar todos os sinônimos que cada substância pudesse apresentar.

Nenhum dos metabólitos alterados neste estudo, tanto na fase M0 como na fase M1, foi igual aos metabólitos alterados no estudo indiano, tanto na comparação com as amostras de dengue como com as amostras de chikungunya. Existem explicações científicas palpáveis para a ausência de semelhança na identificação dos biomarcadores.

É difícil construir um perfil generalizado das alterações metabólicas induzidas por qualquer vírus. Os estudos de metabolômica podem variar em muitos aspectos, desde os aspectos estatisticamente significantes, até mudanças nos níveis de metabólitos. Diferença entre os resultados dos estudos podem surgir devido a diversidades nas amostras, tempos de coleta e métodos de preparação, controles, genótipos de vírus, populações de hospedeiros (incluindo genética e dieta), estágio da doença, métodos de coleta de dados e métodos analíticos (BYERS *et al.*, 2019).

O presente estudo difere do indiano na metodologia analítica. SHRINET *et al.* (2016) realizaram as análises do metaboloma por ressonância magnética nuclear (RMN) de todas as fases de chikungunya, utilizando um *fold change* > 2 e valor de $p < 0,05$. Em nosso estudo as amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência hifenado ao Espectrômetro de Massa (CLAEM/EM), utilizando um *fold change* > 5 e valor de $p < 0,01$ e envolve somente a fase aguda, porém de modo mais detalhado, a qual fora dividida em duas partes e as amostras foram segregadas em quatro subgrupos quantos às condições clínicas e cronicidade das dores musculoesqueléticas: dor elevada (HS- *High Severity*), dor leve a moderada (MMS- *Mild to Moderate Severity*), Crônico (C) e Não Crônico (NC). Sendo assim, este estudo é o primeiro do mundo a detalhar assim tanto as alterações metabolômicas da fase aguda e compará-las às alterações clínicas.

A RMN possui baixa sensibilidade e seletividade, enquanto MS é uma abordagem mais comumente utilizada para estudos tanto direcionados como não direcionados, apresentando maior sensibilidade e seletividade, bem como a

capacidade de detectar mais metabólitos em uma única execução do que NMR. Além disso, o MS combinado com um método de separação cromatográfica, como cromatografia líquida (LC), utilizada no presente estudo, melhora a resolução e é capaz de separar e detectar uma grande variedade de moléculas e, portanto, geralmente bem adequado para análises *untargeted* de moléculas biológicas (EMWAS, 2015; RIEKEBERG; POWERS, 2017).

Não há um método de normalização padronizado para realização de estudos metabolômicos, o que leva bastante a variação de resultados. A *Metabolomics Standards Initiative* (MSI), criada para orientar técnicas analíticas e práticas de relatório, é um excelente passo em direção à padronização dos métodos da metabolômica. No entanto, o MSI não é abrangente e exigirá atualizações adicionais à medida que o campo progride (NUNES; CANUTO, 2020; SUMNER *et al.*, 2007).

Por fim, ambos os estudos utilizaram amostras de soro humano com infecção confirmada por CHIKV, porém são duas populações geograficamente, geneticamente e culturalmente diversas.

Em relação à identificação das vias perturbadas, o presente estudo identificou no M0 a via *De Novo Biosynthesis* dos triglicerídeos, biossíntese da fosfatidilcolina, biossíntese da fosfatidiletanolamina e biossíntese do pantotenato e da CoA, sendo que estas vias alteram também a via do metabolismo dos ácidos graxos, a qual de consequência também atinge o ciclo do citrato ou ciclo do ácido tricarbóxico ou ciclo de Krebs (ciclo do TCA). Também houve alteração do metabolismo do amido e da sacarose. No M1 da doença foram identificadas como perturbadas as mesmas vias do M0, acrescentando-se a biossíntese da cardiolipina.

Mesmo não havendo semelhança dos compostos identificados no presente estudo e aqueles encontrados por SHRINET e colaboradores, pode-se notar semelhanças nas vias perturbadas. Os autores do trabalho indiano identificaram que durante a infecção pelo CHIKV, estão perturbadas a via metabólica da Glicina, serina e treonina, a via do metabolismo da galactose e o ciclo do TCA. No mesmo trabalho, a análise das vias perturbadas por DENVs revelou seis vias significativamente reguladas, sendo elas o metabolismo da glicina, serina e treonina, metabolismo da galactose, metabolismo do amido e da sacarose, metabolismo de glioxilato e dicarboxilato, via da pentose fosfato e metabolismo do propanoato (SHRINET *et al.*, 2016).

Alterações no ciclo do TCA são esperadas, dados os altos requisitos de energia do CHIKV para multiplicação rápida e geração de blocos de construção biossintéticos para lipídios, proteínas e RNA, sendo assim é compreensível que vias complementares ao ciclo do TCA também estejam alteradas, como ocorreu com o metabolismo dos ácidos graxos, *De Novo Biosynthesis* dos triglicerídeos, biossíntese da fosfatidilcolina, biossíntese da fosfatidiletanolamina, biossíntese do pantotenato e da CoA. A perturbação do metabolismo do amido e da sacarose, cujo composto *Sphingosine* se encontra envolvido, também ressalta a alta demanda energética realizada pelo vírus. Esfingosina se apresenta com super regulação no grupo positivo crônico (C) em relação ao grupo positivo não crônico (NC) no M1 (BYERS *et al.*, 2019).

Muitas destas perturbações ocorrem em ambos os momentos da fase aguda de chikungunya, demonstrando que o vírus continua fazendo alterações energéticas na célula para favorecer sua sobrevivência e replicação. O ciclo geral do TCA é afetado por monoinfecções de CHIKV e em coinfeção com dengue, podendo levar o sujeito acometido à privação de energia, o que justifica a fadiga e prostração apresentada por eles (BYERS *et al.*, 2019; SHRINET *et al.*, 2016).

SHRINET *et al.* também detectaram perturbações da via da biossíntese do pantotenato e da CoA, corroborando com o presente estudo. Além disso, constataram que esta perturbação está ligada diretamente a artralgia e artrite geradas pela doença e que apresentar uma VAS mais alta refletia maior cronicidade e uma apresentação mais grave da doença. O trabalho de SHRINET *et al.* evidencia características moleculares similares entre artralgia induzida por CHIKV e artrite reumatoide (SHRINET *et al.*, 2016).

O dexpanthenol é um composto envolvido na perturbação da via do ciclo do TCA e da biossíntese do pantotenato e da CoA. Trata-se de um álcool derivado do ácido pantotênico, um componente das vitaminas do complexo B e essencial para o epitélio em funcionamento normal. Também é precursor de Coenzima A e está envolvido na produção da Acetilcolina. Sua baixa regulação no CHIKV+ influencia diretamente no metabolismo dos ácidos graxos e reduz a produção de acetilcolina, podendo levar a hiperatividade, déficit de atenção e hipertensão, sendo esta última muito comum como comorbidade pré-existente e há piora dela com a infecção pelo CHIKV e, conforme já explicado, o aumento da pressão arterial contribui para a gravidade da artralgia e cronicidade dela (GOODMAN & GILMAN, 2012; MONTALBANO, 2017; PUBCHEM, c2022).

Sendo assim, o dexpanthenol encontrado em *down regulation* em ambos os momentos da fase aguda do presente estudo, seria também um biomarcador de gravidade da artralgia e de cronicidade assim como o 17-phenyl trinor PGF2 α -AS.

A cardiolipina, também conhecido como difosfatidilglicerol, é um grupo de glicerofosfolípidios que pode ser encontrado na membrana mitocondrial de organismos eucarióticos. Sua função é estabilizar e acomodar proteínas transmembranares nas bicamadas lipídicas. A perturbação de sua biossíntese é útil para o CHIKV uma vez que ele necessita de modulações na membrana celular para poder entrar e sair da célula como explicado anteriormente. Além disso, a cardiolipina atua também no metabolismo dos ácidos graxos e influencia no prosseguimento para o ciclo do TCA (MURRAY *et al.*, 2009).

Sendo assim o composto PA (22:6 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z) /20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)), que, ao estar reduzido no soro, perturba a via da biossíntese da cardiolipina, é um biomarcador de cronicidade, pois é sinal de que o vírus continua utilizando lipídios no interior da célula a seu favor, facilitando a continuação dos sintomas musculoesqueléticos no M1.

Por fim, deve ainda ser realizada a análise de fragmentação dos compostos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas, para que seja feita a confirmação dos resultados obtidos nos bancos de dados disponíveis online, bem como na literatura.

8 CONCLUSÃO

De acordo com os ensaios laboratoriais realizados pode-se concluir que:

- O CHIKV utiliza demasiadamente lipídios dentro da célula hospedeira, esgotando-os do soro. Esta utilização é importante para que ele possa arquitetar as membranas celulares, facilitando a sua entrada e saída e ter fonte de energia para replicação e sobrevivência intracelular. A consequência disto é que diversos compostos lipídicos se encontram em *down regulation* no soro nos momentos M0 e M1 nos sujeitos CHIKV+ em relação ao CHIKV- e ao CG.

- Foram identificados biomarcadores indicativos de dor e cronicidade no presente estudo: o *up regulation* do 17-phenyl trinor PGF₂α-AS é um biomarcador de dor e de cronicidade; o *down regulation* do peptídeo Gln Arg Phe é um biomarcador de cronicidade; o *down regulation* do dexpanthenol é um biomarcador de gravidade da artralgia e de cronicidade; e o *down regulation* do PA (22:6 (4Z, 7Z, 10Z, 13Z, 16Z, 19Z) /20:4(5Z, 8Z, 11Z, 14Z)) é um biomarcador de cronicidade.

