



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

VÂNIA ANGÉLICA FEITOSA VIANA

**PERFIL SOROEPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF,
IL-6 E IL-10 EM INDIVÍDUOS COM SUSPEITA CLÍNICA DE CHIKUNGUNYA
DURANTE A EPIDEMIA DE 2017 NO CEARÁ**

FORTALEZA

2020

VÂNIA ANGÉLICA FEITOSA VIANA

PERFIL SOROEPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF, IL-6
E IL-10 EM INDIVÍDUOS COM SUSPEITA CLÍNICA DE CHIKUNGUNYA DURANTE
A EPIDEMIA DE 2017 NO CEARÁ

Defesa da Dissertação apresentada como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Miyajima

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- V668p Viana, Vânia Angélica Feitosa.
Perfil soropidemiológico e avaliação das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 em indivíduos com suspeita clínica de chikungunya durante a epidemia de 2017 no Ceará / Vânia Angélica Feitosa Viana. – 2020.
100 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. Fábio Miyajima.
1. Vírus Chikungunya. 2. Citocinas. 3. Imunidade. I. Título.

CDD 615.1

VÂNIA ANGÉLICA FEITOSA VIANA

PERFIL SOROEPIDEMIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF, IL-6
E IL-10 EM INDIVÍDUOS COM SUSPEITA CLÍNICA DE CHIKUNGUNYA DURANTE
A EPIDEMIA DE 2017 NO CEARÁ

Defesa da Dissertação apresentada como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Aprovado em: 28/01/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Miyajima (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo

UniChristus

Dedico este trabalho ao meu marido, Sérgio, pelo amor, compreensão, incentivo e apoio diário.

Aos meus filhos, João Gabriel e Maria Fernanda, amores da minha vida, por tornarem meus dias mais felizes.

Aos meus pais, Ivânia e Espedito, pelo amor incondicional e por estarem ao meu lado em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pelo dom da vida, por me proporcionar tantas bênçãos, conquistas, fortaleza, sabedoria, por me guiar e iluminar em todo o meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Miyajima, pela compreensão, paciência, pelo incentivo, apoio e por ter acreditado em mim desde o princípio.

À Dra. Liana Perdigão Mello, diretora do LACEN-CE, e Dra. Maria do Carmo Vidal Gadelha Lima, chefia imediata, por todo o incentivo, apoio, compreensão, motivação e atenção concebido a mim durante todo o período do mestrado.

À Dra. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo, por sempre me incentivar e motivar, pela disponibilidade, pelas valiosas contribuições e por todo carinho dedicado a mim.

À Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite, por todas as contribuições, sugestões, disponibilidade, ensinamentos e por ter me dado à oportunidade de desenvolver uma parte essencial do estudo no laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Ceará.

Às queridas amigas, da Virologia do LACEN-CE, Débora Bezerra Silva, Izabel Letícia Cavalcante Ramalho, Jaqueline Souto Vieira Burgoa, Leda Maria Simões Mello, Maria Elisabeth Lisboa de Melo, Rita Amanda Chaves de Lima, Shirlene Telmos Silva de Lima e Sônia Maria Santana Macêdo, por toda contribuição, apoio, incentivo, amizade e compreensão do início ao fim do estudo. Vocês foram essenciais para a realização deste sonho, assim como, toda a equipe do setor de exantemática do LACEN-CE.

À equipe do laboratório de Imunologia, faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Ceará por todo o apoio, auxílio e receptividade.

Ao meu amigo, Matheus de Souza Santos, por ter sido fundamental na realização deste estudo. Sou grata a todo o seu apoio e dedicação.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, todos os professores e funcionários, por todo o apoio, orientação, ensinamentos e dedicação.

Aos colegas da turma de mestrado, pela convivência e troca de experiências.

A todos os meus familiares por estarem ao meu lado nos momentos felizes e difíceis durante a realização deste mestrado, sempre transmitindo amor, força e paz que me fortaleceu para enfrentar todos os desafios e obstáculos desta caminhada.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo”.

(Martin Luther King)

RESUMO

As arboviroses, principalmente dengue, Zika e chikungunya, têm se constituído em um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Todavia, a infecção pelo CHIKV particularmente apresenta um forte componente inflamatório envolvendo a imunidade inata e adaptativa. Entretanto, os mecanismos imunológicos presentes na proteção ou patogênese não estão ainda totalmente elucidados. Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar o perfil soropidemiológico em indivíduos com suspeita clínica de chikungunya; associar os níveis séricos das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 com as fases de progressão da doença e com a soropositividade IgM e IgG anti-CHIKV. Trata-se de um estudo descritivo, transversal, constituído por 393 casos suspeitos de chikungunya que foram encaminhados ao Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará, em 2017, para diagnóstico laboratorial. As sorologias IgM e IgG anti-CHIKV/DENV/ZIKV e as quantificações das citocinas: IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 foram realizadas pelo método ELISA. O perfil epidemiológico deste estudo foi caracterizado com predomínio de casos provenientes do município de Fortaleza, do sexo feminino e da faixa etária de 40 a 59,9 anos. Do total, 71,0% (279/393) tiveram sorologia IgM anti-CHIKV reagente, 67,4% (265/393) IgG anti-CHIKV reagente e 57,3% (225/393) foram reagentes para ambos IgM e IgG anti-CHIKV reagente. Dos indivíduos com anticorpos IgM e/ou IgG anti-CHIK reagentes, 40,7% (138/339) estavam na fase aguda, 35,7% (121/339) pós-aguda e 23,6% (80/339) na fase crônica. Participantes do sexo feminino com idade mais avançada apresentaram um maior tempo de sintomas da doença, o que sugere que sexo e idade possam ser fatores contributivos para a cronificação da doença. A positividade de anticorpos IgM anti-CHIKV ocorreu a partir do 3º dia do início dos sintomas, com um maior número de casos entre 6 a 8 dias. Quanto à detecção de IgG anti-CHIKV, houve uma concentração maior de casos entre 7 a 9 dias do início dos sintomas relatado. Foi verificada persistência da circulação de IgM anti-CHIKV em uma proporção significativa de indivíduos com mais de 90 dias de sintomas (49/80). Codetecções IgM anti-CHIKV, anti-DENV e/ou anti-ZIKV foram encontradas 54/393 das amostras (13,7%), com o predomínio entre chikungunya e dengue (45/54; 83,3%). Para todas as citocinas tituladas (IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10) foi verificado que o grupo agudo de chikungunya apresentou concentrações estatisticamente mais elevadas em relação aos grupos pós-agudo e crônico. Similarmente, foi observado que indivíduos com sorologia reagente para IgM e não reagente para IgG anti-CHIKV apresentaram níveis significativamente mais elevados destas citocinas que os demais grupos. Ao comparar as fases de progressão de CHIK foi verificado que os níveis séricos de TNF e IL-10 apresentaram um declínio mais acentuado na fase crônica quando comparada a aguda e pós-aguda, já os níveis de IFN- γ diminuíram discretamente na fase pós-aguda, contrastando com um aumento na fase crônica. Os níveis de IL-6 variaram de forma discreta entre os períodos estudados. Os indivíduos com codetecção IgM anti-CHIKV, anti-DENV e anti-ZIKV apresentaram níveis estatisticamente mais elevados dessas citocinas quando comparados com o grupo com detecção única anti-CHIK. Esses achados auxiliam a compreensão dos mecanismos de resposta imune da infecção por CHIK, sendo relevante para um melhor conhecimento da imunopatologia e comportamento da doença.

Descritores: Vírus Chikungunya. Citocinas. Imunidade.

Seroepidemiological profile and evaluation of cytokines IFN- γ , TNF, IL-6 and IL-10 in individuals with suspicious clinical chikungunya during the 2017 epidemic in Ceará

ABSTRACT

Arboviruses, mainly dengue, Zika and chikungunya, have been one of the major public health problems in the world. However, CHIKV infection particularly has a strong inflammatory component involving innate and adaptive immunity. Nevertheless, the immunological mechanisms present in the protection or pathogenesis are not yet fully elucidated. Thus, this study aimed to investigate the seroepidemiological profile in individuals with clinical suspicion of chikungunya; to associate serum levels of IFN- γ , TNF, IL-6 and IL-10 cytokines with the disease progression stages and seropositivity IgM and anti-CHIKV IgG. This is a descriptive cross-sectional study consisting of 393 suspected chikungunya cases that were referred to the Central Public Health Laboratory of the State of Ceará in 2017 for laboratory diagnosis. Anti-CHIKV / DENV / ZIKV IgM and IgG serologies and cytokine quantifications: IFN- γ , TNF, IL-6 and IL-10 were performed by ELISA. The epidemiological profile of this study was characterized with a predominance of cases from the city of Fortaleza, female and aged from 40 to 59.9 years. Of the total, 71.0% (279/393) had reagent IgM anti-CHIKV serology, 67.4% (265/393) reagent anti-CHIKV IgG and 57.3% (225/393) were reagent for both IgM and IgG anti-CHIKV. Of the subjects with IgM and / or IgG reactive anti-CHIK antibodies, 40.7% (138/339) were in the acute phase, 35.7% (121/339) post-acute and 23.6% (80/339) in the chronic phase. Older female participants had a longer time of symptoms of the disease, suggesting that gender and age may be contributing factors to disease chronicity. The positivity of anti-CHIKV IgM antibodies occurred from the 3rd day of symptom onset, with a larger number of cases between 6 to 8 days. Regarding the detection of anti-CHIKV IgG, there was a higher concentration of cases within 7 to 9 days of onset of symptoms reported. Persistence of anti-CHIKV IgM circulation was observed in a significant proportion of individuals with more than 90 days of symptoms (49/80). Anti-CHIKV, anti-DENV and/or anti-ZIKV IgM codetections were found in 54/393 of the samples (13.7%), with the predominance between chikungunya and dengue (45/54; 83.3%). For all titrated cytokines (IFN- γ , TNF, IL-6 and IL-10) it was found that the group acute chikungunya had statistically higher concentrations than the post-acute and chronic groups. Similarly, individuals with IgM reagent and non-reactive CHIKV IgG serology were found to have significantly higher levels of these cytokines than the other groups. When comparing the phases of CHIK progression, it was found that the serum levels of TNF and IL-10 showed a more pronounced decline in the chronic phase as compared to acute and post-acute, while IFN- γ levels decreased slightly in the post-acute phase, in contrast to an increase in the chronic phase. IL-6 levels varied weakly between the periods studied. Individuals with IgM codetection anti-CHIKV, anti-DENV, and anti-ZIKV had statistically higher levels of these cytokines compared to the single anti-CHIK detection group. These findings help to understand the mechanisms of CHIK infection immune response, being relevant for a better understanding of the immunopathology and behavior of the disease.

Keywords: Chikungunya Virus. Cytokines. Immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Incidência anual dos casos confirmados de dengue, chikungunya e Zika, segundo ano do início dos sintomas e a introdução dos arbovírus e sorotipos implicados, Ceará, 1986 a 2019.....	23
Figura 02 - Propagação e distribuição do CHIKV e seus vetores.....	24
Figura 03 - Estrutura do CHIKV e seu genoma.....	27
Figura 04 - Ciclo replicativo do CHIKV em células de vertebrados.....	29
Figura 05 - Patogênese da infecção por CHIKV.....	30
Figura 06 - Resposta imune ao CHIKV.....	32
Figura 07 - Imunopatologia do CHIKV.....	33
Figura 08 - Fluxograma dos casos suspeitos de chikungunya.....	44
Figura 09 - Fluxo de resultados.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Correlação do sexo (masculino e feminino) e idade (maiores e menores de 45 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.....	56
Gráfico 2 - Correlação do sexo (masculino e feminino) e idade (maiores e menores de 65 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.....	56
Gráfico 3 - Correlação do sexo masculino e idade (maiores e menores de 65 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.....	57
Gráfico 4 - Correlação do sexo feminino e idade (maiores e menores de 65 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.....	57
Gráfico 5 - Distribuição dos perfis formados a partir dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV, realizada em 393 casos suspeitos de CHIK, correlacionando-os com idade (média) e sexo, Ceará, 2017.....	59
Gráfico 6 - Correlação dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV com as fases de progressão da doença dos 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, Ceará, em 2017.....	60
Gráfico 7 - Correlação da soropositividade das sorologias IgM anti-CHIKV nos 393 casos suspeitos de CHIK , com os dias de sintomas relatado e sexo, Ceará, 2017.....	61
Gráfico 8 - Correlação da soropositividade das sorologias IgG anti-CHIKV nos 393 casos suspeitos de CHIK , com os dias de sintomas relatado e sexo, Ceará, 2017.....	61
Gráfico 9 - Correlação dos perfis sorológicos para CHIK com os dias de sintomas relatados nos 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, em 2017.....	62
Gráfico 10 - Distribuição da frequência da soropositividade das sorologias IgG anti-CHIKV/DENV/ZIKV nos 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.....	63
Gráfico 11 - Correlação das concentrações da citocina IFN- γ , dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.....	65
Gráfico 12 - Correlação das concentrações da citocina IFN- γ , dosada em 393 casos	

suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.....	65
Gráfico 13 - Correlação das concentrações da citocina IFN- γ nas detecções de IgM anti-CHIKV e codetecções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.....	66
Gráfico 14 - Correlação das concentrações da citocina TNF, dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.....	68
Gráfico 15 - Correlação das concentrações da citocina TNF, dosada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.....	68
Gráfico 16 - Correlação das concentrações da citocina TNF nas detecções de IgM anti-CHIKV e codetecções de IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.....	69
Gráfico 17 - Correlação das concentrações da citocina IL-6, dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.....	71
Gráfico 18 - Correlação das concentrações da citocina IL-6, dosada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.....	71
Gráfico 19 - Correlação das concentrações da citocina IL-6 nas detecções de IgM anti-CHIKV e codetecções de IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.....	72
Gráfico 20 - Correlação das concentrações da citocina IL-10, dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.....	74
Gráfico 21 - Correlação das concentrações da citocina IL-10, dosada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.....	74
Gráfico 22 - Correlação das concentrações da citocina IL-10 nas detecções de IgM anti-CHIKV e codetecções de IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.....	75

Gráfico 23 – Diminuição dos níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 entre as fases pós-aguda e crônica em comparação à fase aguda observados em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, Ceará, 2017.....	77
Gráfico 24 - Correlação da razão IFN- γ / IL-10, calculada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.....	78
Gráfico 25 - Correlação da razão IFN- γ / IL-10, calculada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.....	78
Gráfico 26 - Correlação da razão TNF / IL-10, calculada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.....	79
Gráfico 27 - Correlação da razão TNF / IL-10, calculada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.....	80
Gráfico 28 - Correlação da razão IL-6 / IL-10, calculada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.....	81
Gráfico 29 - Correlação da razão IL-6 / IL-10, calculada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.....	81

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1 - Características dos estudos da literatura referentes à avaliação de citocinas em casos de chikungunya.....	35
Tabela 1 - Características sociodemográficas dos 393 casos suspeitos de chikungunya selecionados para o estudo, Ceará, em 2017.....	53
Tabela 2 - Distribuição da positividade para anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV nos 393 casos suspeitos de chikungunya, Ceará, 2017.....	55
Tabela 3 - Classificação dos 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK nas fases de progressão da doença, segundo o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a coleta de material biológico, Ceará, 2017.....	55
Tabela 4 - Distribuição da frequência dos perfis formados a partir dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV realizadas nos 393 casos suspeitos de chikungunya, Ceará, 2017.....	58
Tabela 5 - Distribuição da frequência das codeteccções IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV encontradas em 54 participantes do estudo, Ceará, 2017.....	63
Tabela 6 - Distribuição da mediana e das concentrações mínimas e máximas, em pg/mL, das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 nos 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.....	64
Tabela 7 - Correlação das concentrações da citocina IFN- γ com as codeteccções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.....	67
Tabela 8 - Correlação das concentrações da citocina TNF com as codeteccções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.....	70
Tabela 9 - Correlação das concentrações da citocina IL-6 com as codeteccções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.....	73
Tabela 10 - Correlação das concentrações da citocina IL-10 om as codeteccções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatórios não esteroides
AR	Artrite reumatoide
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BFV	Vírus da Floresta de Barmah (<i>Barmah vírus Floresta</i>)
CD95	Grupamento de diferenciação 95 (<i>Cluster of differentiation 95</i>)
CHIK	Chikungunya
CHIKV	Virus Chikungunya
CXCL10	Quimiocina com motivo CXC 10 (<i>C-X-C motif chemokine 10</i>)
DC-SIGN	Molécula não integrina capturadora de ICAM-3 específica de células dendríticas (<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>).
DENV-1	Vírus Dengue tipo 1
DENV-2	Vírus Dengue tipo 2
DENV-3	Vírus Dengue tipo 3
DENV-4	Vírus Dengue tipo 4
DENV	Vírus Dengue
DMARDs	Drogas antirreumáticas modificadoras da doença
DO	Densidade óptica
ECSA	Leste-Centro-Sul Africano (<i>Eastern, Central and Southern Africa</i>).
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).
E1	Proteína do envelope 1
E2	Proteína do envelope 2
E3	Pequeno peptídeo de envelope

EGF	Fator de crescimento epidérmico (<i>Epidermal growth factor</i>).
GAL	Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos (<i>Granulocyte-colony stimulating fator</i>).
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos (Macrófagos <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator</i>).
HCQ	Hidroxicloroquina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (<i>hepatocyte growth factor</i>).
HRP	Peroxidase de rábano (<i>horseradish peroxidase</i>).
IFI	Imunoflorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IH	Inibição da hemaglutinação
IHQ	Imuno-histoquímica
INF- α	Interferon-alfa
INF- β	Interferon-beta
INF- γ	Interferon-gama
INF-I	Interferon Tipo I
INF-II	Interferon Tipo II
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-2	Interleucina 2
IL-12	Interleucina 12
IL-4	Interleucina 4