- Foram detectadas no M0 como perturbadas as seguintes vias: *De Novo Biosynthesis* dos triglicerídeos, biossíntese da fosfatidilcolina, biossíntese da fosfatidiletanolamina, biossíntese do pantotenato e da CoA, metabolismo dos ácidos graxos, ciclo do TCA e metabolismo do amido e da sacarose. No M1 houve alteração das mesmas vias do M0, acrescentando-se a via da biossíntese da cardiolipina. Esta perturbação adicional permite que o vírus consiga continuar a utilizar os lipídios a seu favor dentro das células e colabora para a cronicidade da doença.

As alterações metabólicas descritas no presente estudo podem levar a elucidação de fatores ainda desconhecidos na fisiopatologia da doença, sendo útil para melhor compreensão da infecção, o que pode melhorar o manejo dos doentes, oferecendo-lhes melhor qualidade de vida durante o tratamento e evitar as fases subsequentes desta enfermidade. Estudos subsequentes serão realizados para a confirmação dos resultados do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, R.E.M.; BARREIRA, I. M. A.; LIMA, L. N. C.; RABELO, L. P.; PEREIRA, F. B. A. Neurite óptica bilateral após infecção viral por dengue: relato de casos. **Arq Bras Oftalmol.** v. 73, n. 2, p. 175-178. Apr. 2010.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. **BioMed Research International.** n. 1, p. 1-11. Jul. 2013.
- BLAZON, T. A. Genômica: a ciência que rompe fronteiras e desafia os cientistas. **Jornal da USP.** 2018. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/ciencias/genomica-a-ciencia-que-rompe-fronteiras-e-desafia-os-cientistas/>> Acesso em: 19 de junho de 2021.
- BOONSTRA, A. M.; PREUPERB, H.R. S.; RENEMAN, M. F.; POSTHUMUS, J. B.; STEWART, R. E. Reliability and validity of the visual analogue scale for disability in patients with chronic musculoskeletal pain. **International Journal of Rehabilitation Research** v. 31 n. 2, p. 165-169. Jan. 2008.
- BORGHERINI, G.; POUBEAU, P.; STAIKOWSKY, F.; LORY, M.; LE MOULLEC, N.; BECQUART, J. P.; WENGLING, C.; MICHAULT, A.; PAGANIN, F. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. **Clinical Infectious Diseases** n. 44, p.1401–1407. Apr. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue.** Brasília, 2009. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_nacionais_prevencao_controle_dengue.pdf> Acesso em: 22 jul. 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre de chikungunya: manejo clínico.** Brasília, 2015b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 9 de 2022.** Brasília, 2022.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 21, 2021.** Brasília, 2021a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 52, 2019.** Brasília, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020.** Brasília, 2021b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2016.** Brasília, 2017a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015.** Brasília, 2016a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017.** Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2018.** Brasília, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 53, 2014.** Brasília, 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Notificação de casos de Chikungunya no Brasil, 2014.** Brasília, 2014 a. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/linksdeinteresse/1073chikungunya/15386-notificacao-de-casos>> Acesso em: 8 nov. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Chikungunya: manejo clínico.** Brasília: Ministério da Saúde, Brasília, 2017b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança.** 5ª ed. Brasília, 2016b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Preparação e resposta à introdução do vírus Chikungunya no Brasil,** 2014. Brasília, 2014 b.

BRASIL. Sociedade Brasileira de Reumatologia. **Recomendações da sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya.** 5 jan. 2017c.

BRADBURY, K. E.; SKEAFF, C. M.; CROWE, F. L.; GREEN, T. J.; HODSON, L. Serum fatty acid reference ranges: Percentiles from a New Zealand national nutrition survey. **Nutrients.** n. 3, p. 152–163. 2011.

BRITO, C. A.; CORDEIRO, M. T. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 49, n. 5, p. 537-543, Sep./Oct. 2016.

BRITO, C. A. A.; SOHSTEN, A. K. A. V.; LEITÃO, C. C. S.; BRITO, R. C. C. M.; VALADARES, L. D. A.; FONTE, C. A. M.; MESQUITA, Z.B.; CUNHA, R. V.; LUZ, K.;

LEÃO, H. M. C.; BRITO, C. M.; FRUTUOSO, L. C. V. Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline. **Rev Soc Bras Med Trop** v. 49, n. 6, p. 668-679, Nov-Dec, 2016.

BYERS, N. M.; FLESHMAN, A. C.; PERERA, R; MOLINS, C. R. Metabolomic Insights into Human Arboviral Infections: Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses. **Viruses**. v. 11, n. 225, p.1-30. 2019.

CAGLIOTI, C.; LALLE, E.; CASTILLETI, C.; CARLETTI, F.; CAPOBIANCHI, R.; BORDI L. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiologica**, v. 36, n. 3, p. 211-227/ Jul. 2013.

CALDER, P. C.; GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur. J. Clin. Nutr.** n. 56 (Suppl. 3), p. S14–S19. 2002.

CALLIN, S; BENNETT, M. I. Assessment of neuropathic pain. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v. 8, n. 6, p. 210-213. May. 2008.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA, S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 192-196. Mar. 2007.

CANUTO, G. A. B; COSTAB, J. L.; CRUZ, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSENC, A.; RODRIGUES, K. T.; TAVARES, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Quim. Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CANUTO, G. A. B; CRUZ, P. L. R.; FACCIO, A. T.; KLASSENC, A.; TAVARES, M. F. M. Neglected diseases prioritized in Brazil under the perspective of metabolomics: A review. **Electrophoresis**., v. 36, p. 2336–2347. 2015.

CARDONA-OSPINA, J. A.; HENAO-SANMARTIN, V.; PANIZ-MONDOLFI, A. E.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Mortality and fatality due to Chikungunya vírus infection in Colombia. **Journal of Clinical Virology** n. 70, p. 14–15. Jul. 2015.

CASSADOU, S; BOUCAU, S.; PETIT-SINTUREL, M.; HUC, P.; LEPARC-GOFFART I.; LEDRANS, M. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island October to December 2013. **Euro Surveillance**, v. 19, n. 13, p. 207, Apr. 2014.

CHANG, L-J.; DOWD, K. A.; MENDOZA, F. H.; SOUNDERS, J. G.; SITAR, S. *et al.* Safety and tolerability of Chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. **The Lancet**. n. 384, p. 2046–2052. 2014.

CHOTIWAN, N.; ANDRE, B. G.; SANCHEZ-VARGAS, I.; ISLAM, M. N.; GRABOWSKI, J. M. *et al.* Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue vírus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS Pathog.**, n. 14, p. e1006853. 2018.

CLETON, N; KOOPMANSA, M.; REIMERINKA, J; GODEKEA, G. J.; REUSKEN, C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol**. v. 55, n.3, p.191-203. 2012.

COLLER, B-AG.; BLUE, J.; DAS, R.; DUBEY, S.; FINELLI, L. *et al.* Clinical development of a recombinant Ebola vaccine in the midst of an unprecedented epidemic. **Vaccine**. n. 35, p. 4465–4469. 2017.

CORRÊA, P.R.L.; FRANÇA, E. Dengue hemorrágica em unidade de referência como indicador de sub-registro de casos no Município de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil, 1998. **Epidemiol. Serv. Saúde** v. 16, n. 3), p.175-184. Set. 2007.

COUDERC, T.; LECUIT, M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. **Antiviral Research** n. 121, p. 120–131. Jul. 2015.

CUI, L.; LEE, Y. H.; KUMAR, Y.; XU, F.; LU, K.; OOI, E. E.; TANNENBAUM, S. R.; ONG, C. N. Serum metabolome and lipidome changes in adult patients with primary dengue infection. **PLoS Negl. Trop. Dis.** n. 7, p. e2373. 2013.

CUI, L.; LEE, Y. H.; THEIN, T. L.; FANG, J.; PANG, J.; OOI, E. E.; LEO, Y. S.; ONG, C. N.; TANNENBAUM, S. R. Serum metabolomics reveals serotonin as a predictor of severe dengue in the early phase of dengue fever. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, n. 10, p. e0004607. 2016

CUNHA, R. V.; TRINTA K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 112, n. 8, p. 523-531, Aug. 2017.

CUNHA, R. V.; TRINTA K. S.; MONTALBANO, C. A.; SUCUPIRA, M.V.F.; de LIMA, M. M.; CERQUEIRA, E.M.; ROMANHOLI, I. H.; CRODA, J. Seroprevalence of Chikungunya Virus in a Rural Community in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Disease** v.11, n. 1, p. e0005319. Jan. 2017.

DAS, U.N. Essential fatty acids: Biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnol. J.** n. 1, p. 420–439. 2006.

DE ANDRADE, D.C; JEAN, S., CLAVELOU. P.; DALLEL, R.; BOUHASSIRA, D. Chronic pain associated with the Chikungunya Fever: long lasting burden of an acute illness. **BMC Infectious Diseases** n. 10, p. 31. 2010.

DEFILIPPIS, V. R. Chikungunya Virus Vaccines: Platforms, Progress, and Challenges. **Curr Top Microbiol Immunol.** n. 435, p. 81-106. 2022.

DRUMMOND, J. P. **Dor aguda: Fisiopatologia, Clínica e Terapêutica**. São Paulo: ATHENEU, 2000.

EDWARDS, C. J.; WELCH, S. R.; CHAMBERLAIN, J.; HEWSON, R., *et al.* Molecular diagnosis and analysis of chikungunya virus. **J Clin Virol** n. 39, p. 271–5. Aug. 2007.

EL-BACHA, T.; STRUCHINER, C. J.; CORDEIRO, M. T.; ALMEIDA, F. C. L.; MARQUES, E. T. J. R.; DA POIAN, A.T. 1H nuclear magnetic resonance metabolomics of plasma unveils liver dysfunction in dengue patients. **J. Virol.**, n. 90, p. 7429–7443. 2016.

EMWAS, A.H. The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research. **Methods Mol. Biol.**, n. 1277, p. 161–193. 2015.

FAIALACE, R.; FERNADES, F.B. **Hemograma**. São Paulo: ARTMED, 2009.

FIGUEREDO, M. L. G.; FIGUEREDO, L.T.M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 47, n. 6, p. 677-683. Nov-Dec., 2014.

FORTUNATO, J.G. S.; FURTADO, M. S.; HIRABAE, L. F. A.; OLIVEIRA, J. A. Scales of pain in the critically ill patient: an integrative review. **Revista HUPE**, v. 12, n. 3:p. 110-117. Jul- Set, 2013.

GARDNER, J.; ANRAKU, I.; LE, T. T.; LARCHER, T.; MAJOR, L. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. **J Virol**. n. 84. p. 8021–8032. 2010.

GERARDIN, P.; BARAU, G; MICHAULT, A., *et al.* Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Med**. v. 5, n. 3, p. e60. 2008.

GERARDIN, P.; FIANU, A.; MICHAULT, A.; MUSSARD, C.; BOUSSAÏD, K.; ROLLOT O., *et al.* Predictors of Chikungunya rheumatism: a prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. **Arthritis Res Ther**. n.15, p. R9. 2013.

GANONG, W. F. *Fisiologia Medica*. Padova: **PICCIN**, 2005.

GOODMAN & GILMAN. BRUNTON, L. L. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. **Editora McGraw-Hill, Artmed**, 12^a ed., 2012.

GORCHAKOV, R.; WANG, E.; LEAL, G.; FORRESTER, N. L.; PLANTE, K. *et al.* Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. **J Virol**. n. 86, p. 6084–6096. 2012.

GUYTON, A. C.; HALL J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. **Editora Elsevier**. 13^a ed., 2017.

HAESE, N. N.; BROECKEL, R. M.; HAWMAN, D. W.; HEISE, M. T.; MORRISON, T. E.; STREBLOW D. N. Animal Models of Chikungunya Virus Infection and Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, suppl. 5, p. S482–S487. Dec. 2016.

HALLENGÄRD, D.; KAKOULIDOU, M.; LULLA, A.; KÜMMERER, B. M.; JOHANSSON, D. X.; MUTSO, M.; LULLA, V.; FAZAKERLEY, J. K.; ROQUES, P.; LE GRAND, R.; MERITS, A.; LILJESTRÖM, P. Novel attenuated. Chikungunya vaccine candidates elicit protective immunity in C57BL/6 mice. **J Virol**. n. 88, p. 2858–2866. 2014.

HALSTEAD, S. B.; SUDOMSAKDI, S. S. Vertebrate hosts of chikungunya vírus. **Bull World Health Organ.**, v. 35, n.1, p. 89,1966.

HASSING, R. J. *et al.* Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **J Infect.**, v. 61, n. 4, p.343-345, Oct. 2010.

HTUN, T. P.; XIONG, Z; PANG, J. Clinical signs and symptoms associated with WHO severe dengue classification: a systematic review and meta-analysis. **Emerg Microbes Infect.** v. 10, n.1, p. 1116-1128. Dec. 2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). População residente, total, urbana total e urbana na sede municipal, com indicação de área total e densidade demográfica segundo as Unidades da federação e os municípios. BRASIL, 2010.

INSTITUTO RENÉ RACHOU. FIOCRUZ MINAS GERAIS, **Dengue**. c2021. Disponível em: <<http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/dengue/>>. Acesso em: 14 de jun. de 2021.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, (the “gold book”). Disponível em: <<https://doi.org/10.1351/goldbook>>. Acesso em: 29 de junho de 2022.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; DAS, T.; HOARAU, J. J.; TROTOT, P. K.; DENIZOT, M.; RIBERA, A.; ROQUES, P.; GASQUE, P. Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. **Microbes and Infection.** n. 11, p. 1206-1218. Oct. 2009.

JAIN, J; NAYAK, K; TANWAR, N; GAIND, R; GUPTA, B; SHASTRI, J. S., *et al.* Clinical, Serologia, and Virological Analysis of 572 Chikungunya Patients From 2010 to 2013 in India. **Clin Infect Dis.** n. 65, p. 133–140. 2017.

JAVELLE, E.; RIBERA, A.; DEGASNE, I.; GAÜZÈRE, B. A.; MARIMOUTOU, C.; SIMON, F. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLoS Neglected Tropical Disease.** v. 9, n.3, p. e0003603. Mar. 2015.

KIKUTI, M; LAURA B. TAURO, L. B.; MOREIRA, P. S. S.; NASCIMENTO, L. C. J.; PORTILHO, M. M; GÚBIO C. SOARES, G. C.; WEAVER, S. C.; MITERMAYER G. REIS, M. G.; URIEL KITRON, U; RIBEIRO, G. S. Evaluation of two commercially available chikungunya virus IgM enzyme-linked immunoassays (ELISA) in a setting of concomitant transmission of chikungunya, dengue and Zika viroses. **International Journal of Infectious Diseases**, n. 91, p. 38–43. 2020.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Fields Virology*, 6 ed. **Wolters Kluwer/LippincottWilliams &Wilkins Health**: Philadelphia, PA, USA, 2013.

KOZAK, K. R.; CREWS, B.C.; MORROW, J.D.; *et al.* Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. **J. Biol. Chem** v. 277, n.47, p. 44877-44885. 2002.

KRAUER, F. *et al.* Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barré Syndrome: Systematic Review. **PLOS Medicine**, v. 14, n. 1, Jan.

2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5207634/>. Acesso em: 06 abr. 2021.

KROLL, J. E. **Explorando a complexidade do Transcriptoma humano**. Tese (Doutorado em ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 74p. 2013.

KUAN, G.; RAMIREZ, S.; GRESH, L.; OJEDA, S.; MELENDEZ, M.; SANCHEZ, N.; COLLADO, D.; GARCIA, N.; MERCADO, J. C.; GORDON, A.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E. Seroprevalence of Anti-Chikungunya Virus Antibodies in Children and Adults in Managua, Nicaragua, After the First Chikungunya Epidemic, 2014-2015. **PLoS Neglected Tropical Disease** v. 10, n. 6, p. e0004773. Jun. 2016.

KUMAR, C. J.; BABOO, C. A.; KRISHNAN, B. U.; KUMAR, A.; JOY, S.; JOSE, T.; PHILIP, A.; SAMBASIVAIAH, K.; HEGDE, B. M. The socioeconomic impact of the chikungunya viral epidemic in India. **Open Medicine** v. 1, n.2, p. e150–e152. Out, 2007.

LANGSJOEN, R. M.; HALLER., S. L.; ROY, C. J.; VINET-OLIPHANT, H.; BERGREN, N. A. *et al.* Chikungunya virus strains show lineage-specific variations in virulence and cross-protective ability in murine and nonhuman primate models. **mBio**. n. 9, p.e02449–17–13. 2018.

LARRIEU, S.; POUDEROUXB, N.; PISTONEB, T.; FILLEUL, L.; RECEVEUR M. C.; DAOUDA SISSOKO, D.; EZZEDINE, K.; MALVY, D. Factors associated with persistence of arthralgia among chikungunya virus-infected travellers: Report of 42 French cases. **Journal of Clinical Virology** n.47, p.85–88. Jan. 2010.

LEDRANS, M.; QUATRESOUS, I.; RENAULT, P.; PIERRE, V. Outbreak of chikungunya in the French Territories, 2006: lessons learned. **Euro Surveillance**, v. 12, n. 36, p. 3262, Sep. 2007.

LEVITT, N.H.; RAMSBURG, H. H.; HASTY, S. E.; REPIK, P. M.; COLE, F. E.; LUPTON, H. W. Development of an attenuated strain of Chikungunya virus for use in vaccine production. **Vaccine**. n. 4, p. 157–162. 1986.

LEVY, C. A proteômica e os novos paradigmas. **Jornal da UNICAMP**. Nov. 2005.

LIEBSCHER, S.; AMBROSE, R. L.; AKTEPE, T. E.; MIKULASOVA, A.; PRIER, J. E.; GILLESPIE, L. K.; LOPEZ-DENMAN, A. J.; RUPASINGHE, T. W. T.; TULL, D.; MCCONVILLE, M. J.; *et al.* Phospholipase A2 activity during the replication cycle of the flavivirus West Nile virus. **PLoS Pathog**. n. 14, p. e1007029. 2018.

LOOS, S.; MALLETB, H.P.; LEPARC GOFFARTC, I.; GAUTHIER, V.; CARDOSO, T.; HERIDA, M. Review: Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Médecine et maladies infectieuses** v. 44 p. 302–307. Jul. 2014.

LUM, FM; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research** n. 120, p. 165–174. Jun. 2015.

MACKENSIE, J. S.; CHUA, K. B.; DANIELS, P. W.; EATON, B. T.; FIELD, H. E.; HALL, R. A.; HALPIN, K.; JOHANSEN, C. A.; KIRKLAND, P. D.; LAM, S. K.; MCMINN, P.; NISBET, D. J.; PARU, R.; PYKE, A. T.; RITCHIE, S. A.; SIBA, P.; SMITH, D. W.; SMITH, G. A.; VAN DEN HURK, A. F.; WANG, L. F.; WILLIAMS, D. T. Emerging Viral Diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 497-504, 2001.

MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Brazilian journal of infectious disease** .v. 20, n. 1, p.91–98. Dez. 2015.