IL-15	Interleucina 15
IL-1Ra	Antagonista do receptor da interleucina-1 (<i>interleukin-1 receptor antagonist</i>).
IL-8	Interleucina 8
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-13	Interleucina 13
IL-22	Interleucina 22
IL-21	Interleucina 21
IL-29	Interleucina 29
IL-27	Interleucina 27
IOL	Linhagem do Oceano Índico (Indian ocean lineage).
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon gama (<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>).
Kb	Quilobase
KDa	Kilodalton
LACEN-CE	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1 (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>).
mL	Mililitro
MIP1 α	Proteínas inflamatórias-1 α de macrófagos (<i>macrophage inflammatory protein 1-alpha</i>).
MIP1 β	Proteínas inflamatórias-1 β de macrófagos (<i>macrophage inflammatory protein 1-beta</i>).
Mrna	RNA mensageiro
NK	Células exterminadoras naturais (<i>Cells Natural killers</i>).
Nm	Nanômetro

nsP1	Proteína não estrutural 1
nsP2	Proteína não estrutural 2
nsP3	Proteína não estrutural 3
nsP4	Proteína não estrutural 4
Pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
qRT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (<i>Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time</i>).
RNA	Ácido Ribonucleico
RRV	Vírus do Rio Ross (<i>Virus Ross River</i>)
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (<i>reverse transcriptase reaction followed by Polymerase Chain Reaction</i>).
SE	Semana Epidemiológica
6K	Peptídeo sinal para E1
SESA	Secretaria da saúde do estado do Ceará
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TCD4+	Linfócitos TCD4+
TCD8+	Linfócitos TCD8+
Th1	Linfócitos T auxiliar 1 (<i>T helper 1</i>).
Th2	Linfócitos T auxiliar 2 (<i>T helper 2</i>).
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis fator</i>).
UFC	Universidade Federal do Ceará
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 ARBOVÍRUS	21
1.2 CHIKUNGUNYA	23
1.2.1 Histórico e Epidemiologia.....	23
1.2.2 Estrutura do vírus e sua replicação.....	26
1.2.3 Imunopatogênese	29
1.2.4 Resposta Imune a infecção pelo CHIKV.....	31
1.2.5 Manifestações Clínicas.....	36
1.2.6 Diagnóstico laboratorial	39
1.3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	40
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 GERAL.....	41
2.2 ESPECÍFICOS	41
3. MÉTODOS.....	42
3.1 ASPECTOS ÉTICOS E TIPO DE ESTUDO.....	42
3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO, PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
3.2.1 Critérios de inclusão.....	43
3.2.2 Critérios de exclusão	43
3.3. DESENHO DO ESTUDO	43
3.4 IMUNOENSAIOS.....	45
3.4.1 Teste sorológico para IgM e IgG anti-CHIKV.....	45
3.4.2 Teste sorológico para Zika	45
3.4.2.1 IgM anti-Zika.....	45
3.4.2.2 IgG anti-Zika	46
3.4.3 Teste sorológico para dengue	47
3.4.3.1 IgM anti-dengue	47
3.4.3.2 IgG anti-dengue	48
3.5. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS	48
3.5.1 Interferon γ (INF- γ)	48

3.5.2. Fator de Necrose Tumoral (TNF).....	49
3.5.3. Interleucina 6 (IL-6)	50
3.5.4. Interleucina 10 (IL-10)	51
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4. RESULTADOS	53
4.1 ASPECTOS SOROLÓGICOS DOS CASOS SUSPEITOS DE CHIK	54
4.2 PERFIS DAS CITOCINAS IFN- Γ , TNF, IL-6 E IL-10 EM CASOS SUSPEITOS DE CHIK	64
4.2.1 IFN- γ	64
4.2.2 TNF.....	67
4.2.3 IL-6.....	70
4.2.4 IL-10.....	73
4.3 PROPORÇÕES ENTRE AS CITOCINAS IFN- Γ , TNF, IL-6 E IL-10 NOS CASOS SUSPEITOS DE CHIK	76
5. DISCUSSÃO.....	82
6. CONCLUSÃO.....	90
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS	92
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 ARBOVÍRUS

O termo arbovírus se refere aos vírus transmitidos por artrópodes (Arthropod-borne virus), sendo assim designados por parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos e por apresentarem veiculação por artrópodes. *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* estão entre os principais vetores responsáveis pela transmissão das arbovirose em todo o mundo, essa transmissão ocorre quando o mosquito se alimenta de um indivíduo infectado, o vírus então infecta as glândulas salivares do vetor, para posteriormente, durante a hematofagia, inocular o vírus no próximo hospedeiro suscetível. Isso contribui para a constituição de uma cadeia de transmissão que pode resultar em epidemias, com a maioria dos casos, ocorrendo após chuvas sazonais, período que favorece um maior número de criadouros e consequentemente a propagação dos vetores. (HOARAU *et al.*, 2010; PATTERSON *et al.*, 2016).

As espécies dos vetores possuem grande capacidade de dispersão e adaptação, podendo ser encontradas em áreas urbanas, suburbanas e rurais, em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, o *A. aegypti* é o principal vetor transmissor, predominando em áreas urbanas, sendo de características domésticas e hábitos mais comumente diurnos (PIALOUX *et al.*, 2007; MEDLOCK; LEACH, 2015). A proliferação desses transmissores é favorecida por condicionantes, tais como: mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas e precariedade das condições sanitárias, podendo ocasionar uma amplificação da transmissão viral e iniciar surtos epidêmicos (RUST, 2012).

Os Arbovírus que causam doenças em humanos são membros de cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae* (RUST, 2012). Destas, as duas últimas são as mais comumente associadas a epidemias no Brasil, particularmente Zika, dengue e chikungunya (CHIK).

O vírus Zika (ZIKV) e o vírus Dengue (DENV) pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e apresentam transmissão por meio de vetores artrópodes quase na sua totalidade pela família *Culicidae* do gênero *Aedes*. Outras vias são menos comuns, mas já foram relatadas transmissões de ZIKV por: via sexual, congênita, transfusão sanguínea, transplantes e acidentes laboratoriais (IOOS *et al.*, 2014; MUSSO *et al.*, 2016; HENNESSEY *et al.*, 2016). A dengue é uma doença infecciosa tropical, febril e aguda. O vírus Dengue

apresenta quatro sorotipos antigenicamente distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, quanto ao ZIKV, são descritas duas linhagens: africana e asiática (GUBLER, 1998).

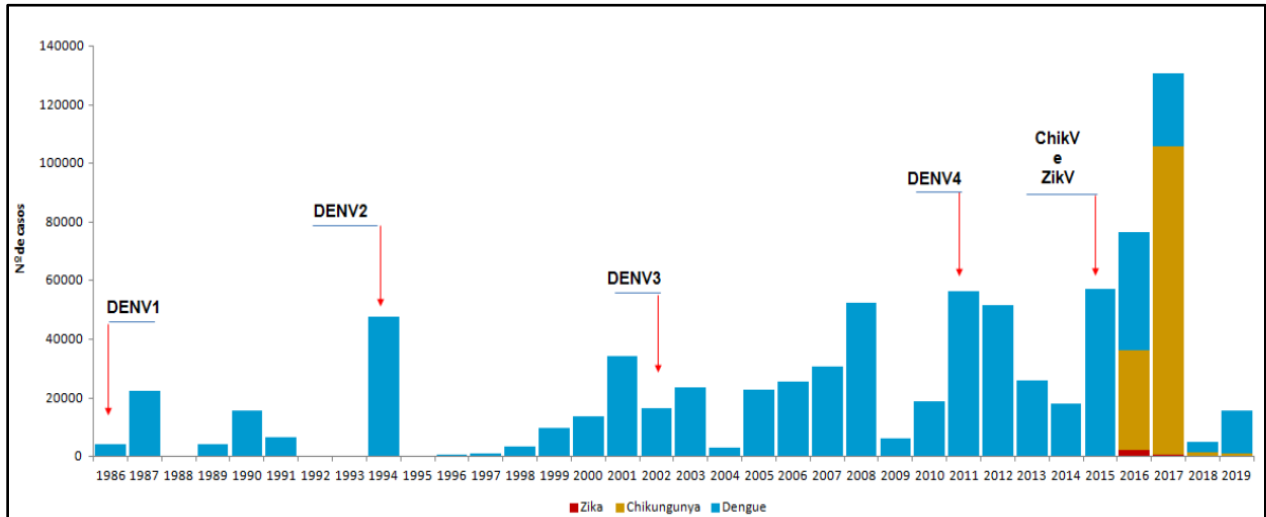
A família *Togaviridae* foi definida como uma família distinta, apresentando dois gêneros: *Alphavirus*, que reúne vírus transmitidos por artrópodes, e *Rubivirus*, contendo uma única espécie, o vírus da Rubéola (STRAUSS; STRAUSS, 1994).

O vírus Chikungunya (CHIKV) pertence ao gênero *Alphavirus*, advindo da África, causador de uma infecção comumente caracterizada por febre aguda que progride para artralgia grave e persistente na fase crônica da doença. O significado chikungunya tem origem do idioma *Makonde*, que quer dizer: curva-se ou torna-se contorcido, referindo-se à postura de flexão de indivíduos infectados com o vírus, causada pela artralgia dolorosa, uma das características marcantes da infecção (AZEVEDO *et al.*, 2015). Além do CHIKV, os alfavírus artritogênicos compreendem: o vírus Ross River (RRV), vírus da floresta de Barmah (BFV), O'nyong-nyong vírus, o grupo Sindbis de vírus e o vírus Mayaro (SUHRBIER *et al.*, 2012).

Desde a década de 80, o Brasil é uma região endêmica para dengue, mas apenas recentemente, desde 2015, convive com epidemias de Zika e CHIK (SERRA *et al.*, 2016). No Ceará, a dengue apresentou períodos endêmicos e epidêmicos, com o registro de sete grandes epidemias nos anos: 1987, 1994, 2001, 2008, 2011, 2012 e 2015 (CEARÁ, 2019a). A figura 1 representa a distribuição de casos de arboviroses de 1986 até 2019 no estado do Ceará, iniciando apenas com dengue e posteriormente com a circulação de Zika e chikungunya (CEARÁ, 2019c).

Os arbovírus que causam dengue, Zika e chikungunya apresentaram uma rápida expansão nos últimos anos, delineando um cenário marcado pela coexistência de arboviroses, constituindo-se em um dos principais problemas de saúde pública do mundo (PATTERSON *et al.*, 2016).

Figura 1: Incidência anual dos casos confirmados de dengue, chikungunya e Zika, segundo ano do início dos sintomas e a introdução dos arbovírus e sorotipos implicados, Ceará, 1986 a 2019.



Fonte: Ceará, 2019c, boletim epidemiológico.

1.2 CHIKUNGUNYA

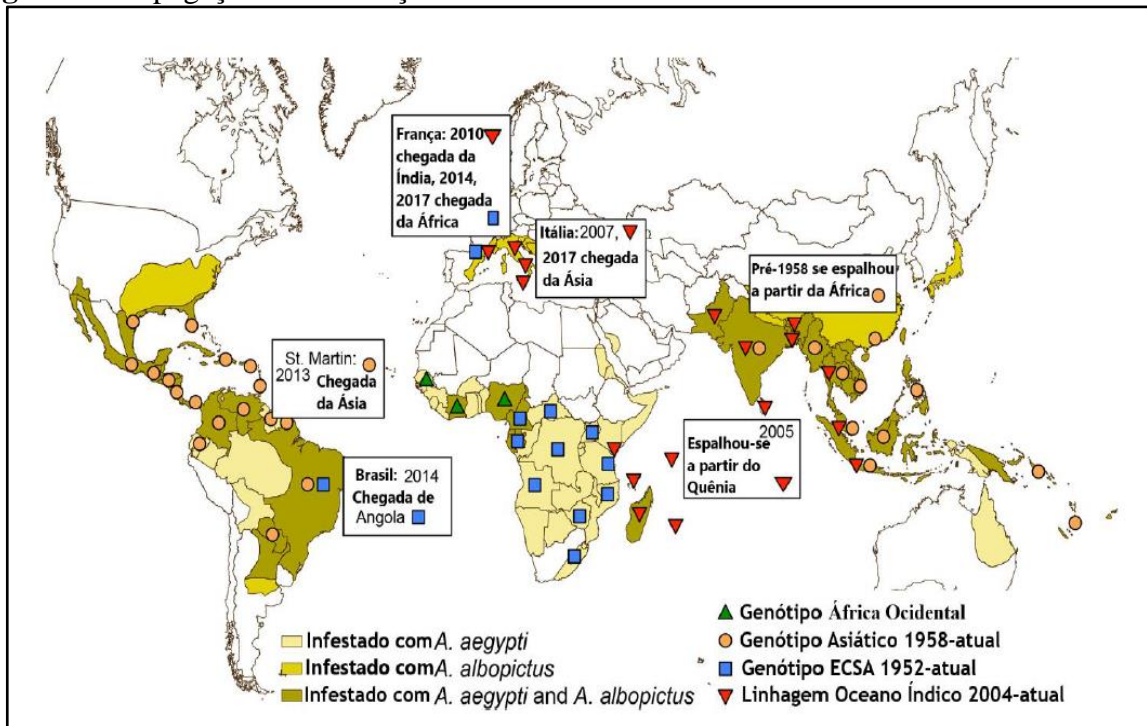
1.2.1 Histórico e Epidemiologia

Inicialmente, a doença foi denominada de *dengue-like*, por possuir sintomas semelhantes aos da dengue, no entanto, a artralgia causada pelo CHIKV tende a ser mais pronunciada, podendo durar semanas, meses ou mesmo anos, sendo um sinal clínico que pode distinguir a infecção causada pelo CHIKV da infecção pelo DENV (HOARAU *et al.*, 2010; WEAVER, 2014).

O CHIKV foi isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1952. Por três décadas, a CHIK causou surtos esporádicos em países africanos e asiáticos. Nesse período, permaneceu confinado à África Oriental e Sudeste da Ásia, resultando em epidemias pronunciadas nessas regiões, como a que ocorreu entre 1999 e 2000 na República Democrática do Congo, onde afetou cerca de 50.000 pessoas, subsequentemente na Indonésia entre 2000 – 2003 (HORCADA *et al.*, 2015). Essa restrição geográfica começou a mudar em 2004, quando uma epidemia iniciada na África se espalhou por ilhas do Oceano Índico, afetando cerca de 500 mil indivíduos em dois anos (BURT *et al.*, 2012). Em 2006, nas Ilhas da Reunião, uma epidemia foi resultado de mutações virais que permitiram uma melhor adaptação do vírus, levando a uma transmissibilidade mais eficaz pelo *Ae. albopictus*, contribuindo para uma grande expansão da doença (HONÓRIO *et al.*, 2015).

O CHIKV apresenta apenas um sorotipo, porém, as epidemias relatadas ao longo da história foram causadas por diferentes genótipos, identificados desde a sua descoberta em 1952, são eles: Asiático; Leste-Centro-Sul-Africano (ECSA); Oeste Africano (QUEYRIAUX *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2015; PATTERSON *et al.*, 2016); e a linhagem do Oceano Índico, que foi identificada em 2004 como descendente do genótipo ECSA (TSETSARKIN *et al.*, 2007) (Figura 2).

Figura 2: Propagação e distribuição do CHIKV e seus vetores.



Fonte: Adaptada de Rezza, 2019.

A linhagem do Oceano Índico (IOL) causou epidemias explosivas em ilhas da Índia e Ásia entre 2005 e 2011. Várias cepas de IOL contêm mutações que aumentam a infectividade e a transmissibilidade na espécie *Ae. albopictus*. Casos importados causaram surtos limitados em regiões temperadas onde apenas o *Ae. albopictus* estava presente. Em 5 de dezembro de 2013, infecções pelo genótipo asiático CHIKV foram relatadas na ilha de Saint Martin, no Caribe, o que registrou o estabelecimento do ciclo mosquito-humano do CHIKV nas Américas. Em 31 de outubro de 2014, 1.222.000 casos suspeitos de CHIK foram notificados nas Américas e infecções autóctones foram confirmadas em 50 territórios da região (NUNES *et al.*, 2015).

No Brasil, os primeiros casos autóctones de CHIKV foram detectados em 13 de setembro de 2014, na cidade de Oiapoque, estado do Amapá, e sete dias depois na cidade de

Feira de Santana, no estado da Bahia. Após análises genéticas dos vírus, foram detectadas as linhagens: asiática em Oiapoque e ECSA em Feira de Santana (TAUIL, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2015).