MCCMAHON, H. T.; BOUCROT, E. Membrane curvature at a glance. **J. Cell Sci.**, n. 128, p. 1065–1070. 2015.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. In: **Classification of Chronic Pain, IASP Task Force on Taxonomy**. 2. ed. Seattle: IASP Press, p. 209-214. 1994.

MOHSEN, M. O.; ZHA, L.; CABRAL-MIRANDA, G.; BACHMANN, M. F. Major findings and recente advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. **Semin Immunol.** n. 34, p. 123–132. 2017.

MONTALBANO, C. A; BEZERRA, W. S. P; RIBEIRO, K. M.; ROSA, S. B. A. Doenças Infeciosas de Relevância no Brasil. **Atena Editora**, 2021.

MONTALBANO, C. A. **Comprometimento articular agudo em pacientes com chikungunya**. Dissertação (Mestrado em doenças infecciosas e parasitárias) - Faculdade de medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS, 74 p. 2017.

MONTICELLI, G. **Fisiologia**. Milano: CASA EDITRICE AMBROSINA, 2009.

MORAES, L.; CERQUEIRA-SILVA, T.; NOBREGA, V.; AKRAMI, K.; SANTOS, L. A., *et al.* A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in Chikungunya disease: A cohort study. **Plos Neglected tropical diseases**. v. 14, n. 7, p. e0008467. 2020.

MORENS, D. M.; FAUCI, A.S. Chikungunya at the door — déjà du all over again? **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 10, p. 885-887, Sept. 2014.

MOTA, M. T. O.; TERZIAN, A. C.; SILVA, M. L. C. R.; ESTOFOLETE, C.; LACERDA NOGUEIRA, M. L. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian journal of microbiology**, n. 47S, p.38–50, Oct. 2016.

MURRAY, R.; BENDER, D.; BOTHAM, K.; KENNELLY, P.; RODWELL, V.; WEIL, P. Bioquímica ilustrada de Harper. **McGraw-Hill Medical**. 28^a ed. 2009.

NASCIMENTO, C. S. *et al.* Impacts on the epidemiological profile of Dengue amid the COVID-19 Pandemic in Sergipe. **Research, Society and Development**, v. 10, n.5, p. e3610514544, 2021.

NEGLECTED TROPICAL DISEASE. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 28 de março de 2022.

NKOGHE, D.; KASSA, R. F.; CARON, M; GRARD, G; MOMBO, I;BIKIÉ, B; PAUPY, C; BECQUART, P; BISVIGOU, U; LEROY, E. M. Clinical forms of Chikungunya in Gabon, 2010. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 2, p. 1517, 2012.

NIMMANNITYA, S.; P. Comparative clinical and laboratory findings in confirmed dengue and chikungunya infections. **Bulletin World Health Organization**, v. 35, n. 1, p. 42–43, Oct. 1966.

NUNES, E. C.; CANUTO, G. A. B. Metabolomics applied in the study of emerging arboviruses caused by *Aedes aegypti* mosquitoes: A review. **Electrophoresis**, v.41, p. 2102–2113, 2020.

OKEOMA, C. M. editor Chikungunya Virus Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment. © **Springer International Publishing Switzerland** n. 1, p. 1-202. 2016.

OLIVEIRA E. C.; FONSECA, V; XAVIER, J.; ADELINO, T; MORALES CLARO, I.; FABRI, A., *et al.* Short report: Introduction of chikungunya vírus ECSA genotype into the Brazilian Midwest and its dispersion through the Americas. **PLoS Negl Trop Dis** v.15, n. 4, p. e0009290. Apr. 2021.

OLIVEIRA, E. C. L.; PONTES, E. R. J. C.; CUNHA, R. V.; FRÓES, I. B.; NASCIMENTO, D. Alterações hematológicas em pacientes com dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 682-685, nov./dez. 2009.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Instrumento para el diagnóstico y la atención a pacientes con sospecha de arbovirosis**. Washington; OPAS, 2016.

O que é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência? **FREITAG**, c2022. Disponível em: <<https://freitag.com.br/blog/o-que-e-a-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia/>>. Acesso em: 23 de setembro de 2022.

PAL, P.; DOWD, K. A.; BRIEN, J. D.; EDELING, M. A.; GORLATOV, S. *et al.* Development of a highly protective combination monoclonal antibody therapy Against Chikungunya virus. **PLoS Pathog**. p. 9:e1003312. 2013.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. PLISA Health Information Platform for the Americas. **Cases of Chikungunya virus disease by Country or Territory Cumulative cases**. Washington: PAHO, 2022. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/chikv-en/550-chikv-weekly-en.html>>. Acesso em: 17 de março de 2022.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2017 (to week noted)**. Washington: PAHO, 2017.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Cases of Chikungunya Fever in the Americas.** Washington: PAHO, 2015.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Preparedness and response for introduction in the americas chikungunya virus.** Washington; PAHO, 2011.

PARDIGON, N. The biology of chikungunya: A brief review of what we still do not know. **Pathologie Biologie.** n. 57, p. 127–132. Jan. 2009.

PIALOUX, G.; GAÜZÈRE, B. A.; JAURÉGUIBERRY, S.; STROBEL, M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **Lancet Infectious Diseases** n. 7, p. 319–327. May. 2007.

PINTO JUNIOR, V. L.; LUZ, K.; PARREIRA, R.; FERRINHO, P. Vírus Zika: revisão para clínicos. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 28, n. 6, p. 760-765, Nov./Dec. 2015.

POWERS, A. M.; BRAULT, A. C.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viroses. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471–479, Oct. 2000.

RAMSAUER, K.; TANGY, F. Chikungunya virus vaccines: viral vector-based approaches. **J Infect Dis.** n. 214, p. S500–S505. 2016.

RIEKEBERG, E.; POWERS, R. New frontiers in metabolomics: From measurement to insight. **F1000Research.** n. 6, p. 1148. 2017.

ROQUES, P.; LJUNGBERG, K.; KÜMMERER, B. M.; GOSSE, L. *et al.* Attenuated and vectored vaccines protect nonhuman primates against Chikungunya virus. **JCI Insight.** n.2, p. e83527. 2017.

ROSS, R. W. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **The Journal of Hygiene**, v. 54, n. 1, p. 177-191/Jan. 1956.

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine & Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28–32, Jan. 1953.

RODRIGUES, N. F.; LOURENÇO, J.; DE CERQUEIRA, E. M.; DE LIMA, M. M.; PYBUS, O.; ALCANTARA L. C. J. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLOS Currents Outbreaks** n.1, p. 1-8. Fev. 2016.

SANTOS, F.J.; CARDOSO, F. O.; SILVEIRA, R.S.; OLIVEIRA, D. F.; PORTUGAL, L. G.; OLIVEIRA, J. E.; SILVA, A. M. L.; LOPES, S. M. S.; LIMA, S. R. Perfil hematológico e sorológico dos pacientes suspeitos de dengue atendidos no centro de saúde escola Germano Sinval Faria- ENSP/ FIOCRUZ durante a epidemia de 2008 no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** v. 43, n. 2, p. 89-92. 2011.

SANTOS, D. N. **Resistência “KNOCKDOWN” em mosquitos *Aedes aegypti* no Brasil e suas implicações no controle da dengue.** Monografia (Licenciatura em

Ciências Biológicas) Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação. Universidade Federal de São Carlos. Araras. p. 36. 2021.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Introdução à virologia humana. 2ed. – Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2008.

SCHILTE, C.; STAIKOVSKY, F.; COUDERC, T.; MADEC, Y.; CARPENTIER, F.; KASSAB, S., *et al.* Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. Singh SK, editor. **PLoS Negl Trop Dis**. n. 7, p. e2137. 2013.

SHAW, C.; PANTHER, L.; AUGUST, A.; ZAKS, T.; SMOLENOV, I.; BART, S.; WATSON, M. Safety and immunogenicity of a mRNA-based Chikungunya vaccine in a phase 1 dose-ranging trial. **Int J Infect Dis**. n. 79, p.17. 2019.

SHINDOU, H.; HISHIKAWA, D.; HARAYAMA, T.; YUKI, K.; SHIMIZU, T. Recent progress on acyl CoA: Lysophospholipid acyltransferase research. **J. Lipid Res.**, n. 50, S46–S51. 2009.

SIMON F.; JAVELLE E.; CABIEB A.; BOUQUILLARD E.; TROISGROS O.; GENTILE G.; LEPARC-GOFFARTF, I.; HOENG, B.; GANDJBAKHCHH, F.; RENE-CORAILD, P.; FRANCO, J.-M.; CAUMESJ, E.; COMBEK, B.; POIRAUDEAUL, S.; GANE-TROPLENTM, F.; DJOSSOUN, F.; SCHAERVERBEKEO, T.; CRIQUET-HAYOTP A.; CARREREM, P.; MALVYQ, D.; GAILLARDI, P.; WENDLING, D. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). **Médecine et maladies infectieuses** n. 45, p. 243–263. 2015.

SIMON, F.; SAVINI, H.; PAROLA, P. Chikungunya: A Paradigm of Emergence and Globalization of Vector-Borne Diseases. **Med Clin N Am** n.92, p.1323–1343. 2008.

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., Princípios de Análise Instrumental, 5ª edição, **Editora Bookman**, 2006.

SISSOKO, D.; MOENDANDZE, A.; MALVY, D.; GIRY, C.; EZZEDINE K.; SOLET, J. L.; PIERRE, V. Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005-2006: a population-based survey. **PLoS One**. v. 26, n. 3, p. 8, Aug. 2008.

SISSOKO, D.; MALVY, D.; EZZEDINE, K.; RENAULT, P.; MOSCETTI, 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** v. 3, n. 3, p. e389. Mar. 2009.