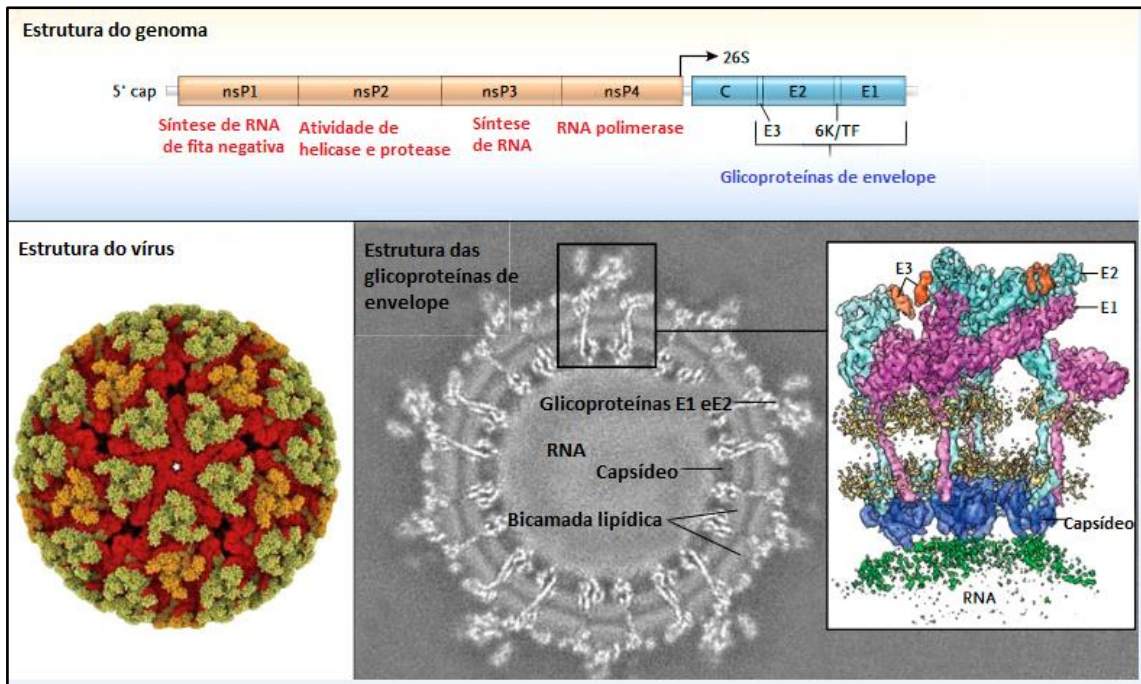
No Ceará, foram registrados os primeiros casos importados em 2014 e início de 2015. A ocorrência de casos da chikungunya de forma autóctone no Ceará deu-se em novembro do ano de 2015, com a confirmação de um caso residente no município de São Gonçalo do Amarante, município do principal complexo portuário do estado (Pecém). O segundo caso autóctone ocorreu em Fortaleza, no mês de dezembro de 2015, este associado ao contato com caso confirmado laboratorialmente importado do estado do Pernambuco (SIMIÃO *et al.*, 2019).

Em 2016, houve transmissão sustentada da chikungunya no estado do Ceará, caracterizando um cenário epidêmico, com 49.516 casos suspeitos, sendo que 63,6% (31.482/49.516) foram confirmados, distribuídos em 80,8% (139/172) dos municípios (CEARÁ, 2016). No ano de 2017, a partir do mês de fevereiro, observou-se uma elevação maciça de chikungunya quando comparado às demais arboviroses e ao mesmo período no ano de 2016, caracterizando um cenário epidêmico no estado do Ceará (CEARÁ, 2017). Nesse período, foram encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Ceará (LACEN/CE) por intermédio das unidades de saúde de Fortaleza e de vários municípios do estado do Ceará, 60.607 amostras de soro de casos suspeitos de chikungunya para realização de diagnóstico laboratorial. Foi observado um pico de casos suspeitos na cidade de Fortaleza, capital do estado, com uma frequência de 24.354 (40,18%). Considerando todos os casos, houve um predomínio no sexo feminino (75,19%). Destes, 41.329 foram confirmados por sorologia IgM anti-CHIKV, logo a frequência em amostras biológicas referenciadas ao LACEN/CE, em 2017, foi 68,19% . Esses dados foram retirados do sistema gerenciador de ambiente laboratorial (GAL). Já em 2018, houve uma redução acentuada na incidência, até a semana epidemiológica (SE) 52 (22/12/2019 a 28/12/2019) foram notificados 5.217 casos suspeitos de chikungunya, destes, apenas 27,0% (1.413/5.217) foram confirmados e 70,0% (3.656/5217) descartados (CEARÁ, 2019a). Conforme o boletim epidemiológico publicado no dia 13 de dezembro de 2019, correspondente a SE 49 (01/12/2019 a 07/12/2019), foram notificados 5.623 casos suspeitos de chikungunya no Ceará em 2019, destes, 18,2% (1.026/5.623) foram confirmados e 74,4% (4.187/5.623) descartados (CEARÁ, 2019c).

1.2.2 Estrutura do vírus e sua replicação

Os alfavírus são vírus pequenos, esféricos e encapsulados, com 60-70 nm de diâmetro. Suas partículas virais possuem envelope lipídico, capsídeo de simetria icosaédrica e genoma constituído de Ácido Ribonucleico (RNA). No envelope lipídico estão inseridas em sua superfície glicoproteínas virais E1 e E2, as quais se associam em heterodímeros, formando 80 trímeros, e na periferia tem a presença da glicoproteína E3 (UCHIME *et al.*, 2013). O nucleocapsídeo é constituído de uma proteína C do capsídeo viral e de uma molécula de RNA (STRAUSS, STRAUSS, 1986). O genoma deste arbovírus é composto por um RNA de fita simples com polaridade positiva, medindo aproximadamente 11,8 quilobases (kb) de comprimento e codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e cinco proteínas estruturais: proteína C, o peptídeo sinal para E1 (6k) e as glicoproteínas E1, E2 e E3 (Figura 3) (THIBERVILLE *et al.* 2013; WOLFEL *et al.*, 2015). O genoma apresenta duas origens de replicação: uma extremidade, mais curta 5', com metilguanossina, enquanto que a região mais longa 3' é poliadenilada (CHEN *et al.*, 2013).

Figura 3: Estrutura do CHIKV e seu genoma.



Fonte: Adaptada de Scoot, 2015.

A replicação de CHIKV começa com a ligação do envelope viral aos receptores do hospedeiro (FENNER *et al.*, 1974; WÖLFEL, *et al.*, 2015). Os receptores para CHIKV ainda não foram identificados, mas um papel tem sido proposto para os receptores de laminina, glicosaminoglicanos e moléculas DC-SIGN (molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 e específica das células dendríticas) na infecção em vertebrados causada por alfavírus. O vírus entra na célula-alvo por endocitose de vesículas revestidas de clatrina. Durante a transferência para endossomos, o ambiente de baixo pH leva à reorganização conformacional do complexo de envelope viral E1-E2, exposição do peptídeo de fusão E1 e subsequente fusão com a membrana endossômica, permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Após a entrada na célula do hospedeiro, o RNA viral é transcrito em uma poliproteína que, ao sofrer clivagem proteolítica, origina quatro proteínas não-estruturais (nsP1-4). Essas proteínas se associam para formar um complexo funcional de replicação viral com função de gerar um RNA intermediário de sentido negativo, que será utilizado como molde para a síntese do RNA genômico 49S e do mRNA subgenômico (SOLIGNAT *et al.*, 2009, LUM & NG, 2015).

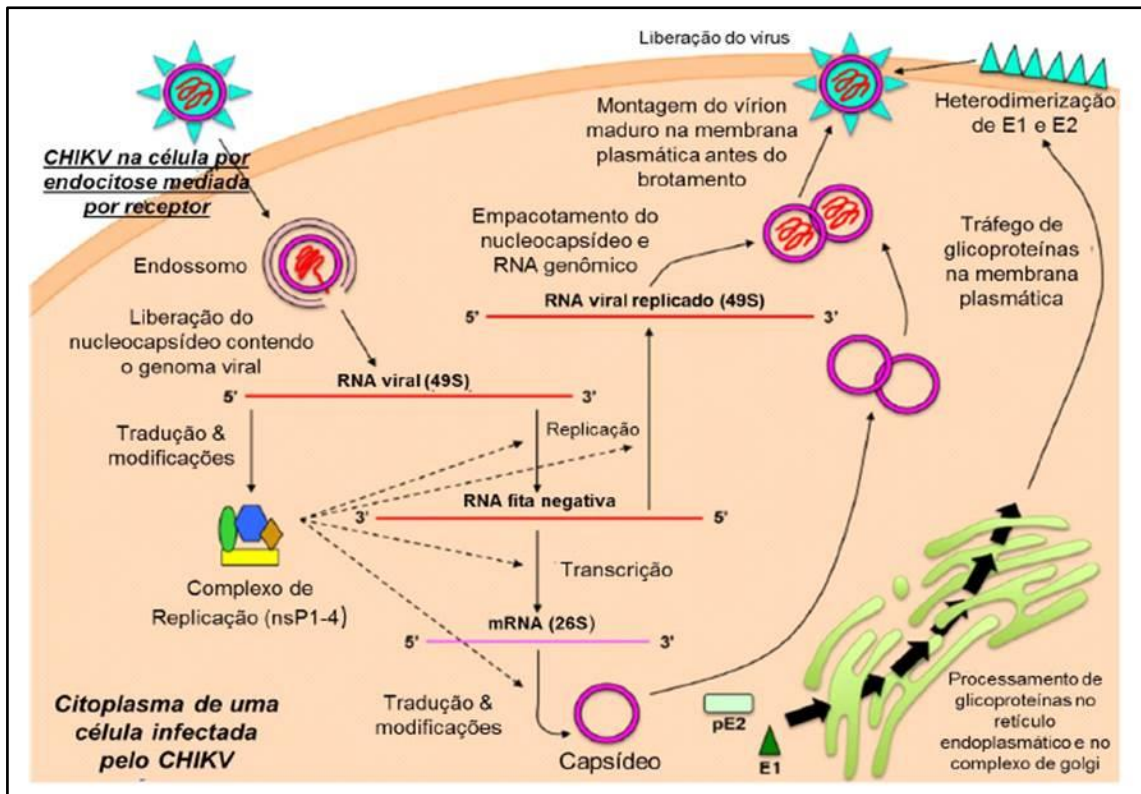
Durante a replicação, quando a concentração de nsP123 está elevada o suficiente, o precursor é subsequentemente transformado em proteínas maduras, que regulam a síntese de RNA cadeia positiva e amplificação de 26S. Este passo é regulado pelas funções de nsP2,

helicase e proteinase. O 26S serve como mRNA para a tradução da poliproteína precursora C-pE2-6k-E1 e produção de proteínas estruturais. No final do ciclo replicativo a poliproteína pE2-6k-E1-C é processada em proteínas estruturais maduras. A atividade de serina protease libera o capsídeo C (CHEVILLON *et al.*, 2008).

O mRNA 26S subgenômico é traduzido para codificar a proteína do capsídeo (C), duas glicoproteínas do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos (E3 e 6K). O capsídeo é então liberado para o citoplasma após sofrer processamento por serina endopeptidases. As proteínas estruturais restantes migram para o retículo endoplasmático onde sofrem modificações pós-traducionais (SOLIGNAT *et al.*, 2009, THIBERVILLE *et al.*, 2013, LUM & NG, 2015).

Após o transporte para o complexo de golgi, o heterodímero formado (pE2-E1) migra para a superfície celular e durante essa etapa a pE2 é clivada por uma proteinase furina ou semelhante para formar as glicoproteínas E2 e E3. Posteriormente, as glicoproteínas E1 e E2 formarão um dímero e serão transportadas para a membrana plasmática da célula hospedeira onde serão incorporadas na superfície do vírion sob a forma de espículas triméricas (EKSTROM *et al.*, 1994). Além disso, as proteínas do capsídeo irão se associar no citoplasma para formar um nucleocapsídeo icosaédrico que contém o RNA genômico 49S. Durante o brotamento, o nucleocapsídeo se liga ao E2 por um processo de maturação e será então direcionado à membrana celular (SUOMALAINEN *et al.*, 1992). Durante esta etapa, o vírion maduro irá adquirir uma bicamada de membrana proveniente da célula hospedeira (SOLIGNAT *et al.*, 2009, LUM & NG, 2015). A montagem viral é guiada eletrostaticamente pela ligação do nucleocapsídeo e o recrutamento de glicoproteínas associadas às membranas. A partícula montada, de forma icosaédrica, finalmente, brota na membrana da célula e torna-se um vírion envelopado (Figura 4) (KIELIAN; REY, 2006).

Figura 4: Ciclo replicativo do CHIKV em células de vertebrados.



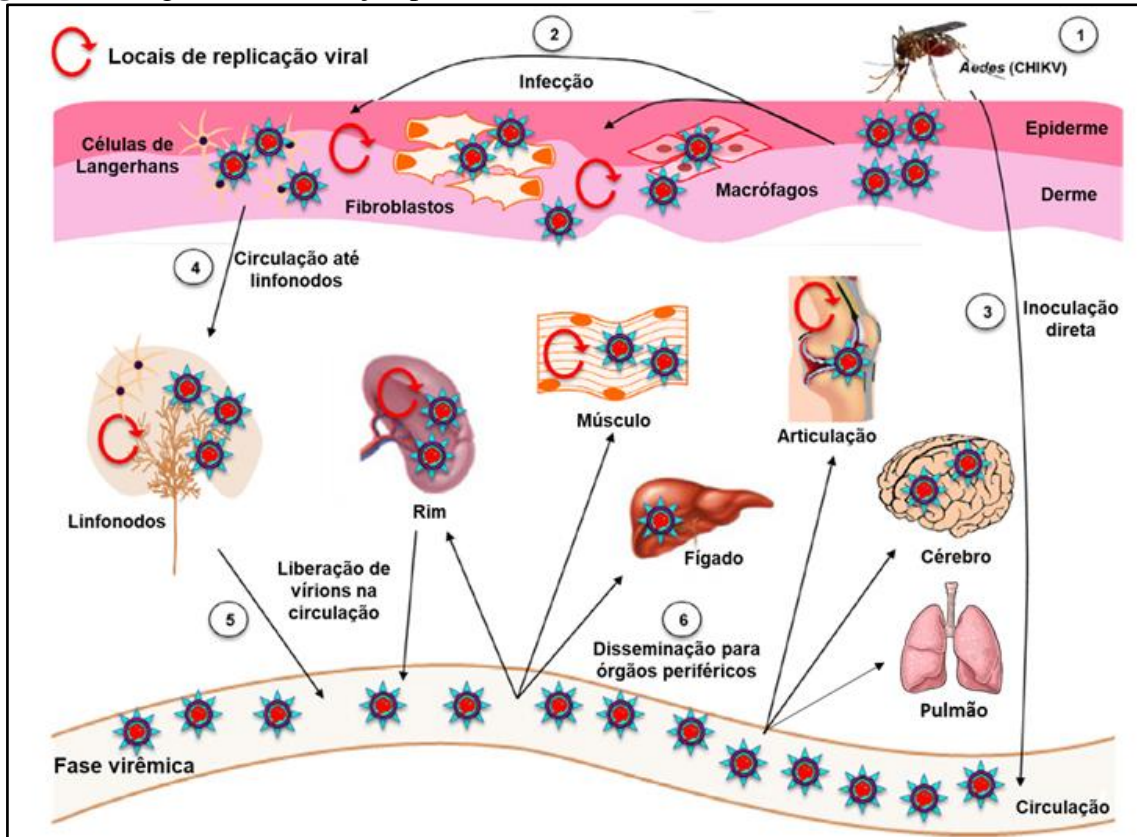
Fonte: Adaptada de Lum & Ng, 2015.

1.2.3 Imunopatogênese

O conhecimento acerca da rota de infecção do CHIKV ainda é limitado, no entanto, sabe-se que após a sua transmissão ocorre a inoculação do vírus e esse penetra diretamente nos capilares subcutâneos, onde imediatamente começa a sua replicação em células da pele, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Logo após, os vírus migram para os linfonodos próximos ao ponto de inoculação, onde infectam monócitos e macrófagos. Dessa forma, os vírus transportados pelas células atingem rapidamente o sistema circulatório, espalhando-se por diferentes locais, como músculos, articulações, fígado e cérebro (Figura 5). A resposta inicial é mediada pela ação do interferon tipo I (IFN-I) (SCHILTE *et al.*, 2013), cujas funções são enviar sinais para células vizinhas não infectadas para reduzir a síntese de proteínas, ativar células imunes ou enviar sinais de apoptose (SOURISSEAU *et al.*, 2007). A falha nos mecanismos reguladores da resposta imunológica do hospedeiro pode ser a causa da inflamação persistente no tecido sinovial manifestada como artrite crônica. Experimentos em modelos animais mostraram que a ausência de receptores de IFN do tipo I era crucial para letalidade da doença (COUDERC *et al.*, 2009). A persistência da artralgia e a expressão da

atividade inflamatória podem ser associadas a elevados níveis de IL-6 na fase crônica da doença (CHOW *et al.*, 2011; HORCADA *et al.*, 2015).

Figura 5: Patogênese da infecção por CHIKV.



Fonte: Adaptada de Lum & Ng, 2015.

As células monocíticas migram para os tecidos sinoviais contribuindo de forma significativa para a inflamação persistente nas articulações, apesar da ausência de vírus no sangue durante a fase crônica da doença (TSETSARKIN *et al.*, 2007).

Estudos em modelos animais mostraram que a depleção de macrófagos diminuiu consideravelmente o inchaço/edema, causado pela infecção por CHIKV, nesse sentido uma abordagem possível seria a de que a exacerbação da resposta imune poderia contribuir para indução da infecção por CHIKV (BURT *et al.*, 2012). Pesquisas em modelo de experimentação animal apresentaram achados que são consistentes com a teoria da persistência do CHIKV no tecido sinovial, onde o CHIKV foi detectado no tecido articular dos primatas após 90 dias de infecção, juntamente com sinais evidentes de inflamação crônica (LABADIE *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao IFN do tipo II, ou Interferon gama (IFN- γ), é produzido principalmente por células NK (*natural killers*) e linfócitos T ativados. Via de regra, pacientes

que conseguem controlar bem a infecção por CHIKV, normalmente expressam altos níveis dessas citocinas (WAUQUIER *et al.*, 2011).

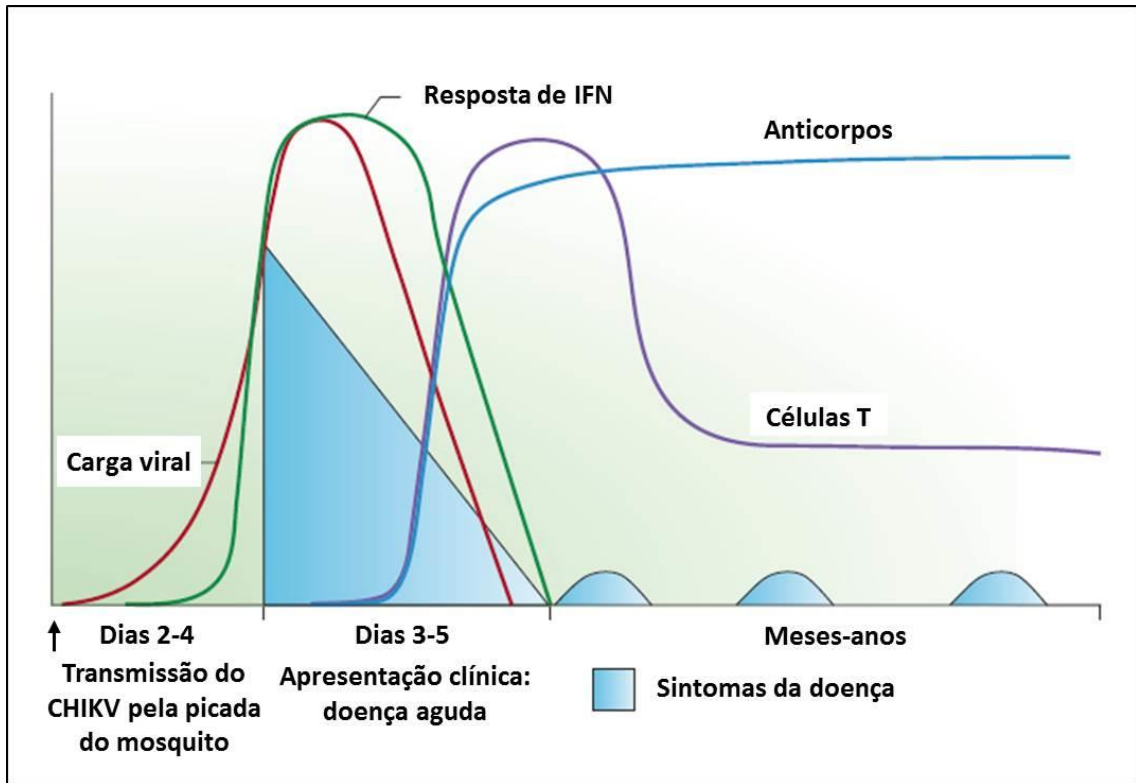
Os casos mais graves da infecção por chikungunya dependem diretamente da ação de múltiplos fatores, dentre eles, a persistência viral, mecanismos e fatores associados à reativação do vírus nas articulações, evasão da resposta imune, resposta imune descontrolada de citocinas pró-inflamatórias e reatividade cruzada com autoantígenos (POO *et al.*, 2014; GOUPIL; MORES, 2016; BURT *et al.*, 2017).

1.2.4 Resposta Imune a infecção pelo CHIKV

A defesa contra micro-organismos é mediada por reações iniciais da imunidade inata e por respostas tardias na imunidade adaptativa. Os mecanismos que normalmente protegem os indivíduos das infecções também são capazes de provocar lesão tecidual e doenças em algumas situações (ABBAS *et al.*, 2012).

O início da infecção causada pelo CHIKV coincide com o aumento do título viral, que desencadeia a ativação de uma resposta imune inata, primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores, cuja característica principal é a produção de IFN-I. Os pacientes eliminam o vírus em cerca de uma semana após a infecção, momento onde há evidência de imunidade adaptativa específica ao CHIKV (Figura 6) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Figura 6: Resposta imune ao CHIKV.



Fonte: Adaptada de Schwartz; Albert *et al.*, 2010.

Na fase aguda ocorre ativação da imunidade inata para combater a propagação, replicação e disseminação viral, logo, é esperada uma rápida e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-18), citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), quimiocinas (Fator Estimulador de Colônias Granulócitos - Macrófagos / GM-CSF, IP-10, MCP-1, Monoquina Induzida por Interferon Gama / MIG, Proteína Inflamatória de Macrófago / MIP-1a e MIP-1b) e fatores de crescimento (Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico - FGF) (HOARAU *et al.*, 2010; WAUQUIER *et al.*, 2011, TENG *et al.*, 2015).

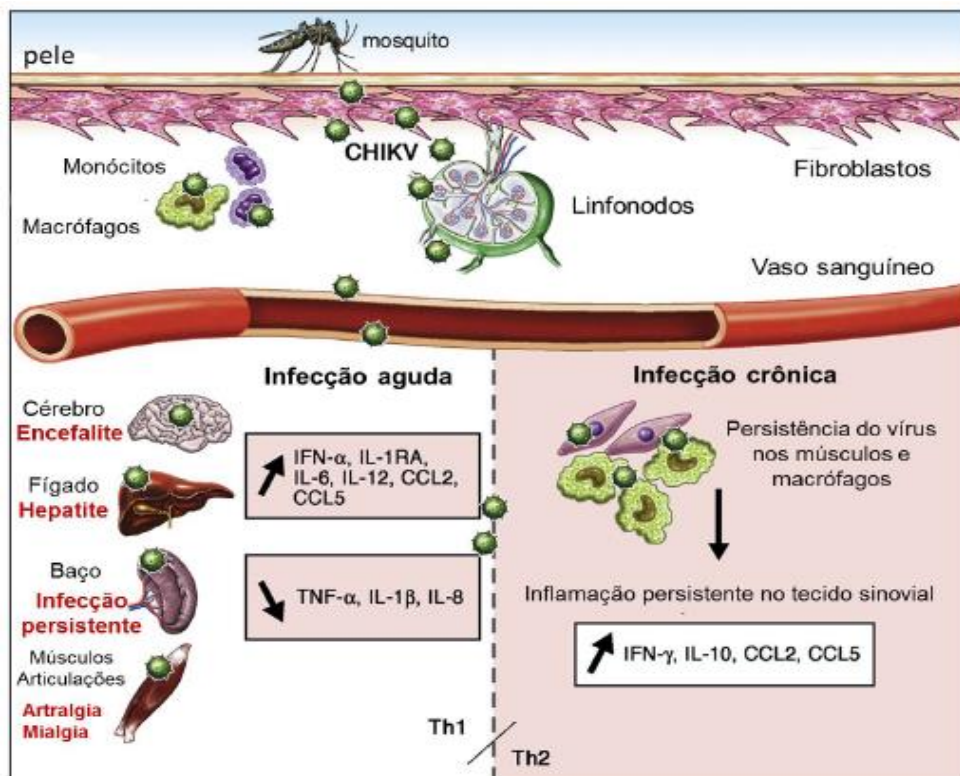
A fase pós-aguda envolve principalmente macrófagos (CHOW *et al.*, 2011) e apresenta mediadores pró-inflamatórios (HOARAU *et al.*, 2010). À medida que a doença progride para a fase crônica, a IL-17 torna-se detectável. Sendo que a persistência da artralgia pode ser associada a elevados níveis de IL-6 e de G-CSF (CHOW *et al.*, 2011).

Níveis séricos mais elevados de IL-1 β , RANTES/CCL5 e outros fatores pró-inflamatórios, como IFN- α , IL-6 e a proteína de 10 kDa (IP-10, também CXCL10) foram encontrados em pacientes com doença grave por CHIKV, com poliartrite severa, em comparação aqueles com doença mais leve, apontando o envolvimento desses mediadores

imunes como causa das dores crônicas nas articulações e nos músculos (HOARAU *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2009). Indicando ainda, que níveis elevados desses mediadores podem ser utilizados como marcador de mau prognóstico da doença (NG *et al.*, 2009).

A resposta inflamatória ao vírus leva a eliminação viral no sangue e a recuperação clínica do paciente. Em um grupo de indivíduos, a artralgia e mialgia podem persistir, culminando em casos de síndrome artrítica debilitante que pode durar até mais de 1 ano. (HOARAU *et al.*, 2010). Petitdemange *et al.*, 2015 relataram que pacientes com doença crônica desenvolvem uma grave inflamação sistêmica com altos níveis de citocinas do perfil Th2, IL-4 e IL-13 e isto pode estar associado aos elevados níveis de TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-12 produzidos na fase aguda, ou seja, forte resposta Th1 durante a infecção aguda. Entre essas fases, macrófagos são ativados para regular a inflamação e um ciclo vicioso de produção de IL-6/RANKL pode também estar associado à persistência da doença (Figura 7) (DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012, NORET *et al.*, 2012, PHUKLIA *et al.*, 2013).

Figura 7: Imunopatologia do CHIKV.



Fonte: Adaptada de Petitdemange *et al.*, 2015.

Contudo, assim como outros vírus, é possível que CHIKV tenha desenvolvido mecanismos para modular a resposta imune do hospedeiro, e um dos principais candidatos é a proteína não estrutural (nsP2) que atua desligando o sinal de IFN tipo I, portanto, inibindo a

síntese de receptores de IFN tipo I, e ocasionando uma diminuição da resposta imune frente ao patógeno (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; TENG *et al.*, 2011).

Na infecção crônica, a presença de infiltrados de células inflamatórias e replicação viral em tecidos como os músculos, sugerem a persistência do vírus pela continuidade de replicação em tecidos-alvo, especialmente, tecidos articulares, onde a replicação leva ao recrutamento de células inflamatórias com capacidade migratória, como monócitos, macrófagos e células NK, o que em longo prazo desencadeia a patologia do tecido musculoesquelético (GOUPIL; MORES, 2016). A resposta inflamatória coincide com níveis elevados de mediadores e infiltração de células imunes em articulações infectadas e tecidos circundantes (BURT *et al.*, 2017). Ocorre também a persistência de imunoglobulina do tipo M (IgM) circulante e desenvolvimento de artrite reumatoide. Estes podem estar associados em um menor ou maior grau a predisposições genéticas individuais (PATTERSON *et al.*, 2016).

O estabelecimento da resposta imune adaptativa ocorre já nos estágios iniciais da infecção com ativação e proliferação de células TCD8+ precocemente, envolvendo citocinas antivirais e uma forte resposta inflamatória. Posteriormente, foi observado apoptose mediado por expressão de CD95 induzida por CHIKV em células T CD4+ nos primeiros dois dias de sintomas, sugerindo apoptose precoce deste tipo celular, compatível com o quadro de linfopenia desenvolvido por pacientes com a infecção por CHIKV. Em estágios mais tardios da fase aguda foram caracterizadas respostas acentuadas de células T CD4+ e produção de proteínas pró-inflamatórias, com aumento de IFN- γ , IL-7 e IL-12 (WAUQUIER *et al.*, 2011).

A produção precoce de resposta imune específica também pode ser explicada pela regulação positiva de citocinas como IL-4 e IL-10 que ativam as células B. Os anticorpos produzidos atuam prioritariamente nas proteínas expostas do envelope viral E1 e E2. Os anticorpos IgM anti-CHIKV são detectados poucos dias após o início da infecção, até a segunda semana da doença, coincidindo com o aumento de imunoglobulina do tipo G (IgG) anti-CHIKV que permanece na fase tardia da infecção aguda, e ainda na fase crônica, com duração de anos após a infecção, proporcionando assim uma forte imunidade antiviral que previne sintomas clínicos no caso de uma segunda infecção pelo CHIKV (FOX; DIAMOND, 2017).

O quadro 1 detalha algumas características de estudos anteriores, realizados acerca da resposta imune a CHIK, no período de 2009 a 2018.

Quadro 1: Características dos estudos da literatura referentes à avaliação de citocinas em casos de chikungunya.

Fase da Doença	IFN- γ	IL-6	IL-10	TNF	IL-7	IL-8	IL-1 β	IFN- α	IFN- β	IL-12	IL-17	IL-4	MCP-1	IL-21	IL-22	IL-27	IL-29	IL-15	Autores/Ano	Grupos	Tipo	N	N Citocinas Testadas/Método	Amostra	Tempo de sintomas	Local	
Aguda		↑	↑		↑	↓	↑	↑										↑	Ng et al. 2009	Agudo	Transversal	10	30 / M	P	2-19 dias (mediana 4,5 dias)	Cingapura	
	↑																		Hoarau et al., 2010	Agudo	Prospectivo	49	11 / E	P	média de 4 dias	Ilhas Reunião	
		↑			↑	↑		↑		↑		↑	↑						↑	Chow et al. 2011	Agudo	Caso-controle	30	21 / M	P	média de 4 dias	Cingapura
	↑	↑						↑	↑		↑	↑	↑							Wauquier et al., 2011	Agudo	Prospectivo	69	50 / M	P	0-7 dias	Gabão
	↓		↓	↓			↓			↓										Kelvin et al., 2011	Agudo	Prospectivo	50	13 / CF	S	N/I	Itália
			↑																	Chaaithania et al., 2011	Agudo	Prospectivo	22	30 / M	S	N/I	Índia
		↑																↑		Chirathawom et al., 2013	Agudo	Prospectivo	28	17 / M	S	2-6 dias	Tailândia
	↑						↑	↑	↑				↑					↑		Venugopalan et al., 2014	Sintomático	Prospectivo	132	11 / E	S	0-30 dias	Índia
												↑						↑		Dantas et al., 2016	Reumático Não-Reumático	Transversal	75	5 / E	S	N/I	Recife-BR
Crônico		↑	↑	↓							↑	↓							Chang et al., 2018	Agudo (dor articular)	Caso-controle	121	10 / M	S	N/I	Colômbia	
	↑						↑		↑										Hoarau et al., 2010	Crônico	Prospectivo	49	11 / E	P	média de 12 meses	Ilhas Reunião	
	↑	↓	↑	↑			↑		↑										Kelvin et al., 2011	6 meses e 12 meses	Prospectivo	50	13 / CF	S	N/I	Itália	
		↑				↑							↑						Chaaithania et al., 2011	10 meses	Prospectivo	22	30 / M	S	N/I	Índia	
												↑								Chow et al. 2011	Convalescença cedo	Caso-controle	30	21 / M	P	média 10 dias	Cingapura
																			Convalescença tardia		média de 4-6 semanas						
												↑							Crônico		média de 2 a 3 meses						
											↑							↑	Dantas et al., 2016	Reumático e Não-Reumático	Transversal	75	5 / E	S	N/I	Recife-BR	

	Associação não significativa
↑	Associação significativa (correlação positiva)
↓	Associação significativa (correlação negativa)
	Não investigado

CF – Citometria de Fluxo
E – ELISA
M – Multiplex
N – Número amostral
N/I – Não Informado
P – Plasma
S – Soro

Fonte: Elaborado pela autora.

1.2.5 Manifestações Clínicas

A chikungunya apresenta um período de incubação de 2-7 dias, no qual aproximadamente 95% das pessoas infectadas desenvolverão sintomas, consistindo em febre alta (chegando a 39-40 °C em alguns casos), dores de cabeça, erupção cutânea, mialgia e dores articulares graves. O CHIKV causa uma infecção caracterizada por um início abrupto de febre coincidente com a viremia (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2011; GOUPIL; MORES, 2016).

A poliartralgia e/ou poliartrite geralmente começam na época do início da febre e normalmente são simétricas. As articulações periféricas (articulações interfalângicas, punhos e tornozelos) e grandes articulações (como ombros, joelhos e coluna) são frequentemente afetadas (STAIKOWSKY *et al.*, 2009; VIAJAYAKUMAR *et al.*, 2011). Os sintomas articulares podem ocorrer de maneira flutuante, mas geralmente não muda a localização anatômica, persistindo por meses a anos (BRASIL, 2017).

A manifestação cutânea pode aparecer 2 a 4 dias após o início da febre, geralmente uma erupção maculopapular (muitas vezes pruriginosa), ocorrendo no tronco e nos membros e raramente na face (BURT *et al.*, 2012; THIBERVILLE *et al.*, 2013).

A doença pode evoluir em três fases: aguda, pós-aguda e crônica. Após o período de incubação inicia-se a fase aguda ou febril, que dura até o décimo quarto dia do início dos sintomas. Alguns pacientes evoluem com persistência das dores articulares após a fase aguda, caracterizando o início da fase pós-aguda, com duração de até três meses. Quando a duração dos sintomas persiste além dos três meses atinge-se a fase crônica (BRASIL, 2017).

Na fase aguda, as artralguas são predominantemente periféricas envolvendo tornozelos, punhos e falanges e podem ser incapacitantes. A dor articular é principalmente poliarticular, bilateral e simétrica. Cerca de 10-20% dos pacientes acometidos pelo CHIKV, pode entrar em uma fase poliarticular persistente que pode até se assemelhar à artrite reumatóide (AR) (SUHRBIER *et al.*, 2012). O tratamento da dor envolve todas as fases da doença e não apenas as fases pós-agudas e crônicas, devendo ser efetivo desde os primeiros dias de sintomas. A dor aguda tratada de forma inadequada é uma das principais causas de sua cronificação, e desencadeia outros sintomas como a depressão, a fadiga e os distúrbios do sono. Na infecção pelo CHIKV existe a necessidade de uma abordagem eficaz no controle da dor visando inclusive diminuir o tempo de doença clínica (BRASIL, 2017).

O espectro das manifestações reumáticas e musculoesqueléticas pós-chikungunya podem incluir além da persistência da dor, quadros autoimunes como a artrite reumatoide. Além disso, embora menos comuns manifestações graves, incluindo doença gastrointestinal, complicações neurológicas como meningoencefalite e convulsões, doença cardiovascular, manifestações hemorrágicas foram relatadas. Estas manifestações graves são mais frequentes em crianças, idosos e pessoas que têm comorbidades subjacentes, podendo ser fatais. Transmissão vertical foi relatada pela primeira vez durante a epidemia nas Ilhas da Reunião e ocorreu em 50% das mulheres com viremia no parto (período puerpério e imediatamente anterior ao parto). A transmissão vertical de mãe para filho é incomum, mas todos os recém-natos infectados durante o trabalho de parto apresentaram doença sintomática com manifestações graves (50%), incluindo encefalopatia em até 90% dos casos (GERARDIN *et al.*, 2008; GOUPIL; MORES, 2016).