Sobre o Método Wolbachia. **WORLD MOSQUITO PROGRAM**. c2021. Disponível em: <<https://www.worldmosquitoprogram.org/brasil/sobre-o-metodo-wolbachia>> Acesso em: 22 jul. 2021.

SOKKA, T. Assessment of pain in rheumatic diseases. **Clin Exp Rheumatol** v. 23, n. 39, p. S77-S84. Out, 2005.

STAIKOWSKY, F.; TALARMIN, F.; GRIVARD, P.; SOUAB, A.; SCHUFFENECKER, I.; LE ROUX, K.; LECUIT, M.; MICHAULT, A. Prospective Study of Chikungunya Virus Acute Infection in the Island of La Réunion during the 2005–2006 Outbreak. **PLoS ONE** v4, n.10, p e7603. Oct. 2009.

SCHWARTZ, O; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Microbiol.** n. 8, p. 491-500. 2010.

SHRINET, J; SHASTRI, J. S.; GAIND, R; NEEL SAROVAR BHAVESH, N. S.; SUNIL, S. Serum metabolomics analysis of patients with chikungunya and dengue mono/co-infections reveals distinct metabolite signatures in the three disease conditions. **Sci Rep.** v.15, n.6, p. 36833. 2016.

SUMNER, L. W.; AMBERG, A.; BARRETT, D.; BEALE, M. H.; BEGER, R.; DAYKIN, C. A.; FAN, T. W.; FIEHN, O.; GOODACRE, R.; GRIFFIN, J. L.; *et al.* Proposed minimum reporting standards for Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, n. 3, p. 211–221. 2007.

TALLIMA, H.; EL RIDI, R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits—A review. **J. Adv.Res.** n. 11, p. 33–41. 2018.

TEIXEIRA, M. G; BARRETO, M. L.; GUERRA, Z. Epidemiologia e Medidas de Prevenção do Dengue. **Informe Epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p. 5-33, jun. 1999.

THIBERVILLE, S. D.; MOYEN N.; DUPUIS-MAGUIRAGA L.; NOUGAIREDE A.; GOULD E. A.; ROQUES P.; LAMBALLERIE, X. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research** v. 99 p. 345–370, Jun 2013.

TRAN, L. *et al.* Role of cytokines produced by T helper immunomodulators in dengue pathogenesis: a systematic review and meta-analysis. **Acta tropic**, 2021.

THOMPSON, E. A.; LORÉ, K. Non-human primates as a model for understanding the mechanism of action of toll-like receptor-based vaccine adjuvants. **Curr Opin Immunol.** n. 47, p.1–7. 2017.

UEHARA, P. M.; DA CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R. O. L.; DE OLIVEIRA, P. A. **Liver Involvement in Patients With Dengue Hemorrhagic Fever: A Rare Phenomenon?** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 39, n.6, p. 544-547. Nov-Dec. 2006.

VAN MEER, G.; VOELKER, D. R.; FEIGENSON, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** n. 9, p. 112–124. 2008.

VOGE, N. V.; PERERA, R.; MAHAPATRA, S.; GRESH, L.; BALMASEDA, A.; LORONO-PINO, M. A.; HOPF-JANNASCH, A. S.; BELISLE, J. T.; HARRIS, E.; BLAIR, C. D.; *et al.* Metabolomics-based discovery of small molecule biomarkers in serum associated with dengue virus infections and disease outcomes. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, n. 10, p. e0004449. 2016.

XAVIER, J.; FONSECA, V.; BEZERRA, J. F.; ALVES, M. M., *et al.* Chikungunya virus ECSA lineage reintroduction in the northeasternmost region of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. n. 105, p. 120–123. Jan. 2021.

WEAVER S.C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. **PLoS Neglected Tropical Disease** v.8, n. 6, p. e2921, Jun. 2014.

WEAVER, S. C.; CHARLIER, C.; VASILAKIS, N.; LECUIT, M. Zika, chikungunya, and other emerging vector-borne viral diseases. **Annu. Rev. Med.**, n. 69, p. 395–408. 2018.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on Clinical Management of Chikungunya Fever**. Geneve: WHO, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **DENGUE GUIDELINES FOR DIAGNOSIS, TREATMENT, PREVENTION AND CONTROL**. Geneve: WHO, 2009.

ZHANG, S.; CARRIERE, J.; LIN, X.; XIE, N.; FENG, P. Interplay between cellular metabolism and cytokine responses during viral infection. **Viruses**, n. 10, p. 521. 2018.

APÊNDICE- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UEFS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do voluntário: _____

Eu, **Rivaldo Venâncio da Cunha e Erenilde Marques de Cerqueira** (pesquisadores responsáveis) e colaboradores estamos convidando você a participar da pesquisa: ***Chikungunya no município de Feira de Santana (BA), Brasil: Estudos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de qualidade de vida.*** O objetivo dessa pesquisa é conhecer como o chikungunya, e outros vírus transmitidos por mosquitos no município de Feira de Santana, se comportam no seu corpo e como interfere na qualidade de sua vida. Se você concordar em participar da pesquisa, durante a entrevista suas respostas serão registradas pelos pesquisadores em um questionário específico. Os pesquisadores garantem que o seu nome não será revelado para ninguém, isto é, ninguém saberá que foi você quem respondeu às perguntas, buscando respeitar a sua integridade moral, intelectual, social e cultural. Caso você concorde, depois da entrevista e das consultas com a enfermeira e o médico, serão coletadas duas amostras de sangue por um técnico de laboratório, sob a supervisão dos pesquisadores. Essas amostras de sangue servirão para a realização de exames que ajudarão no tratamento de sua doença. Você receberá os resultados dos exames de sangue, os quais serão entregues pelo pesquisador nas próximas entrevistas para que possam auxiliar no seu diagnóstico e tratamento. Também assumimos o compromisso de solicitar o seu encaminhamento para outras especialidades e serviços da rede de saúde, se isso for necessário para cuidar de sua saúde.

As amostras de sangue serão coletadas de uma veia de seu braço, por meio de uma agulha descartável, respeitando-se todas as normas técnicas de biossegurança e sem nenhum risco para você, além da pequena dor que poderá acontecer no momento da coleta devido a entrada da agulha em sua veia. Existe a possibilidade de o (a) senhor (a) se constranger com as perguntas do questionário, porém este foi elaborado de

modo que elimine este problema ao máximo, de modo que você se sinta bem em responder minhas perguntas. Se você não se sentir a vontade de responder alguma questão, você pode se negar a respondê-la, podendo o questionário ser respondido de forma parcial.

Os resultados da pesquisa ajudarão a população a ter acesso a maior conhecimento sobre a chikungunya e o impacto que esta doença está causando na qualidade de vida dos doentes. Esses conhecimentos também ajudarão as autoridades de saúde na preparação de propostas para reduzir as consequências da doença.

Você poderá expor as suas opiniões sobre qualquer assunto sem receio de sofrer qualquer constrangimento ou ter dificuldade para receber o atendimento de saúde que necessita por ter feito esses comentários. Você poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento ou anular este consentimento em qualquer fase. O (a) senhor (a) não terá despesas ou qualquer pagamento por sua participação nessa pesquisa, que é livre. O seu relato só será usado nesta pesquisa e, quando ela estiver concluída, gostaríamos de apresentar seus resultados em artigos científicos em revistas especializadas e/ou em congressos científicos, se o (a) senhor (a) permitir. Lembramos que seu nome e informações pessoais não serão revelados para ninguém em **qualquer momento**.

As amostras de sangue coletadas neste estudo serão utilizadas para os exames previstos e ficarão armazenadas sob a responsabilidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro, a qual arcará também com as despesas para realização dos exames. Após o fim desse projeto, estas amostras poderão permanecer armazenadas para uso em pesquisas futuras relacionadas, se você assim autorizar. O pesquisador responsável assume os compromissos de submeter, no futuro, qualquer novo projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Uma vez aprovado algum novo projeto, o Senhor (a) será procurado para dar uma nova autorização de uso dessas amostras, por meio de novo Termo Consentimento Livre e Esclarecido.

Dessa forma, para a utilização dessas amostras em pesquisas futuras relacionadas, um novo projeto será submetido ao CEP da UESF e um novo TCLE será elaborado para seu re consentimento. Caso o CEP julgue desnecessário novo consentimento, o mesmo aprovará a utilização desse material e assumirá eticamente a realização do novo projeto.

Caso concorde com o que foi dito acima e aceite participar da pesquisa, pedimos que assine as duas vias deste documento, ficando uma cópia com o(a) senhor(a) e outra conosco. Esclarecemos que este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), que iremos obedecer à resolução 466/2012 do CNS (Conselho Nacional de Saúde) e que a entrevista só irá acontecer depois da assinatura deste documento pelo (a) senhor (a) e por nós. No momento em que houver necessidade de esclarecimento de qualquer dúvida sobre a sua participação na pesquisa, você pode entrar em contato com os pesquisadores através do telefone (075) 3224-8162 no Centro de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da UEFS – Módulo VI – NUPISC. Km-03, BR-116. Campus Universitário em Feira de Santana – BA.

Assinale a opção que corresponde a seu consentimento:

() Eu aceito participar deste estudo e **CONCORDO** em ter minhas amostras de sangue armazenadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS e para isto deverei assinar um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

ou

() Eu aceito participar deste estudo, mas **NÃO CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Feira de Santana, BA, _____ de _____ de _____.