Existe um forte componente inflamatório associado à infecção causada pelo CHIKV, levando a uma resposta que coincide com a elevação dos mediadores imunológicos seguido pela infiltração de células imunes em articulações infectadas e tecidos circundantes, mas até o momento não há tratamento antiviral específico (BURT *et al.*, 2012). A terapia geralmente utilizada é paliativa. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINE) (ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, nimesulida, ácido acetilsalicílico, associações, entre outros) não devem ser prescritos na fase aguda da doença devido ao maior risco de complicações renais e de sangramento aumentado desses pacientes, além da necessidade de realizar o diagnóstico diferencial para excluir quadros de dengue, o que muitas vezes não é possível. O uso da aspirina na fase aguda também está associado ao aparecimento da síndrome de *Reye*, com presença de hepatotoxicidade e rápida progressão a encefalopatias e confusão mental. Os corticosteroides também são contraindicados na fase aguda, devido a riscos de complicações (BRASIL, 2017).

Em uma proporção de pacientes, a artrite ocasionada pelo CHIKV pode entrar em uma fase persistente crônica, onde a terapia não é muito clara. Muitos pacientes continuam a receber o hidroxiquina (HCQ) sem qualquer evidência de benefício. Um estudo que comparou a eficácia da terapia tripla (hidroxiquina, sulfassalazina e metotrexato) com apenas a hidroxiquina, em pacientes com CHIK, demonstrou uma melhoria significativa na atividade da doença e também uma redução eficaz na incapacidade e dor. Esse benefício parece ser semelhante ao que foi observado na terapia com drogas antirreumáticas modificadoras da doença (DMARDs) combinados na artrite reumatóide (AR) (RAVIDRAN, 2016).

Dado o fato de que a artrite por CHIK é muito incapacitante e tem o potencial de danificar as articulações de maneira semelhante à AR, parece lógico considerar a terapia agressiva com DMARDs (CHAAITHNYA *et al.*, 2014; RAVIDRAN, 2016). Apesar de atraente, essa abordagem no manejo desses pacientes crônicos ainda não foi formalmente avaliada em um ensaio clínico controlado. Embora a ribavirina e o interferon alfa tenham demonstrado *in vitro* atividade contra a replicação do vírus, nenhum agente antiviral tem se mostrado eficaz contra a infecção humana (SUDEEP *et al.*, 2008).

Os mecanismos pelos quais o CHIKV causa sintomas são pouco compreendidos; no entanto, a resposta inflamatória demonstrou ser a chave para o desenvolvimento da doença. Assim, terapias com o objetivo de modular a inflamação podem ser consideradas como tratamento, principalmente para diminuir as manifestações crônicas (PETITDEMANGE *et al.*, 2015).

1.2.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de chikungunya pode ser realizado por métodos diretos (viroológicos) ou indiretos (sorológicos), que são escolhidos de acordo com a quantidade de dias de doença do paciente (BRASIL, 2017).

As principais técnicas moleculares utilizadas para a pesquisa de genoma do vírus são o RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) e o qRT-PCR (*Real Time RT-PCR*), permitem detectar o ácido nucleico viral até, aproximadamente, o oitavo dia após o aparecimento dos sintomas, sendo que o período de maior viremia vai do primeiro ao quinto dia. Os produtos de RT-PCR e qRT-PCR de amostras clínicas também podem ser usados para genotipagem do vírus, permitindo comparações com amostras de vírus de várias fontes geográficas (BRASIL, 2017). A pesquisa do vírus pode ser realizada por meio do isolamento viral por inoculação em células e camundongos recém-nascidos (BRASIL, 2019a).

O método sorológico é caracterizado pelo teste *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para a detecção de anticorpos específicos do tipo IgM, que podem ser detectados a partir do segundo dia após o aparecimento dos sintomas (sendo que o período mais indicado para essa investigação sorológica é a partir do quinto dia) e do tipo IgG, a partir do sexto dia. Os materiais biológicos a serem coletados são geralmente sangue, soro, líquido cérebro-espinhal (casos neurológicos) e/ou líquido sinovial (BURT *et al.*, 2012; BRASIL, 2017).

Outros métodos indiretos utilizados no diagnóstico são: a imunocromatografia por meio de testes rápidos, os quais possuem uma membrana de nitrocelulose no formato de fita impregnada em cada trecho com antígenos específicos que reagem com os anticorpos que podem estar presentes no sangue, soro ou plasma do paciente, indicando ou não a existência da doença; a inibição da hemaglutinação (IH), imunoflorescência indireta (IFI) e o estudo anatomopatológico seguido de pesquisa de antígenos virais por imuno-histoquímica (IHQ) (BRASIL, 2019a).

1.3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Segundo dados do boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, em 2017, a região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis de chikungunya (142.074 casos; 76,6%) em relação ao total do país e a maior taxa de incidência: 249,6 casos/100 mil habitantes. Entre as unidades federadas, o Ceará se destacou apresentando 1.271,0 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2017). Esse cenário de epidemia na região nordeste no ano de 2017, com destaque no estado do Ceará, tornou-se mais relevante pelo fato de ser o primeiro grande surto de chikungunya em uma população considerada imunologicamente virgem (*naïve*). A doença acarreta elevada limitação física frequentemente acompanhada de um quadro articular crônico impactante na qualidade de vida de um indivíduo, além de redução da capacidade produtiva da população. A chikungunya certamente constituiu em problema de saúde pública, com necessidade de monitoramento constante e intervenções mais eficazes. Todavia, no atual contexto não existem vacinas ou medicamentos antivirais licenciados e eficazes que previnam, limitem a replicação do CHIKV no hospedeiro ou que assistam na recuperação clínica da doença, a qual apresenta uma etiologia complexa e ainda pouco compreendida.

Tendo em vista a necessidade eminente de se identificar possíveis alvos terapêuticos para o CHIKV, como também de se realizar mais pesquisas direcionadas à compreensão de sua patogênese e das variações interindividuais de resposta, torna-se relevante investigar mais detalhadamente a resposta imune inata nas diferentes fases da infecção pelo CHIKV. Além disso, considera-se que a investigação do perfil de soropositividade IgM e IgG para chikungunya e outros arbovirus cocirculantes, combinada a uma avaliação dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro seja fundamental para melhor compreensão dos aspectos imuno-patológicos associados a esta epidemia de chikungunya.

Diante do exposto, a compreensão dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro é de relevância para o desenvolvimento de potenciais moduladores terapêuticos que possam mitigar a gravidade da infecção ou mesmo interromper a progressão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o perfil soropidemiológico em indivíduos com suspeita clínica de CHIK; associar os níveis séricos de IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10 com as fases de progressão da doença e com a soropositividade IgM e IgG anti-CHIKV.

2.2 ESPECÍFICOS

- Descrever características sociodemográficas da população estudada de acordo com sexo, faixa etária e município de ocorrência dos casos;
- Pesquisar anticorpos IgM e IgG para CHIK e relacionar a positividade com o tempo de sintomas relatado;
- Relacionar fatores demográficos com o período de sintomas relatado;
- Investigar codeteções de anticorpos IgM anti-CHIK, anti-DENV e anti-ZIKV;
- Comparar os níveis das citocinas (IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10) em pacientes com suspeita clínica de CHIK de acordo com o resultado sorológico IgM e IgG anti-CHIKV e período de sintomas relatado;
- Determinar possíveis diferenças no comportamento dessas citocinas em pacientes que apresentaram detecção (IgM) única ou dupla (codeteção) entre chikungunya, dengue e Zika.

3. MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS E TIPO DE ESTUDO

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de nº 3.046.022 e CAAE com nº 96810618000005054, seguindo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS.

Trata-se de um estudo descritivo e transversal, com coleta de informações demográficas e análise de amostras biológicas do ano de 2017.

3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO, PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A população do estudo foi composta por uma amostragem dos casos suspeitos de CHIK que foram encaminhados, pelas unidades públicas de saúde do Ceará, ao LACEN/CE, durante o ano de 2017, para diagnóstico laboratorial. Foram selecionadas amostras de forma aleatória (amostra de conveniência), que estavam armazenadas na soroteca do LACEN/CE, utilizando os critérios de inclusão (item 3.2.1).

As sorologias para detecção de anticorpos IgM e IgG para chikungunya, dengue e Zika foram realizadas no Laboratório de Virologia do LACEN/CE, pelo método ELISA. Após essa etapa alguns indivíduos foram removidos do estudo de acordo com os critérios de exclusão (item 3.2.2). Em seguida, o material selecionado para este estudo e que estava armazenado em freezer -80°C foi separado em alíquotas de trabalho e adequadamente conservado para realização posterior das análises laboratoriais de titulação de citocinas.

Após a realização das sorologias IgM e/ou IgG anti-CHIKV foram inferidos grupos/fases da doença de acordo com os dias de sintomas relatados nas fichas epidemiológicas e critérios recomendados pelo Ministério da Saúde para classificação: Aguda (até 14 dias do início dos sintomas), Pós-aguda (de 15 dias até 3 meses do início dos sintomas) e Crônica (> de 3 meses do início dos sintomas). Dentre o total dos participantes, foram analisados separadamente um grupo de pacientes que não apresentaram anticorpos IgM e IgG anti- CHIK. Além disso, após a realização das sorologias anti-DENV/ZIKV foi realizada a seguinte classificação: detecção simples (positividade única de IgM anti-CHIKV)

e detecção dupla (combinação de positividade IgM para dois arbovírus entre CHIK, DENV e ZIKV).

A fim de comparar os marcadores inflamatórios, foram realizadas as dosagens de Interferon gama (IFN- γ), Fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10) no soro dos participantes da pesquisa. A quantificação das citocinas foi realizada, pelo método ELISA, no Laboratório de Imunologia localizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará (UFC), seguindo as recomendações do fabricante (BD Biosciences).

Constituíram fontes de dados, as fichas epidemiológicas e o Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). As variáveis sociodemográficas foram extraídas do banco de dados: idade (em anos), sexo (masculino e feminino), município de ocorrência dos casos e tempo de sintomas relatado no momento da coleta da amostra.

3.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes de ambos os sexos e qualquer faixa etária, que tiveram amostras de soro encaminhadas ao LACEN-CE para diagnóstico laboratorial de CHIK, no ano de 2017, oriundos da rede pública do Ceará, cujas amostras biológicas estavam adequadamente armazenadas em freezer -80°C para a realização das análises do estudo proposto (sem coágulos e hemólise).

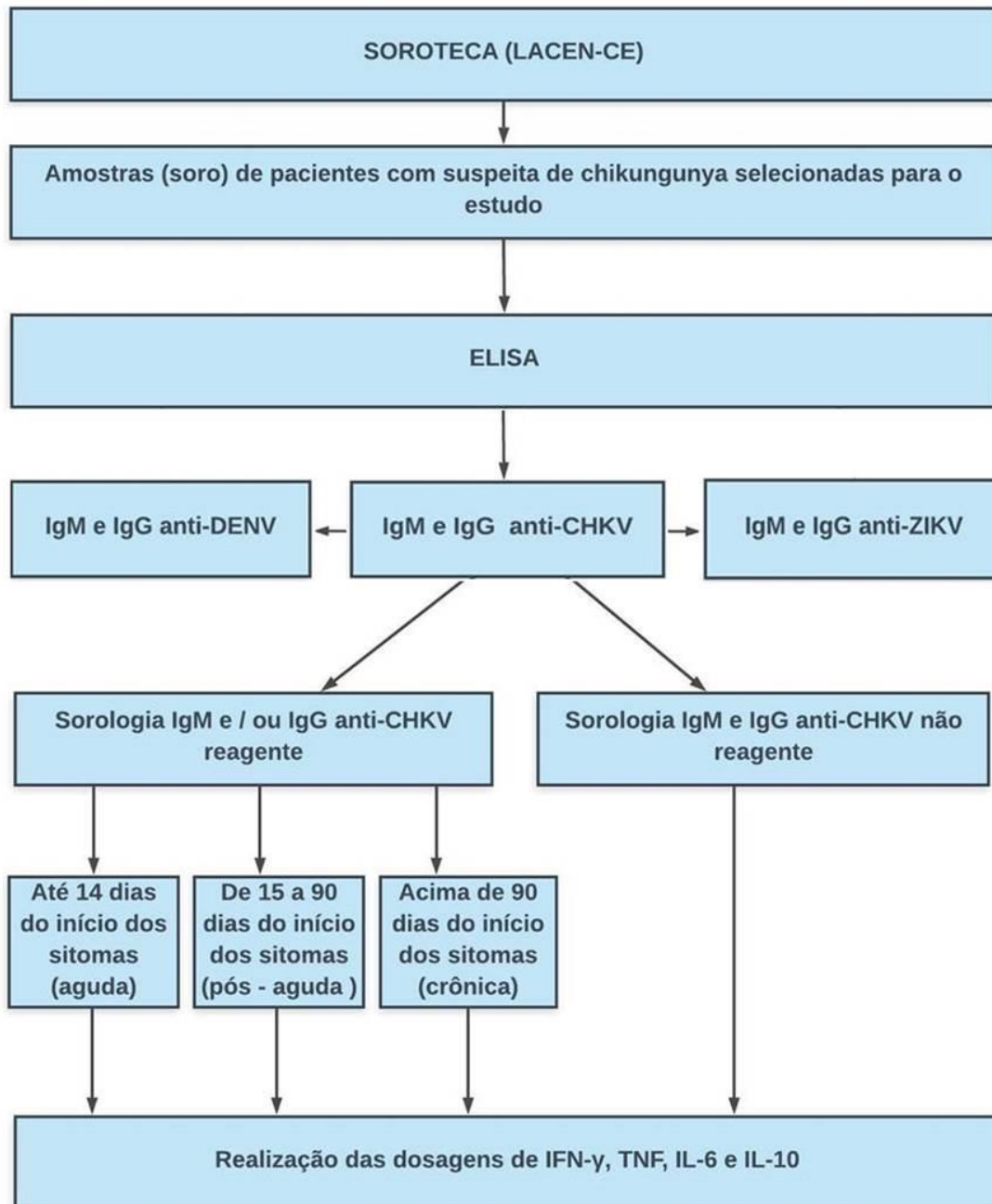
3.2.2 Critérios de exclusão

Pacientes com suspeita de CHIK que apresentaram fichas com dados incompletos, material biológico insuficiente para a realização das análises requeridas, resultados de sorologias para CHIK indeterminados ou não condizentes com o tempo relatado de sintomas.

3.3. DESENHO DO ESTUDO

O desenho do estudo seguiu uma investigação transversal, utilizando um N amostral estatisticamente superior a estudos anteriores e que permitiu a definição de parâmetros e a divisão de grupos para as análises subsequentes. A Figura 8 apresenta fluxograma estratégico utilizado para o desenvolvimento deste estudo.

Figura 8: Fluxograma dos casos suspeitos de chikungunya.



Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 IMUNOENSAIOS

3.4.1 Teste sorológico para IgM e IgG anti-CHIKV

Os kits para diagnóstico laboratorial para chikungunya utilizados foram o anti-vírus chikungunya ELISA-IgM e anti-vírus chikungunya ELISA-IgG, Euroimmun®, Lubeck, Alemanha. Esses kits fornecem um ensaio *in vitro* para anticorpos humanos das classes IgM e IgG específicos para o CHIKV, em amostra de soro ou plasma. Trata-se de um kit para ELISA baseado no método indireto, o qual contém tiras de microplacas revestidas com antígenos de CHIKV recombinante. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra e foram adicionadas aos poços de microtitulação revestidos com antígeno CHIKV recombinante. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, depois foram realizadas três lavagens, com tampão fosfato-salino (PBS), em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição de imunoglobulina de interesse (IgM ou IgG) anti-humano marcada com peroxidase. Após 30 minutos à temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente e depois foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções do fabricante, os resultados foram expressos como valores de índice, calculados dividindo a DO de uma amostra pela DO do calibrador fornecido pelo kit. Valores de índice <0,8 foram considerados negativos, valores de 0,8 a <1,1 foram considerados indeterminados e valores de $\geq 1,1$ foram considerados positivos.

3.4.2 Teste sorológico para Zika

3.4.2.1 IgM anti-Zika

Para detecção qualitativa dos anticorpos específicos IgM contra ZIKV no soro e plasma foi utilizado o kit comercial Novagnost® Zika vírus IgM μ -capture. As microplacas são revestidas com anticorpos da classe IgM anti-humano para que se liguem os anticorpos correspondentes da amostra. Após lavagem dos poços, o conjugado da peroxidase de rábano (HRP) com antígenos do ZIKV, é adicionado. Este antígeno-conjugado se liga aos anticorpos

específicos IgM capturados. O complexo imune formado pelo conjugado ligado é visualizado após adição de substrato de tetrametilbenzidina (TMB), resultando numa reação colorimétrica. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra. As amostras diluídas e os controles negativo, positivo e o controle cut-off (prontos para uso) e foram adicionadas aos poços revestidos com antígeno. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, depois foram realizadas três lavagens, com PBS, em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição da solução de conjugado, que foi incubada por 30 minutos a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados novamente e depois foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio), a placa foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,2 mol/l. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, o valor do cut-off é calculado pelo valor médio de absorvância das determinações do controle de corte. Os resultados foram expressos como Unidades Novagnost® (U), calculados dividindo o valor da absorvância de uma amostra pelo cut-off calculado mediante o controle cut-off. Valores de Unidades Novagnost® (U) <8,5 foram considerados negativos, valores de 8,5 a 11,5 foram considerados indeterminados e valores >11,5 foram considerados positivos.

3.4.2.2 IgG anti-Zika

Foram utilizados kits anti-Zika vírus ELISA IgG, Euroimmun®, Lubeck, Alemanha. O kit contém tiras de microplacas, cada uma com oito poços revestidos com proteína não estruturais recombinantes (NS1) do ZIKV. Na primeira etapa de reação, amostras diluídas do paciente são incubadas nos poços. No caso de amostra positiva, anticorpos IgG específicos (IgA E IgM) se ligarão aos antígenos. Para detecção da ligação do anticorpo, uma segunda incubação é realizada usando um conjugado enzimático anti-IgG humano. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra. As amostras diluídas, o controle positivo, negativo e calibrador (prontos para uso), foram adicionados aos poços revestidos com antígeno recombinante. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C, depois foram realizadas três lavagens em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição do conjugado enzimático (Anti-IgG humano marcado com peroxidase). Após 30 minutos à temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente e depois foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio) durante 15 minutos à temperatura

ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções do fabricante, os resultados foram expressos como valores de índice, calculados dividindo a DO de uma amostra pela DO do calibrador fornecido pelo kit. Valores de índice $<0,8$ foram considerados negativos, valores de 0,8 a $<1,1$ foram considerados indeterminados e valores de $\geq 1,1$ foram considerados positivos.

3.4.3 Teste sorológico para dengue

3.4.3.1 IgM anti-dengue

O diagnóstico laboratorial de dengue por ELISA IgM foi realizado utilizando kit comercial Serion ELISA classic (Brasil), seguindo as recomendações do fabricante. Este teste destina-se à detecção qualitativa de anticorpos IgM anti-dengue em amostras biológicas dos pacientes, os quais, se presentes, ligam-se a antígenos específicos aderidos à superfície de poliestireno de cada um dos 96 poços da placa disponível nos kits. Um anticorpo secundário, que foi conjugado com a enzima fosfatase alcalina, detecta e liga-se ao complexo imune. O substrato incolor p-nitrofenilfosfato é convertido no produto corado p-nitrofenol. A intensidade do sinal do produto desta reação é proporcional à concentração do analito na amostra e é medido por fotometria.

Antes do procedimento, todos os reagentes tiveram sua temperatura equilibrada à temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra, em seguida, 100 μL das amostras diluídas e dos controles (negativo e calibrador) foram adicionadas aos poços revestidos com antígeno recombinante. A placa foi incubada por 1 hora a 37°C , em câmara úmida, depois foram realizadas quatro lavagens em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição de solução do conjugado (anticorpo policlonal dirigido contra IgA, IgG ou IgM humanos, conjugado com fosfatase alcalina). Após 30 minutos a 37°C , em câmara úmida, os poços foram lavados novamente e depois foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (para-nitrofenilfosfato em tampão) durante 30 minutos a 37°C , em câmara úmida. A reação foi interrompida pela adição de solução de parada ($< 0,1\text{N}$ hidróxido de sódio, 40 mM EDTA). As densidades ópticas (DO) foram medidas a 405 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

Para análise dos resultados, seguiram-se as instruções fornecidas pelo fabricante, onde o valor do cut-off é calculado pelo valor médio de absorbância das determinações do calibrador com a margem de +/- 10%, acima de 10% foram considerado positivo, abaixo de 10% negativo e entre esta faixa indeterminado.

3.4.3.2 IgG anti-dengue

O kit comercial utilizado foi o anti-dengue vírus ELISA IgG, Euroimmun®, Lubeck, Alemanha. Contém tiras de microplacas, cada uma com oito poços revestidos com antígenos purificados do vírus da dengue. Na primeira etapa de reação, amostras diluídas do paciente são incubadas nos poços. No caso de amostra positiva, anticorpos IgG específicos (IgA E IgM) se ligarão aos antígenos. Para detecção da ligação do anticorpo, uma segunda incubação é realizada usando um conjugado enzimático anti-IgG humano. As amostras de soro foram diluídas a 1:101 em diluente de amostra. As amostras diluídas, o controle positivo, negativo e o calibrador (prontos para uso) foram adicionados aos poços revestidos com antígeno recombinante. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, depois foram realizadas três lavagens em lavadora Biotek ELx50. Seguida da adição do conjugado enzimático (Anti-IgG humano marcado com peroxidase). Após 30 minutos à temperatura ambiente, os poços foram lavados novamente e depois foi adicionada uma solução substrato-cromógeno (tetrametilbenzidina mais peróxido de hidrogênio) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 0,5 M. As densidades ópticas (DO) foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico Biotek ELx800.

De acordo com as instruções do fabricante, os resultados foram expressos como valores de índice, calculados dividindo a DO de uma amostra pela DO do calibrador fornecido pelo kit. Valores de índice <0,8 foram considerados negativos, valores de 0,8 a <1,1 foram considerados indeterminados e valores de $\geq 1,1$ foram considerados positivos.

3.5. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS

3.5.1 Interferon γ (INF- γ)

A quantificação do IFN gama humano foi realizada pelo método ELISA, utilizando reagentes da marca *BD Biosciences*. A faixa utilizada de curva padrão típica foi de 4,7 – 600

pg/mL.. O anticorpo de captura foi diluído a 1:250 no tampão de revestimento (carbonato e bicarbonato de sódio, pH 9,5). Subsequentemente, 100 µL desta solução de trabalho foram transferidos para cada poço e, posteriormente, a placa foi incubada, *overnight*, em 2°C a 8°C. Após a incubação foram realizadas três lavagens, com tampão de lavagem (PBS e 0,05% *Tween* 20), em lavadora Biotek ELx50. Foram transferidos 200 µL da solução de bloqueio (PBS 1x e SBF a 10% - soro bovino fetal) para cada poço e incubado por 1h a temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi removido após 3 lavagens com 300 µL de solução de lavagem em cada poço, em seguida foram adicionados o padrão e as amostras. O padrão foi diluído em reagente de diluição (solução de bloqueio), sendo transferidos 100 µL de cada mistura nos respectivos poços em duplicata. As amostras foram colocadas (100ul) nos poços posteriores aos das diluições do padrão. As diluições do padrão foram realizadas de forma seriada (fator de diluição 2) em reagente de diluição, começando com um padrão puro e terminando com brancos (apenas o reagente de diluição). Os padrões e as amostras foram incubados por 2h a temperatura ambiente. Após esse período foram realizadas 5 lavagens com solução de lavagem na lavadora *Asys Biochrom*. O anticorpo de detecção foi diluído 1:250 no reagente de diluição, em seguida a estreptavidina foi diluída 1:250 no anticorpo de detecção diluído, a solução final foi adicionada (100 µL / poço) nos poços com incubação de 1h a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados (7x) e depois foram adicionados 100 µL do TMB em cada poço e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2,0 N. As densidades ópticas foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico *Asys Biochrom*.

3.5.2. Fator de Necrose Tumoral (TNF)

A quantificação do TNF foi realizada pelo método ELISA, utilizando reagentes da marca *BD Biosciences*. A faixa utilizada de curva padrão típica foi de 7,8 – 1000 pg/mL.. O anticorpo de captura foi diluído a 1:250 no tampão de revestimento (carbonato e bicarbonato de sódio, pH 9,5). Subsequentemente, 100 µL desta solução de trabalho foram transferidos para cada poço e, posteriormente, a placa foi incubada, *overnight*, em 2°C a 8°C. Após a incubação foram realizadas três lavagens, com tampão de lavagem (PBS e 0,05% *Tween* 20), em lavadora Biotek ELx50. Foram transferidos 200 µL da solução de bloqueio (PBS e SBF a 10% - soro bovino fetal) para cada poço e incubado por 1h a temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi removido após 3 lavagens com 300 µL de solução de lavagem em cada poço,

em seguida foram adicionados o padrão e as amostras. O padrão foi diluído em reagente de diluição (solução de bloqueio), sendo transferidos 100 µL de cada mistura nos respectivos poços em duplicata. As amostras foram colocadas (100ul) nos poços posteriores aos das diluições do padrão. As diluições do padrão foram realizadas de forma seriada em reagente de diluição, começando com um padrão puro e terminando com brancos (apenas o reagente de diluição). Os padrões e as amostras foram incubados por 2h a temperatura ambiente. Após esse período foram realizadas 5 lavagens com solução de lavagem na lavadora *Asys Biochrom*. O anticorpo de detecção foi diluído 1:250 no reagente de diluição, em seguida a estreptavidina foi diluída 1:250 no anticorpo de detecção diluído, a solução final foi adicionada (100 µL / poço) nos poços com incubação de 1h a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados (7x) e depois foram adicionados 100 µL do TMB em cada poço e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico. As densidades ópticas foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico *Asys Biochrom*.

3.5.3. Interleucina 6 (IL-6)

A quantificação do IL-6 humano foi realizada pelo método ELISA, utilizando reagentes da marca *BD Biosciences*. A faixa utilizada de curva padrão típica foi de 4,7 – 600 pg/mL. O anticorpo de captura foi diluído a 1:250 no tampão de revestimento (carbonato e bicarbonato de sódio, pH 9,5). Subsequentemente, 100 µL desta solução de trabalho foram transferidos para cada poço e, posteriormente, a placa foi incubada, overnight, em 2°C a 8°C. Após a incubação foram realizadas três lavagens, com tampão de lavagem (PBS e 0,05% *Tween 20*), em lavadora *Biotek ELx50*. Foram transferidos 200 µL da solução de bloqueio (PBS e SBF a 10% - soro bovino fetal) para cada poço e incubado por 1h a temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi removido após 3 lavagens com 300 µL de solução de lavagem em cada poço, em seguida foram adicionados o padrão e as amostras. O padrão foi diluído em reagente de diluição (solução de bloqueio), sendo transferidos 100 µL de cada mistura nos respectivos poços em duplicata. As amostras foram colocadas (100ul) nos poços posteriores aos das diluições do padrão. As diluições do padrão foram realizadas de forma seriada em reagente de diluição, começando com um padrão puro e terminando com brancos (apenas o reagente de diluição). Os padrões e as amostras foram incubados por 2h a temperatura ambiente. Após esse período foram realizadas 5 lavagens com solução de

lavagem na lavadora *Asys Biochrom*. O anticorpo de detecção foi diluído 1:250 no reagente de diluição, em seguida a estreptavidina foi diluída 1:250 no anticorpo de detecção diluído, a solução final foi adicionada (100 µL / poço) nos poços com incubação de 1h a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados (7x) e depois foram adicionados 100 µL do TMB em cada poço e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico. As densidades ópticas foram medidas a 450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico *Asys Biochrom*.

3.5.4. Interleucina 10 (IL-10)

A quantificação do IL-10 humano foi realizada pelo método ELISA, utilizando reagentes da marca *BD Biosciences*. A faixa utilizada de curva padrão típica foi de 7,8 – 500 pg/mL. O anticorpo de captura foi diluído a 1:250 no tampão de revestimento (carbonato e bicarbonato de sódio, pH 9,5). Subsequentemente, 100 µL desta solução de trabalho foram transferidos para cada poço e, posteriormente, a placa foi incubada, overnight, em 2°C a 8°C. Após a incubação foram realizadas três lavagens, com tampão de lavagem (PBS e 0,05% *Tween 20*), em lavadora Biotek ELx50. Foram transferidos 200 µL da solução de bloqueio (PBS e SBF a 10% - soro bovino fetal) para cada poço e incubado por 1h a temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi removido após 3 lavagens com 300 µL de solução de lavagem em cada poço, em seguida foram adicionados o padrão e as amostras. O padrão foi diluído em reagente de diluição (solução de bloqueio), sendo transferidos 100 µL de cada mistura nos respectivos poços em duplicata. As amostras foram colocadas (100ul) nos poços posteriores aos das diluições do padrão. As diluições do padrão foram realizadas de forma seriada em reagente de diluição, começando com um padrão puro e terminando com brancos (apenas o reagente de diluição). Os padrões e as amostras foram incubados por 2h a temperatura ambiente. Após esse período foram realizadas 5 lavagens com solução de lavagem na lavadora *Asys Biochrom*. O anticorpo de detecção foi diluído 1:500 no reagente de diluição, em seguida a estreptavidina foi diluída 1:250 no anticorpo de detecção diluído, a solução final foi adicionada (100 µL / poço) nos poços com incubação de 1h a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados (7x) e depois foram adicionados 100 µL do TMB em cada poço e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico. As densidades ópticas foram medidas a

450 nm (comprimento de onda de referência) para cada poço utilizando um leitor fotométrico *Asys Biochrom*.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O levantamento de dados foi realizado mediante a análise das fichas epidemiológicas dos pacientes e das informações contidas do Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL). Os dados sócio-demográficos (idade, sexo e município de residência) e laboratoriais (tempo de coleta das amostras sanguíneas após manifestação de sinais e sintomas) foram compilados em planilhas eletrônicas padrão por meio do programa Excel 2010 (Microsoft Office). Os resultados das sorologias de anticorpo anti-CHIKV, DENV e ZIKV foram expressos como mediana; as concentrações das citocinas foram calculadas, por meio das absorbâncias, em relação a uma curva padrão, utilizando-se o método de 5 parâmetros de regressão logística (5PL), e posteriormente estabelecido um ponto de corte baseado no limite mínimo de detecção (LLOD) de cada citocina para a geração de variáveis binárias. Para realização dos testes descritivos e estatísticos todos os dados foram analisados e modelados por intermédio do software Stata, versão 15.

Devido a não normalidade das variáveis contínuas de análise, testes não paramétricos foram empregados: Teste de *Mann-Whitney* (para comparações com variáveis binárias com 1 grau de liberdade), e Teste de *Kruskal-Wallis* (para comparações com variáveis categóricas com 2 ou mais graus de liberdade). Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% e uma taxa de erro α de 5% em que os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

De uma amostragem inicial de 405 participantes selecionados para este estudo, 12 indivíduos foram excluídos após apresentarem resultados de sorologias IgM e/ou IgG indeterminados para CHIK ou dados não condizentes com o tempo relatado de sintomas. Sendo assim, as análises subsequentes deste trabalho foram conduzidas com um total de 393 participantes.

Dentre os participantes (393 casos suspeitos de CHIK), 283 eram de Fortaleza e 110 de outros 24 municípios do estado do Ceará. Observou-se uma variação na idade de 27 dias a 87,6 anos (média 50,6 anos; mediana 48,9 anos), quanto ao sexo 27,5% (108/393) masculino e 72,5% (285/393) feminino. Em relação à faixa etária 41,2% (162/393) estavam entre 40 e 59,9 anos (Tabela 1).

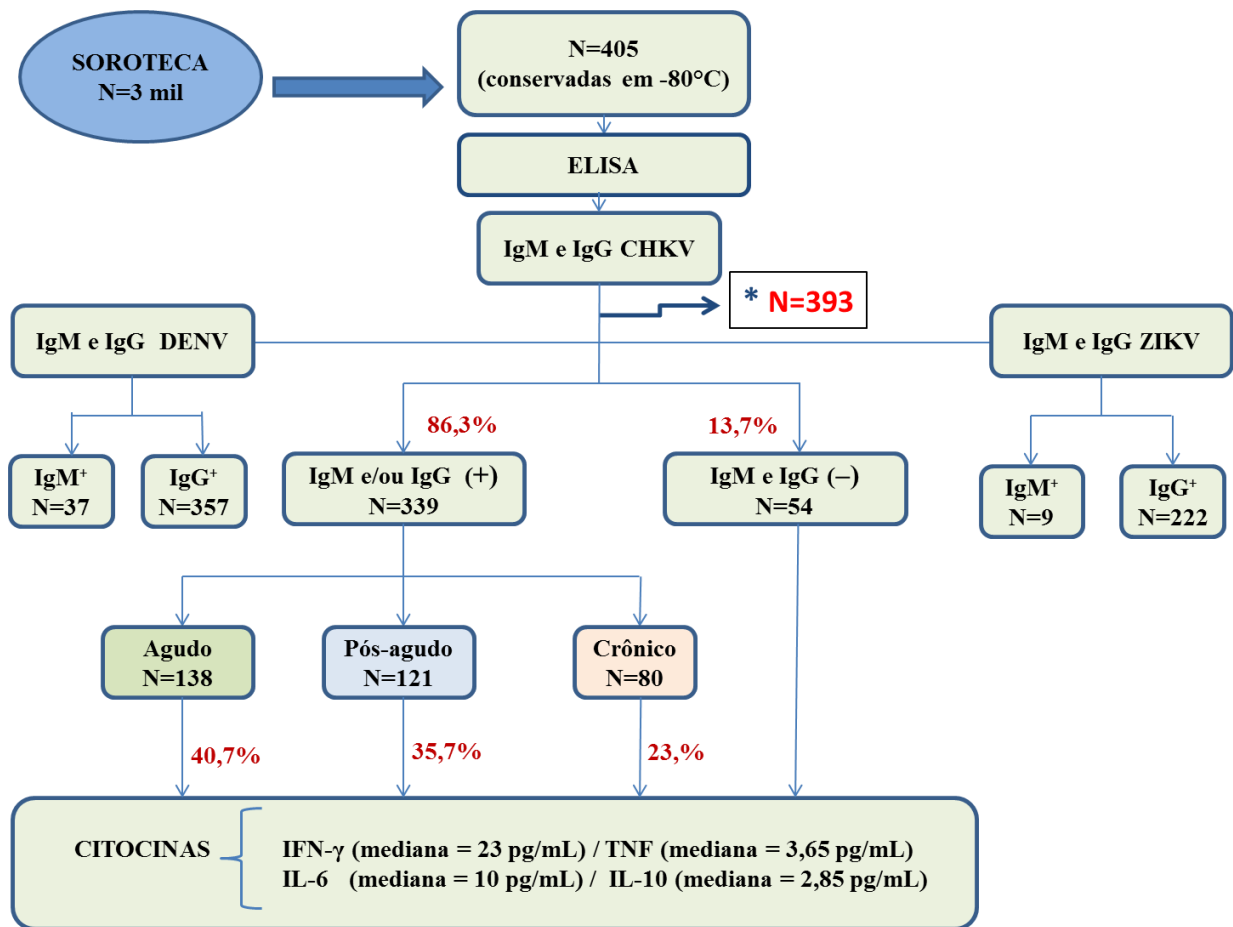
Tabela 1: Características sociodemográficas dos 393 casos suspeitos de chikungunya selecionados para o estudo, Ceará, em 2017.