Assinatura do entrevistado (a)

Assinatura do Pesquisador responsável pela apresentação do TCLE

ANEXO A- QUESTIONÁRIO PARA ENTREVISTA DA FASE AGUDA

DATA: ____/____/____

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO DE PESQUISA

**PROJETO DE PESQUISA; Chikungunya no município de Feira de Santana (BA), Brasil:
Estudos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de qualidade de vida.**

FASE AGUDA(até 10 dias de evolução)

Data do início dos sintomas: ____/____/____

Dados 1 - PROSPECTIVOS () 2 – RETROSPECTIVOS ()

1. DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

1. Nº registro _____ 2. Nome _____

3. Data de Nascimento: ____/____/____ 4. Idade: ____ () anos () meses

5. Sexo: 1 Masculino () 2 Feminino () 6. Ocupação:

7. Como você classificaria a sua cor da pele? 1 () Branca 2 () Parda 3 () Preta 4 () Amarela
5 () Indígena 9 () Ignorado

8. Escolaridade 0 () Analfabeto; 1 () Alfabetizado; 2 () 1ª a 4ª série incompleta; 3 () 4ª série completa;

4 () 5ª a 8ª série incompleta; 5 () Ensino fundamental completo; 6 () Ensino médio incompleto;

7 () Ensino médio completo; 8 () Educação superior incompleta; 9 () Educação superior completa;

10 () Ignorado; 11 () Não se aplica

9. Município de Residência: _____ Endereço: _____

Bairro: _____

_____ Zona: 1 () Urbana 2 () Rural UF: _____ Telefone: () _____

2. DESCRIÇÃO INICIAL DA HISTÓRIA CLÍNICA

2.1. Gestante: 1 () Sim / Trimestre gestacional _____ 2 Não () 9 Não se aplica ()

2.2. História prévia de comorbidades:

1. Diabetes 1 () Sim 2 () Não

2. Pressão alta	1 () Sim	2 () Não
3. Obesidade	1 () Sim	2 () Não
4. Artrite	1 () Sim	2 () Não
5. Artrose	1 () Sim	2 () Não
6. Problemas de coluna	1 () Sim	2 () Não
6. LER/DORT	1 () Sim	2 () Não
7. Glaucoma	1 () Sim	2 () Não
8. Outras	1 () Sim	2 () Não

3. Sintomatologia na FASE AGUDA DA DOENÇA

3.1 Febre: () sim () não _____ dias

3.2 Data do Aparecimento da Febre: _____ 4.3 Data do desaparecimento da febre

3.4 A temperatura foi aferida?

1 () sim

2 () não

3 maior valor aferido: _____

3.5 Evolução

1 () Contínua

2 () Intermitente, irregular

3 () Intermitente, vespertina

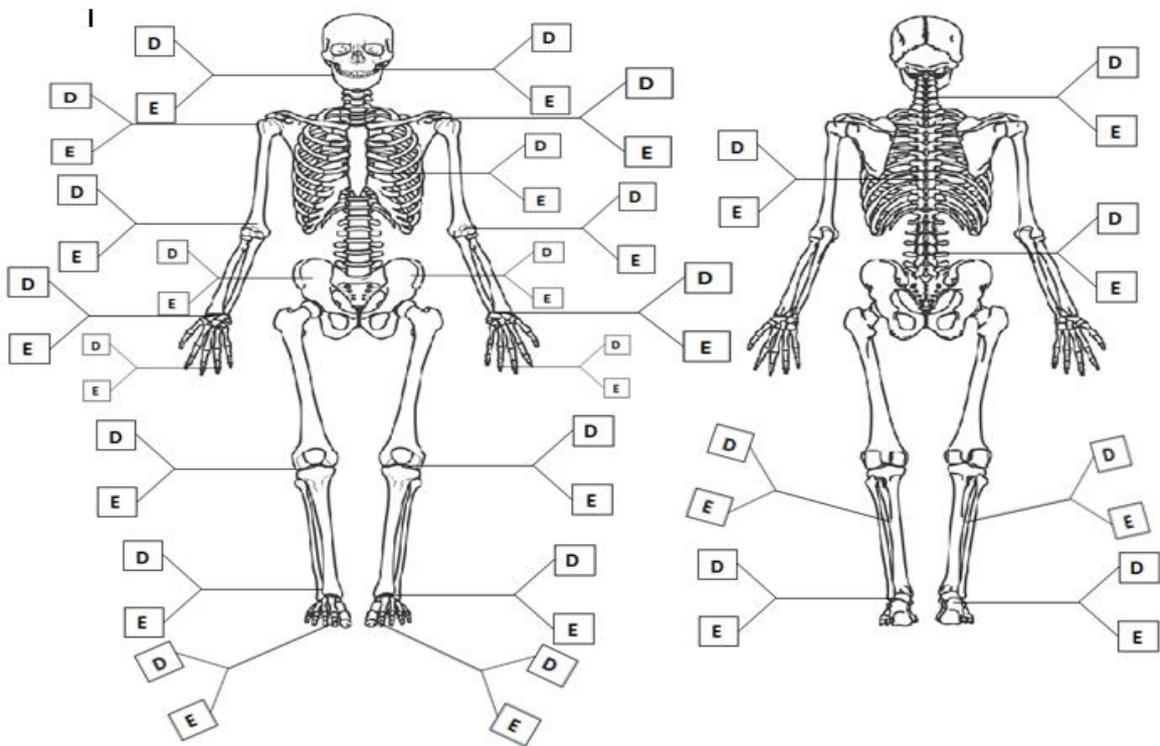
3.6 Início

() Súbito

() Gradual

MANIFESTAÇÕES GERAIS (Sim= S, Não= N):

1() Cefaleia _____ dias	2() Mialgia _____ dias	3() Dor retro-ocular
4() Linfadenopatia/gânglio cervical posterior	5() Conjuntivite/hiperemia conjuntival	6() Exantema (tipo e localização) _____ Data início: _____
7() Prurido – Data Início: _____	8() Petequias (Localização): _____	9() Náuseas
10() Vômitos _____ dias, quantos episódios por dia? _____	11() Diarreia	12() Dor abdominal
13 () Prostração (“Arriado”)	14() Sangramento _____ dias (Localização): _____	15() Calafrios
16() Dor de garganta	17() Fadiga	18() Manifestações neurológicas (descrever): _____



7. DETALHAMENTO DO ENVOLVIMENTO ARTICULAR NA FASE AGUDA:

7.1. Pequenas articulações:	Y – Sim () 1 – E; 2 – D; 3 – E/D	N – Não ()	Dor Y – Sim/N – Não 1 – E; 2 – D; 3 – E/D	Edema Y – Sim/ N – Não 1 – E; 2 – D; 3 – E/D
Falanges distais de Mão				
Falanges médias de Mão				
Falanges proximais de M				
Metacarpos				
Punhos				
Falanges distais de Pé				
Falanges médias de Pé				
Falanges proximais de Pé				

Metatarsos				
7.2. Grandes articulações:	Y – Sim () 1 – E; 2 – D; 3 – E/D	N – Não ()	Dor Y – Sim/N – Não 1 – E; 2 – D; 3 – E/D	Edema Y – Sim/ N – Não 1 – E; 2 – D; 3 – E/D
Ombros				
Cotovelos				
Quadril				Não mensurável
Joelhos				
Tornozelos				
Articulação TM				
Esternoclavicular				
Coluna Cervical / nuca				
Coluna torácica				Não mensurável
Coluna lombar				Não mensurável
Sacroilíaca				Não mensurável

7.3. Comprometimento:	Poliarticular? (mais de quatro)	Oligoarticular (4 ou menos)

8. Sinais / sintomas inflamatórios articulares definidores de artrite NA FASE AGUDA:

8.1. Sinais / sintomas	Y – Sim ()	N – Não ()
Sinovite		
Edema		
Vermelhidão		
Calor		
Rigidez matinal + 30 min de duração		

Dor inflamatória (que melhora com o exercício ou que piora com o repouso ou durante a noite)		
Artrite		

9. Envolvimento periarticular:

9.1. Sinais / Sintomas	Y – Sim ()	N – Não ()
Entesite (inflamação na inserção do ligamento ou tendão no osso)		
A) Tendões de Aquiles		
B) Fasciíte plantar		
Tenossinovite		
Periostite (tibial / isquial)		
Tendinopatia		
Bursite		
Mialgia		

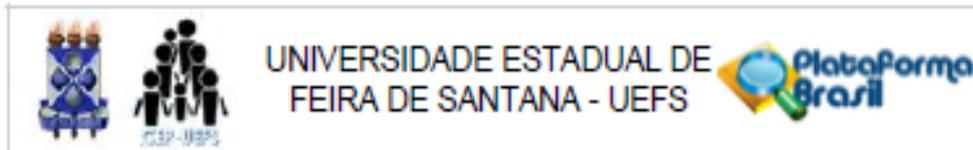
10. Usou ou está usando medicamentos?		
1 () Sim 2 () Não		
Qual	(is)	USOU em casa?

Sentiu Melhora com o uso dessa medicação? 1()Sim 4() Não		
11. Foi prescrito medicamento nesta consulta? ()Sim () Não		
11.1.		Quais?

12. Houve descompensação da comorbidade?:		
1 () Sim. Qual (is) descrever:		

2 () Não		

ANEXO B- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Chikungunya no município de Feira de Santana (BA), Brasil: estudos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de qualidade de vida.

Pesquisador: ERENILDE MARQUES DE CERQUEIRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49946515.6.0000.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

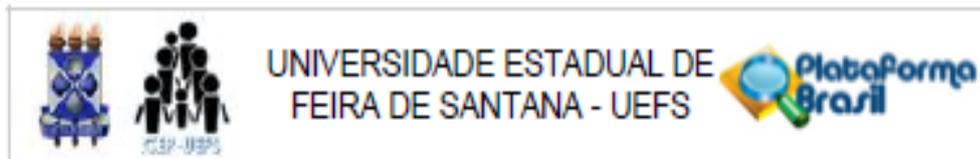
Número do Parecer: 1.450.762

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de pesquisa intitulado "Chikungunya no município de Feira de Santana (BA), Brasil: estudos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de qualidade de vida", do Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), cuja Pesquisadora Responsável é a Profª Drª Erenilde Marques de Cerqueira/UEFS e o Profª Drª Rivaldo Venâncio da Cunha, Pesquisador Assistente/FIOCRUZ MS. A Equipe Executora é composta por diversos pesquisadores colaboradores, de diversas Instituições: SMS de Feira de Santana, BIO-MANGUINHOS / FIOCRUZ-RJ, FIOCRUZ MS e UFMS, e FIOCRUZ PARANÁ e 03 bolsistas de apoio técnico.