CARACTERÍSTICAS	FREQUÊNCIA	%
MUNICÍPIO		
Fortaleza	283	72,0
Outros municípios (24)	110	28,0
SEXO		
Masculino	108	27,5
Feminino	285	72,5
IDADE		
< 10	10	2,5
11 a 19,9	23	5,9
20 a 29,9	35	8,9
30 a 39,9	46	11,7
40 a 49,9	80	20,3
50 a 59,9	82	20,9
60 a 69,9	68	17,3
70 a 79,9	39	10,0
>80	10	2,5
TOTAL	393	100

Fonte: Elaborada pela autora.

A pesquisa de anticorpos IgM e IgG para CHIKV, DENV, ZIKV e a quantificação das citocinas: IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 foram realizadas nas amostras dos 393 participantes do estudo (Figura 9).

Figura 9: Fluxo de resultados.



Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente (-) não reagente.

* Exclusão de 12 participantes por apresentarem sorologia IgM e/ou IgG indeterminadas ou não condizentes com o tempo relatado de sintomas, finalizando com 393 participantes.

4.1 ASPECTOS SOROLÓGICOS DOS CASOS SUSPEITOS DE CHIK

Do total, 71,0% (279/393) tiveram sorologia IgM anti-CHIKV reagente e 67,4% (265/393) IgG anti-CHIKV reagente (Tabela 2). Dentre os participantes com IgM anti-CHIKV reagente, 71,7% (200/279) foram do sexo feminino e 28,3% (79/279) masculino e 64,3% estavam na faixa etária de 20 a 59 anos.

Tabela 2: Distribuição da positividade para anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV nos 393 casos suspeitos de chikungunya, Ceará, 2017.

PERFIL	N	%
Anti-CHIKV IgM ⁺	279/393	71,0
Anti-CHIKV IgG ⁺	265/393	67,4

Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente

De acordo com os dias de sintomas presente nas fichas epidemiológicas, os participantes (339) que apresentaram diagnóstico laboratorial de CHIK foram classificados em períodos sintomáticos, fases de progressão da doença, com os seguintes resultados: 138 (40,7%) na fase aguda (até 14 dias do início dos sintomas), 121 (35,7%) na fase pós-aguda (de 15 até 90 dias do início dos sintomas) e 80 (23,6%) na fase crônica (acima de 90 dias início dos sintomas) (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação dos 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK nas fases de progressão da doença, segundo o intervalo de tempo entre o início dos sintomas e a coleta de material biológico, Ceará, 2017.

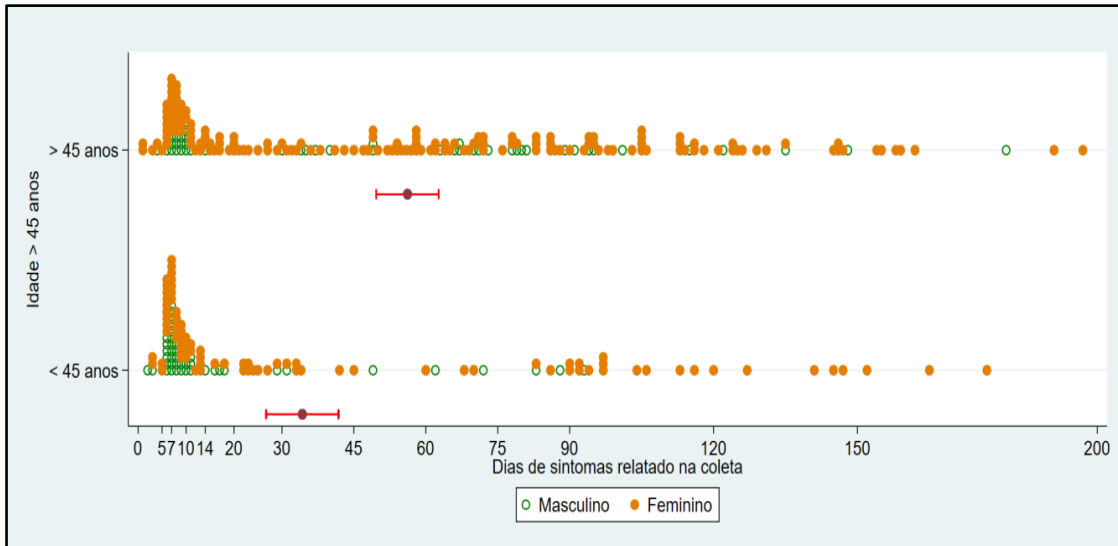
FASES DA CHIK	DIAS DE SINTOMAS	FREQUÊNCIA	%
Aguda	1 – 14	138	40,7
Pós-aguda	15 – 90	121	35,7
Crônica	> 90	80	23,6
Total		339	100

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao relacionar a idade com o tempo de sintomas foi observado que indivíduos com mais de 45 anos demonstraram em média mais dias de sintomas que os menores de 45 anos (Teste de *Mann Whitney*, $p < 0,001$, e $z = -5,321$) (Gráfico 1), similarmemente participantes maiores que 65 anos apresentaram em média um maior tempo de sintomas que indivíduos com menos de 65 anos (Teste de *Mann Whitney*, $p = 0,0001$ e $z = -3,973$) (Gráfico 2). A correlação do sexo com os dias de sintomas relatados mostrou significância estatística (Teste

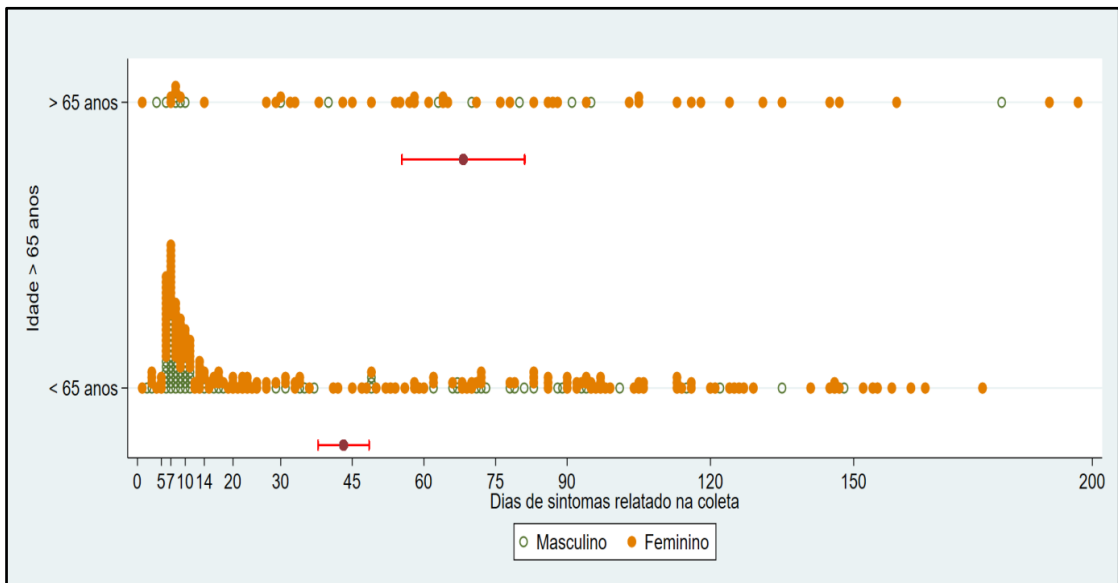
de *Mann Whitney*: $p= 0,0026$ e $z = -3,014$), ou seja, indivíduos do sexo feminino apresentaram em média um maior tempo de sintomas que do sexo masculino (Gráfico 3 e 4).

Gráfico 1: Correlação do sexo (masculino e feminino) e idade (maiores e menores de 45 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.



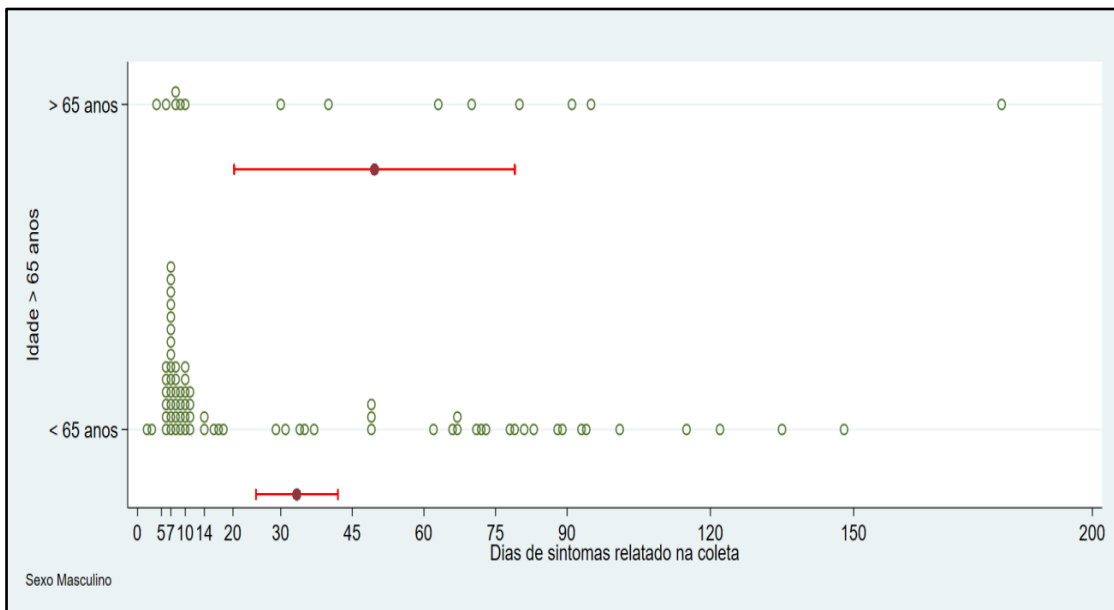
Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*: $> e < 45$ anos em relação ao tempo de sintomas relatado, $p < 0,001$, e $z = -5,321$.

Gráfico 2: Correlação do sexo (masculino e feminino) e idade (maiores e menores de 65 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.



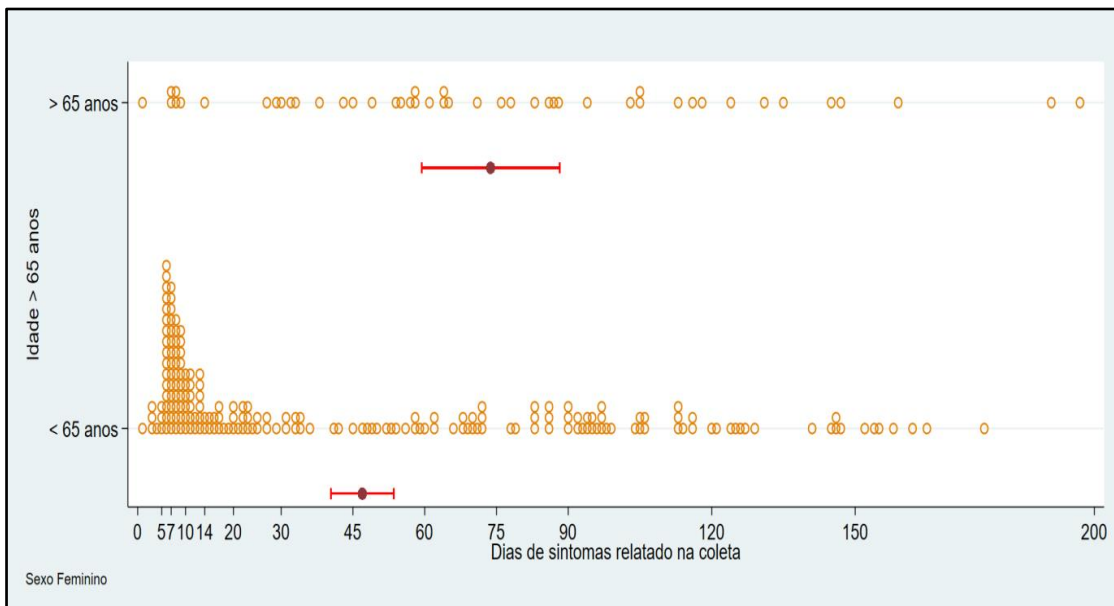
Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*: $> e < 65$ anos em relação ao tempo de sintomas relatado $p = 0,0001$ e $z = -3,973$.

Gráfico 3: Correlação do sexo masculino e idade (maiores e menores de 65 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 4: Correlação do sexo feminino e idade (maiores e menores de 65 anos) dos 339 casos de CHIK com os dias de sintomas relatados, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados das sorologias IgM e IgG para CHIKV foram formados os seguintes perfis (+ para reagente; - para não reagente): CHIKV IgM⁻ IgG⁻; CHIKV IgM⁺ IgG⁻; CHIKV IgM⁻ IgG⁺ e CHIKV IgM⁺ IgG⁺ (Tabela 4).

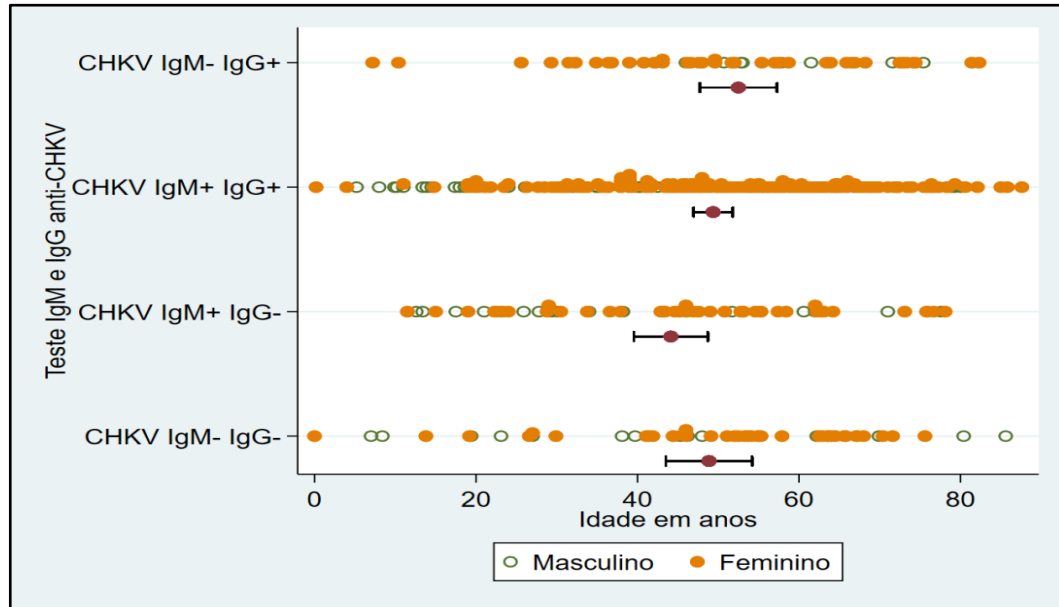
Tabela 4: Distribuição da frequência dos perfis formados a partir dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV realizadas nos 373 casos suspeitos de chikungunya, Ceará, 2017.

PERFIL	FREQUÊNCIA	%
Anti-CHIKV IgM ⁻ IgG ⁻	54	14,5
Anti-CHIKV IgM ⁺ IgG ⁻	64	17,2
Anti-CHIKV IgM ⁻ IgG ⁺	49	13,1
Anti-CHIKV IgM ⁺ IgG ⁺	206	55,2
Total	373	100

Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente (-) não reagente

Ao relacionar os perfis sorológicos com a idade, foi verificado como média e mediana das idades: CHIKV IgM⁻ IgG⁻ (média: 48,1; mediana: 51,5), CHIKV IgM⁺ IgG⁻ (média: 44,1; mediana: 45,6); CHIKV IgM⁻ IgG⁺ (média: 52,5; mediana: 52,0) e CHIKV IgM⁺ IgG⁺ (média: 49,4; mediana: 50,8). Em todos os perfis houve predomínio do sexo feminino (Gráfico 5).

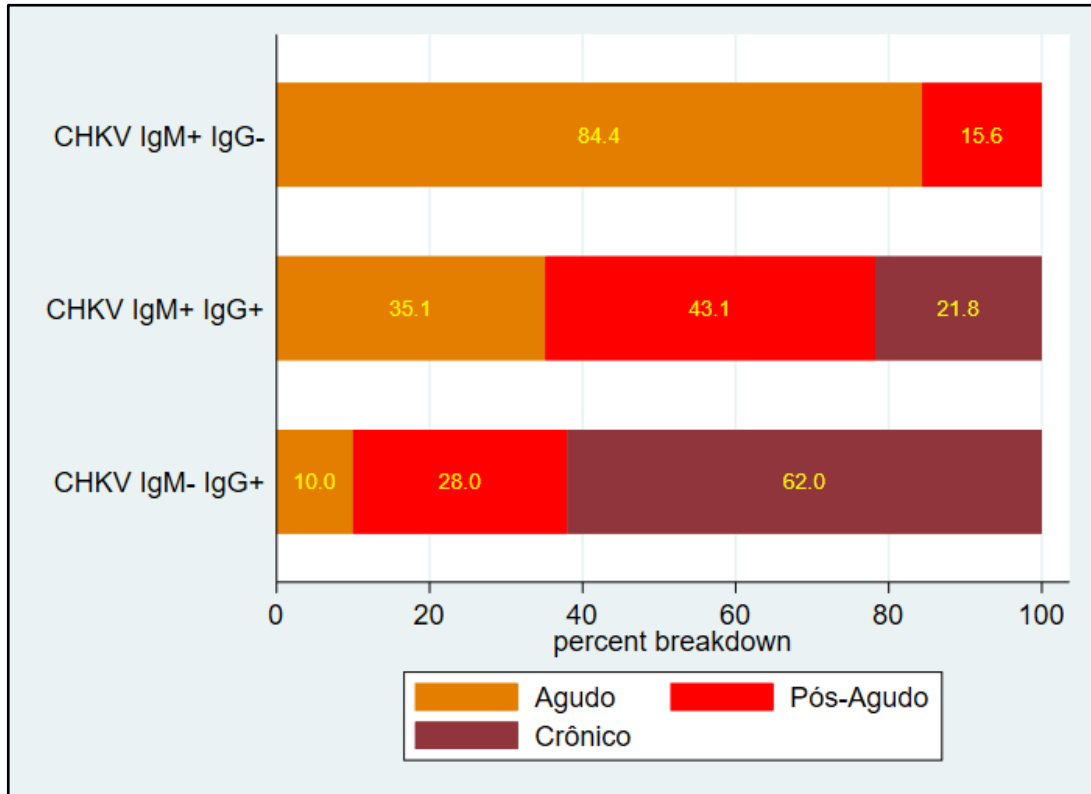
Gráfico 5: Distribuição dos perfis formados a partir dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV, correlacionando-os com idade (média) e sexo, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. (+) reagente (-) não reagente

Após cruzamento dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV com os dias de sintomas, foi observado que: 84,4% dos que apresentaram IgM⁺ IgG⁻ anti-CHIKV estavam com até 14 dias do início dos sintomas (fase aguda); 43,1% dos IgM⁺ IgG⁺ anti-CHIKV tinham entre 15 a 90 dias de sintomas (fase pós-aguda); 62,0% dos IgM⁻ IgG⁺ anti-CHIKV apresentaram mais de 90 dias de sintomas (fase crônica), no entanto 10% dos IgM⁻ IgG⁺ anti-CHIKV estavam na fase aguda da doença (Gráfico 6).