O projeto aborda que: "A palavra 'chikungunya' significa 'contorcer-se' na língua Makonde (falada em algumas regiões da África Oriental) e faz alusão à postura encurvada daqueles que sofrem com as dores intensas nas articulações provocadas pela doença (LUMSDEN, 1955; ROBINSON, 1955). Chikungunya é um vírus (CHIKV) RNA, pertencente ao gênero alphavirus da família Togaviridae (SCHUFFENECKER et al., 2006) e é transmitido para os humanos através da picada do mosquito infectado. Os principais vetores do CHIKV são as fêmeas dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, espécies que também transmitem outros vírus causadores de doenças, como dengue e febre amarela (LUMSDEN, 1955; PAUPY et al., 2011)" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 03;

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-480
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3181-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



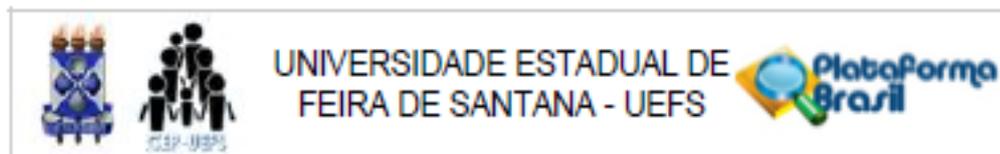
Continuação do Parecer: 1.450.762

Projeto completo, p. 03).

Segundo a pesquisadora responsável, "Trata-se de um estudo epidemiológico misto, com abordagem qualitativa e quantitativa. Objetivo: Desenvolver estudos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de qualidade de vida sobre chikungunya no município de Feira de Santana, Bahia. Materiais e métodos: Será realizado estudo epidemiológico do tipo caso-controle aninhado a um estudo transversal. O estudo transversal analisará o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial das pessoas com chikungunya, permitindo conhecer a prevalência de anticorpos anti-CHIKV, o provável percentual de infecções assintomáticas, bem como avaliar o impacto na qualidade de vida nos indivíduos acometidos pelo CHIKV. Com o estudo caso-controle se pretende identificar possíveis fatores associados à persistência da dor articular naqueles casos com confirmação laboratorial, avaliar a resposta clínica aos diferentes esquemas terapêuticos e de suporte na evolução da doença, bem como correlacionar os fatores associados à sua evolução clínica. Técnicas e instrumentos de coleta de dados: entrevista estruturada com um questionário clínico e outro para avaliar a qualidade de vida (SF-36). Os dados quantitativos serão registrados em planilha Microsoft Excel® contendo todas as variáveis do estudo. Em seguida serão exportados para o SPSS® (Statistical Package for Social Science versão 10.0 for Windows, SPSS Inc, Chicago, Illinois). A pesquisa será submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da UEFS, conforme a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que determina as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 03; Resumo do Projeto completo, p. 03).

A autora acrescenta que "O presente estudo vislumbra possibilidades de aprofundamento do tema, ao problematizar o fenômeno da chikungunya enquanto objeto de estudo. Este projeto propõe os seguintes subprojetos de pesquisa. Subprojeto 1. Perfil clínico e epidemiológico da chikungunya em Feira de Santana, Bahia. Subprojeto 2. Fatores associados à evolução clínica da chikungunya em Feira de Santana, Bahia. Subprojeto 3. Avaliação da resposta clínica aos diferentes esquemas terapêuticos e de suporte no tratamento da chikungunya em Feira de Santana, Bahia. Subprojeto 4. Caracterização laboratorial e avaliação de protótipos de testes de diagnóstico de chikungunya em Feira de Santana, Bahia. Subprojeto 5. Avaliação da qualidade de vida aos casos de chikungunya em Feira de Santana, Bahia" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04; Projeto completo, p. 06).

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
 Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
 UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
 Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br

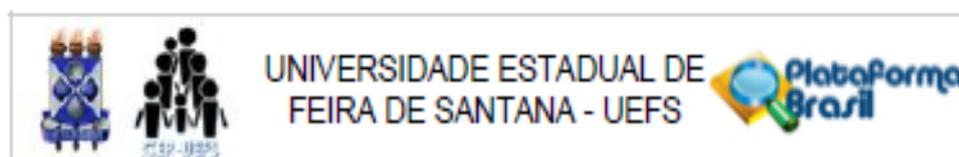


Continuação do Parecer: 1.450.762

População de estudo – Participarão destes estudos moradores do município de Feira de Santana (BA), que preencham os critérios de Inclusão no estudo: Concorde em participar do estudo, expressando seu aceite por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) se for adulto. Caso seja menor, além de sua assinatura também será necessária a concordância dos pais ou responsáveis legais, expressa por meio de assinatura no TCLE; Aceite responder ao questionário que será aplicado por um dos entrevistadores da equipe; Concorde com a coleta de uma amostra de cerca de 10ml de sangue venoso para realização dos exames laboratoriais que irão comprovar ou descartar a Infecção pelo CHIKV ou por outro vírus que possa estar circulando na comunidade, bem como avaliar protótipos de testes de diagnóstico em desenvolvimento pela Flocruz; Concorde com a realização de testes diagnósticos para detectar outras arboviroses, caso os exames para CHIKV sejam negativos; Morador com residência fixa no município de Feira de Santana. **Crterios de exclusão** – Doença mental que o impeça de compreender os objetivos do estudo e, conseqüentemente, as perguntas contidas no questionário; Estejam privados de liberdade; Doença grave, que impeça o sujeito de exercer plenamente sua vontade de forma independente; Que se negue a participar de quaisquer etapas do projeto (entrevista, coleta de sangue, etc.) (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04; Projeto completo, p. 17-18).

Sobre a coleta e armazenamento do material, a pesquisadora esclarece que "As amostras de sangue coletadas neste estudo serão utilizadas para os exames previstos neste projeto de pesquisa e ficarão armazenadas sob a responsabilidade da Fundação Oswaldo Cruz durante cinco anos. Após o fim desse projeto, estas amostras poderão permanecer armazenadas para uso em pesquisas futuras, se você assim autorizar. O pesquisador responsável assume os compromissos de submeter qualquer novo projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e procurar o Senhor (a) para uma nova autorização de uso dessas amostras, por meio de novo TCLE. Dessa forma, para a utilização dessas amostras em pesquisas futuras relacionadas, um novo projeto será submetido ao CEP da UEFS e um novo TCLE será elaborado para seu novo consentimento. As pesquisadoras e os entrevistados não serão remunerados pela participação neste estudo e se você tiver qualquer prejuízo causado pela pesquisa receberá indenização ou ressarcimento, conforme estabelece a Resolução 466/2012. Caso o CEP julgue desnecessário novo consentimento, o mesmo aprovará a utilização desse material e assumirá eticamente a realização do novo projeto" (TCLE).

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
 Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
 UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
 Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Processo: 1.450.762

Apresenta Cronograma detalhado e Orçamento com a descrição da contrapartida da UEFS através do apoio do NUPISC, bem como a contrapartida das demais instituições envolvidas.

A pesquisadora responsável e o pesquisador assistente têm experiência na área da pesquisa a ser desenvolvida, de acordo com o currículo Lattes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: "Desenvolver estudos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e de qualidade de vida sobre chikungunya no município de Feira de Santana, Bahia" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04; Projeto completo, p. 17-18).

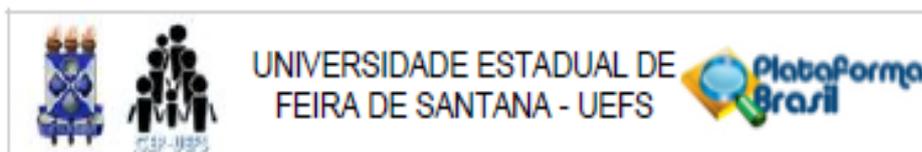
Objetivos Secundários: " - Analisar o perfil clínico, epidemiológico e laboratorial da chikungunya; - Conhecer a prevalência de anticorpos anti-CHIKV na população estudada; - Conhecer o provável percentual de infecções assintomáticas na amostra estudada; - Avaliar protótipos de testes de diagnóstico de chikungunya; - Caracterizar os principais aspectos clínicos e epidemiológicos dos casos sintomáticos e que apresentem confirmação sorológica; - Identificar possíveis fatores associados à persistência da dor articular entre os casos com confirmação laboratorial; - Avaliar a resposta clínica aos diferentes esquemas terapêuticos e de suporte na evolução da doença; - Correlacionar os fatores associados à evolução clínica da chikungunya; - Avaliar o impacto na qualidade de vida das pessoas que foram acometidas pelo vírus chikungunya" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04; Projeto completo, p. 07).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: "Os riscos referentes à presente pesquisa dizem respeito a intercorrências que possam ocorrer no momento da punção venosa para a coleta de sangue para as análises laboratoriais, entretanto, salientamos que para este procedimento serão adotadas todas as normas de biossegurança. Os materiais utilizados serão todos descartados e a equipe de laboratório será capacitada e supervisionada pelos pesquisadores. Caso ocorra alguma intercorrência, esta será imediatamente resolvida pelos pesquisadores. Outros possíveis riscos estão relacionados ao desconforto na coleta de exames laboratoriais, ou ao fato de o usuário se sentir inibido para expor suas opiniões com receio de influenciar no atendimento que necessitam. No entanto, os sujeitos poderão a qualquer momento desistir de participar da pesquisa, sem prejuízos de qualquer natureza" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04).

"Caso concorde, no momento da entrevista será coletada uma amostra de sangue por um técnico

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
 Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
 UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
 Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Protocolo: 1.450.762

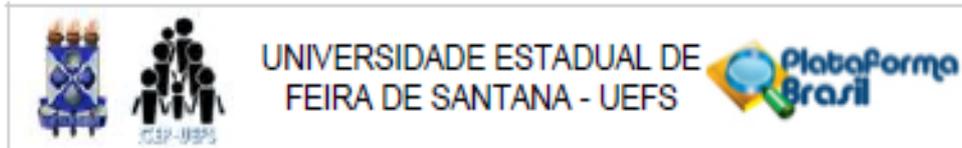
de laboratório e sob a supervisão de um bioquímico, para que possa ajudar na realização do diagnóstico laboratorial. Serão obedecidas todas as normas técnicas de biossegurança como o uso de materiais descartáveis e coleta de sangue por equipe capacitada, no entanto, você pode sentir receio no momento da retirada do sangue. Pode também ocorrer um pequeno extravasamento de sangue no local, caso isso ocorra a equipe de coleta estará capacitada para sanar o problema" (TCLE).

"As amostras de sangue serão coletadas de uma veia de seu braço, por meio de uma agulha descartável, respeitando-se todas as normas técnicas de biossegurança e sem nenhum risco para você, além da pequena dor que poderá acontecer no momento da coleta devido a entrada da agulha em sua veia. Pode ocorrer um escoamento de sangue para fora da veia e aparecer uma pequena mancha de cor roxa no seu braço, a equipe estará capacitada para resolver este problema. Existe a possibilidade de você se constranger com as perguntas do questionário, porém este foi elaborado de modo que elimine este problema ao máximo, de modo que você se sinta bem em responder nossas perguntas. Se você não se sentir a vontade de responder alguma questão, você pode se negar a respondê-la, assim o questionário será respondido, somente em partes por você" (TALE).

BENEFÍCIOS: "Conhecer a dimensão da Infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV) no município de Feira de Santana que registrou os primeiros casos autóctones da doença no Brasil. Subsidiar os serviços de saúde da rede SUS no Brasil para a atenção eficaz e o acompanhamento dos indivíduos acometidos pela Infecção pelo CHIKV" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04).

"Será garantido a você o (s) resultado (s) do (s) exame (s), o qual será entregue pela Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde para que possam auxiliar no diagnóstico e tratamento, bem como a garantia do encaminhamento para outras especialidades e serviços da rede de saúde que forem necessários para a sua assistência. Os resultados da pesquisa terão como benefício possibilitar o conhecimento sobre a chikungunya e o impacto que esta doença está causando na qualidade de vida da população. Esses conhecimentos ajudarão as autoridades de saúde na preparação de propostas para reduzir as consequências da doença. Você poderá expor as suas opiniões sobre qualquer assunto sem receio de sofrer qualquer constrangimento ou ter dificuldade para receber o atendimento de saúde que necessita por ter feito esses comentários" (TCLE)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
 Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.051-460
 UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
 Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 1.450.762

"Você receberá os resultados dos exames de sangue, os quais serão entregues pelo pesquisador nas próximas entrevistas para que possam auxiliar no seu diagnóstico e tratamento. Também assumimos o compromisso de solicitar o seu encaminhamento para outras especialidades e serviços da rede de saúde, se isso for necessário para cuidar de sua saúde" (TALE).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme se Justifica no projeto: "estudo é bastante atual e inédita. Por se tratar de uma doença de Introdução recente no Brasil, cuja produção científica local e experiência clínica são incipientes, existem inúmeras dúvidas relacionadas com a "história clínica natural" da enfermidade, bem como suas características epidemiológicas, razão pela qual este projeto assume importância ainda maior" (Projeto completo, p. 05).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

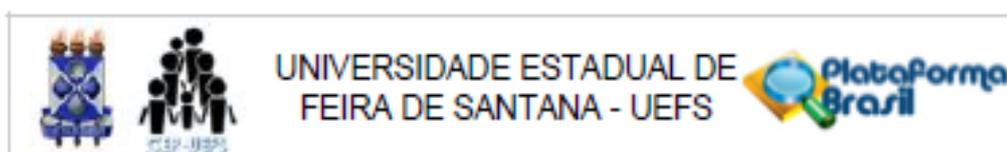
Protocolo completo, atendendo às exigências da Resolução 466/12.

Apresenta:

1. Folha de Rosto assinada pela Diretora do Departamento de Saúde da UEFS, Profª Drª Silvone Santa Bárbara da Silva Santos;
2. Declaração dos pesquisadores colaboradores afirmando participar do estudo e a cumprir a Resolução 466/12;
3. Documento da Secretaria Municipal de Saúde de Feira de Santana-BA, assinado pela Secretária de Saúde, Denise Lima Mascarenhas, apoiando o Projeto, bem como disponibilizando a infra-estrutura dos espaços e instalações das unidades de saúde do município, necessários à execução do Projeto;
4. TCLE;
5. TALE.

Sobre a solicitação do CEP-UEFS no que diz respeito à declaração dos técnicos e bioquímicos, a pesquisadora responsável esclarece, em ofício que, "Quanto à procedência dos técnicos e bioquímicos que realizam a coleta de sangue, esclarecemos que os participantes do estudo são usuários do sistema local de saúde e que procuram as unidades de saúde para o seu atendimento, sendo atendidos pelos profissionais de saúde lotados na secretaria de saúde e pelos pesquisadores deste estudo com anuência da Secretaria Municipal de Saúde, portanto, a coleta de material para exames será realizada por técnicos da secretaria de saúde do município e

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
 Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
 UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
 Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 1.450.762

supervisionada pela bioquímica que integra a pesquisa. Ou seja, não estamos recrutando pessoas para participar da pesquisa, estamos atendendo essas pessoas nas unidades de saúde do município e as integrando à pesquisa”.

Recomendações:

Recomenda-se que, no TALE, o termo “consentimento” seja substituído por “assentimento”, no trecho “Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas”.

Recomenda-se que, a qualquer momento por conta da necessidade de recrutamento, sejam anexadas as declarações de novos pesquisadores e encaminhado ofício e EMENDA ao projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após o atendimento das pendências, o Projeto está aprovado para execução, pois atende aos princípios bioéticos para pesquisa envolvendo seres humanos, conforme a Resolução nº 466/12 (CNS).

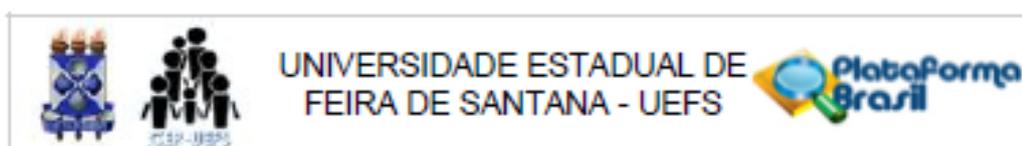
Considerações Finais a critério do CEP:

Tenho muita satisfação em informar-lhe que seu Projeto de Pesquisa satisfaz às exigências da Res. 466/12. Assim, seu projeto foi Aprovado, podendo ser iniciada a coleta de dados com os participantes da pesquisa conforme orienta o Cap. X.3, alínea a - Res. 466/12. Relembro que conforme Institui a Res. 466/12, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída. Em nome dos membros CEP/UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano, este CEP aguardará o recebimento dos referidos relatórios.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	recurso_oficio.doc	14/03/2016 22:21:55	JEAN MARCEL OLIVEIRA ARAUJO	Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_546615.pdf	11/03/2016 17:44:55		Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	pendencias.pdf	11/03/2016 17:43:34	ERENILDE MARQUES DE	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.doc	11/03/2016 17:38:58	ERENILDE MARQUES DE CERQUEIRA	Acelto
TCLE / Termos de	TALE.doc	11/03/2016	ERENILDE	Acelto

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
 Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-460
 UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
 Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 1.450.702

Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE.doc	17:28:43	DE CERQUEIRA	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	11/03/2016 17:22:13	ERENILDE MARQUES DE CERQUEIRA	Acelto
Outros	OFICIO_CEP_janeiro.jpg	05/01/2016 18:46:59	ERENILDE MARQUES DE	Acelto
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Recurso_CEP.jpg	08/09/2015 16:47:38	ERENILDE MARQUES DE	Acelto
Declaração de Pesquisadores	img283.pdf	22/07/2015 16:53:16		Acelto
Declaração de Pesquisadores	img282.pdf	22/07/2015 16:52:55		Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	img281.pdf	22/07/2015 16:52:39		Acelto
Declaração de Pesquisadores	img280.pdf	22/07/2015 16:52:22		Acelto
Declaração de Pesquisadores	img279.pdf	22/07/2015 16:52:06		Acelto
Declaração de Pesquisadores	img278.pdf	22/07/2015 16:51:16		Acelto
Folha de Rosto	FOLHA DE ROSTO PROJETO ERENILDE PARA CEP.pdf	07/07/2015 15:44:26		Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FEIRA DE SANTANA, 14 de Março de 2016

Assinado por:
JEAN MARCEL OLIVEIRA ARAUJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
 Bairro: Módulo I, MA 17 CEP: 44.031-480
 UF: BA Município: FEIRA DE SANTANA
 Telefone: (75)3161-8067 E-mail: cep@uefs.br