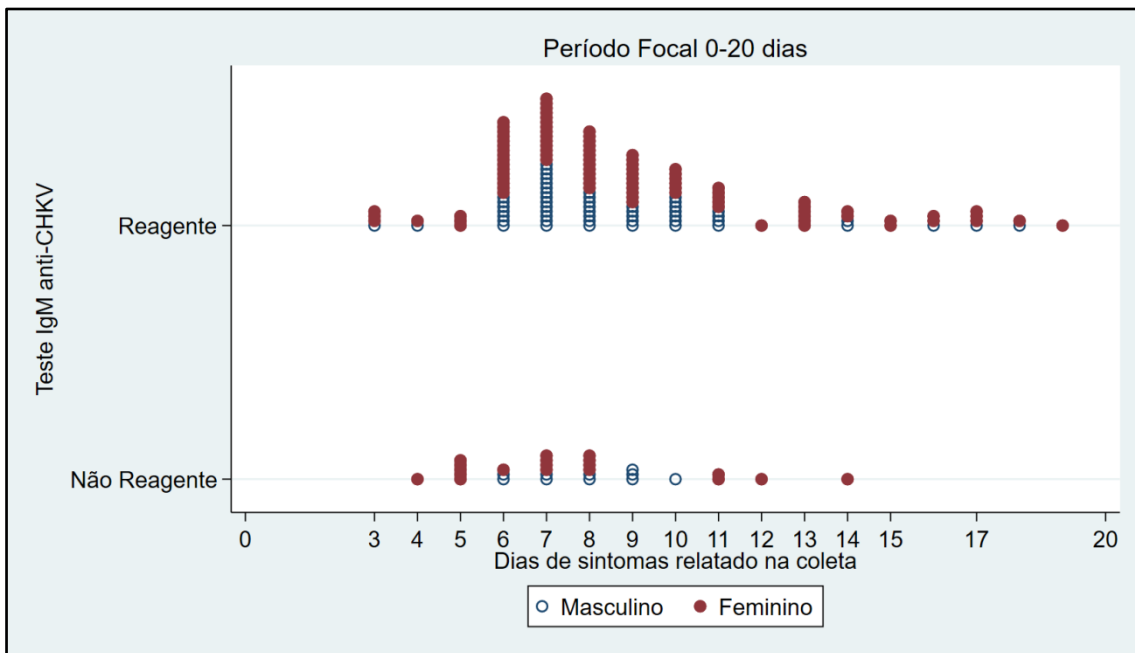
Gráfico 6: Correlação dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV com as fases de progressão da doença dos 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, Ceará, em 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. (+) reagente (-) não reagente

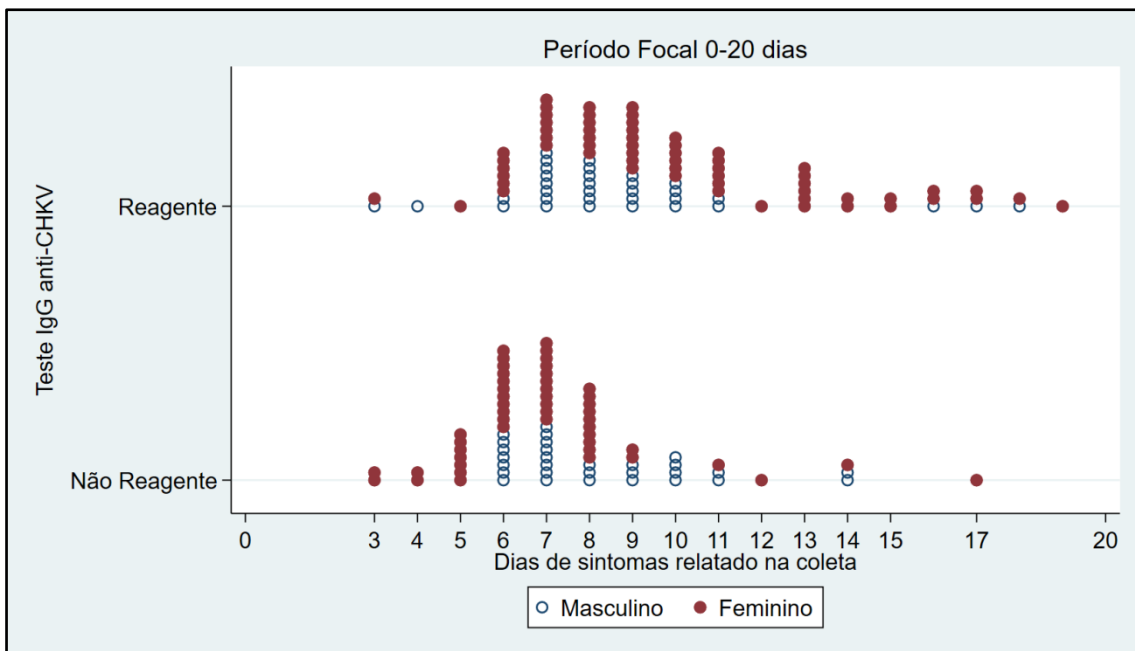
De acordo com os dias de sintomas, foi observado que os participantes que apresentaram IgM anti-CHIKV reagente estavam com no mínimo 3 dias de sintomas, com uma maior concentração de casos em torno de 6 a 8 dias (Gráfico 7). Já a soropositividade para anticorpos IgG anti-CHIKV foi mais frequente entre 7 a 9 dias do início relatado dos sintomas (Gráfico 8).

Gráfico 7: Correlação da soropositividade das sorologias IgM anti-CHIKV nos 393 casos suspeitos para CHIK, com os dias de sintomas relatado e sexo, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*: IgM anti-CHIKV reagente *versus* não reagente em relação ao Tempo de sintomas relatado ($p < 0.001$, $z = 4,29$).

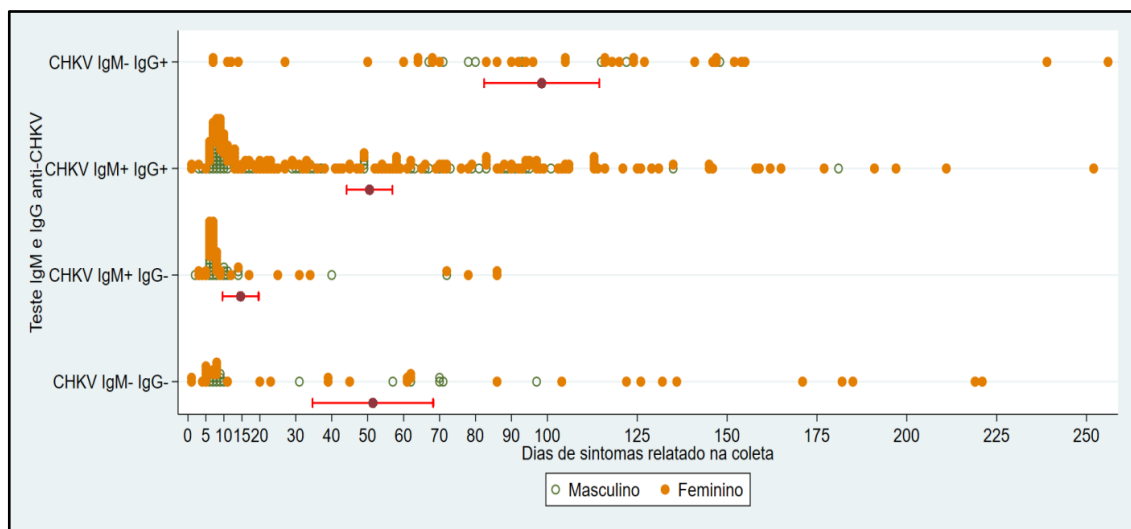
Gráfico 8: Correlação da soropositividade das sorologias IgG anti-CHIKV nos 393 casos suspeitos para CHIK, com os dias de sintomas relatado e sexo, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*: IgG anti-CHIKV reagente *versus* não reagente em relação ao Tempo de sintomas relatado ($p < 0.001$, $z = -7,31$).

Ao relacionar os perfis formados a partir dos resultados das sorologias IgM e IgG anti-CHIKV com os dias de sintomas relatados, foi encontrada como média e mediana do tempo de sintomas: CHIKV IgM⁻ IgG⁻ (média: 50,6; mediana: 15,5), CHIKV IgM⁺ IgG⁻ (média: 14,6; mediana: 7,0); CHIKV IgM⁻ IgG⁺ (média: 133,0; mediana: 105,0) e CHIKV IgM⁺ IgG⁺ (média: 50,5; mediana: 33,0). Foi verificada a presença de anticorpos IgM em indivíduos com mais de 90 dias (49/80) do início dos sintomas (Gráfico 9).

Gráfico 9: Correlação dos perfis sorológicos para CHIK com os dias de sintomas relatados nos 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, em 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. (+) reagente (-) não reagente

Ao observar os resultados dos anticorpos IgM para as três arboviroses estudadas, foi verificado: 71,0% (279/393) IgM anti-CHIKV reagente; 9,4% (37/393) IgM anti-DENV reagente e 2,3% (9/393) IgM anti-ZIKV reagente. Foram encontradas 13,7% (54/393) pacientes com positividade combinada entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV.

Dentre as codeteções: 83,3% (45/54) foram correspondentes a IgM anti-CHIKV/DENV; 9,2% (5/54) IgM anti-CHIKV/ZIKV; 1,9% (1/54) IgM anti-DENV/ZIKV; 5,6% (3/54) IgM anti-CHIKV/ZIKV/DENV (Tabela 5).

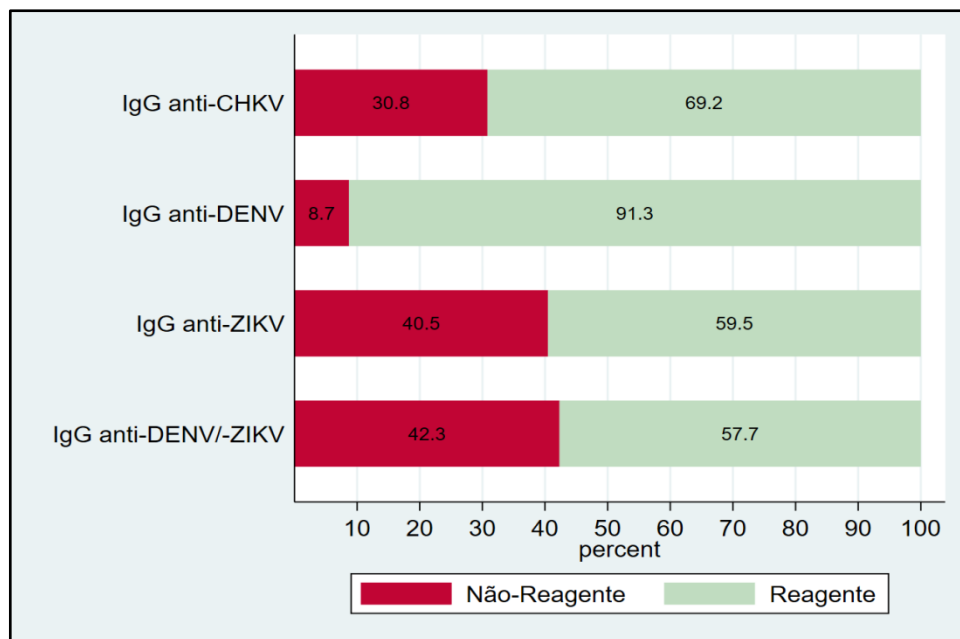
Tabela 5: Distribuição por grupo das codeteccões IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV encontradas em 54 participantes do estudo, Ceará, 2017.

Codeteccão IgM anti-CHIK/DENV/ZIKV	FREQUÊNCIA	%
IgM anti-CHIK ⁺ /DENV ⁺	45	83,3
IgM anti-CHIK ⁺ /ZIKV ⁺	5	9,2
IgM anti-DENV ⁺ /ZIKV ⁺	1	1,9
IgM anti-CHIK ⁺ /DENV ⁺ /ZIKV ⁺	3	5,6
TOTAL	54	100

Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente

Levando em consideração os anticorpos IgG anti-CHIKV/DENV/ZIKV foi verificado: 69,2% (265/383) dos participantes com IgG anti-CHIK reagente, 91,3% (357/391) com IgG anti-DENV reagente e 59,5% (222/373) com IgG anti-ZIKV reagente. Dentre os participantes que tiveram IgG reagente para ZIKV, 97,3% (214/222) apresentaram também IgG anti-DENV. Ao observar o total de participantes, foi encontrado 57,7% (214/371) sorologias reagentes concomitantes para IgG anti-DENV e anti-ZIKV (Gráfico 10).

Gráfico 10: Distribuição da frequência da soropositividade das sorologias IgG anti-CHIKV/DENV/ZIKV nos 393 casos suspeitos para CHIK, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 PERFIS DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF, IL-6 E IL-10 EM CASOS SUSPEITOS DE CHIK

As concentrações de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 foram determinadas e seu comportamento avaliado entre os grupos: agudo (138), pós-agudo (121), crônico (80); entre os perfis CHIKV IgM⁻ IgG⁻; CHIKV IgM⁺ IgG⁻; CHIKV IgM⁻ IgG⁺ e CHIKV IgM⁺ IgG⁺, assim como, nos casos de codetecções entre os chikungunya, dengue e zika.

Os resultados foram categorizados de acordo com a mediana, IFN- γ (< ou \geq 23 pg/mL), TNF (< ou \geq 3,65 pg/mL) IL-6 (< ou \geq 10 pg/mL) IL-10 (< ou \geq 2,85 pg/mL) (Tabela 6).

Tabela 6: Distribuição da mediana e das concentrações mínimas e máximas, em pg/mL, das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 nos 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.

CITOCINA	MEDIANA (pg/mL)	MÍNIMO (pg/mL)	MÁXIMO (pg/mL)
IFN- γ	23,0	0	2.540,85
TNF	3,65	0	339,55
IL-6	10,0	0	1.521,19
IL-10	2,85	0	283,04

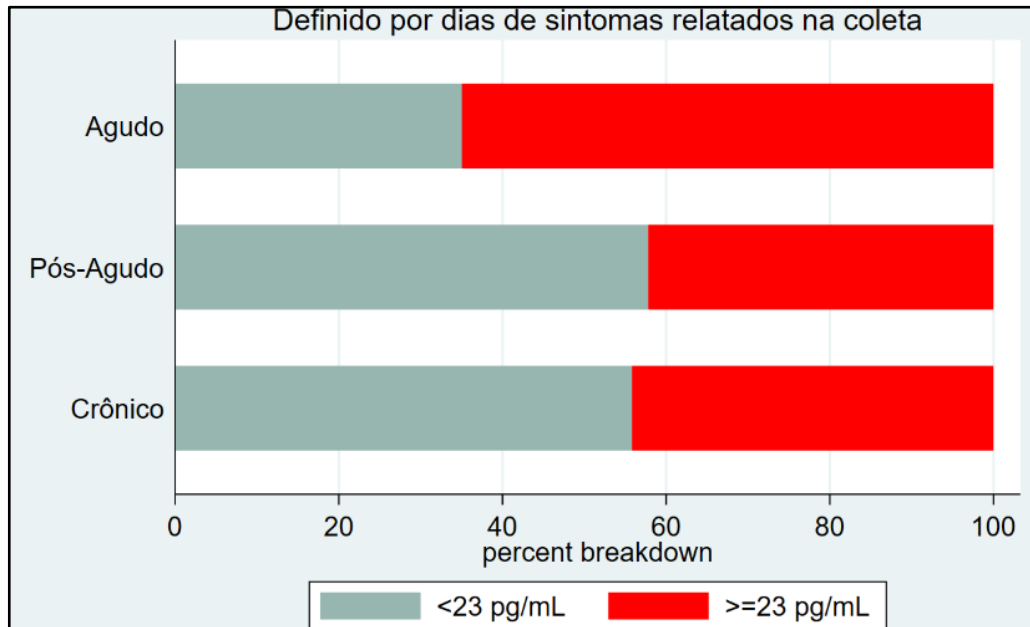
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.1 IFN- γ

Ao comparar as concentrações séricas da citocina IFN- γ com o período/fase de progressão de CHIK (Gráfico 11), foi verificada associação significativa entre elevação dos níveis de IFN- γ com a fase aguda da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p= 0,0001$), assim como os participantes com apenas IgM anti-CHIK reagente apresentaram concentrações mais elevadas desta citocina quando comparado aos outros perfis sorológicos (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p= 0,0005$) (Gráfico 12).

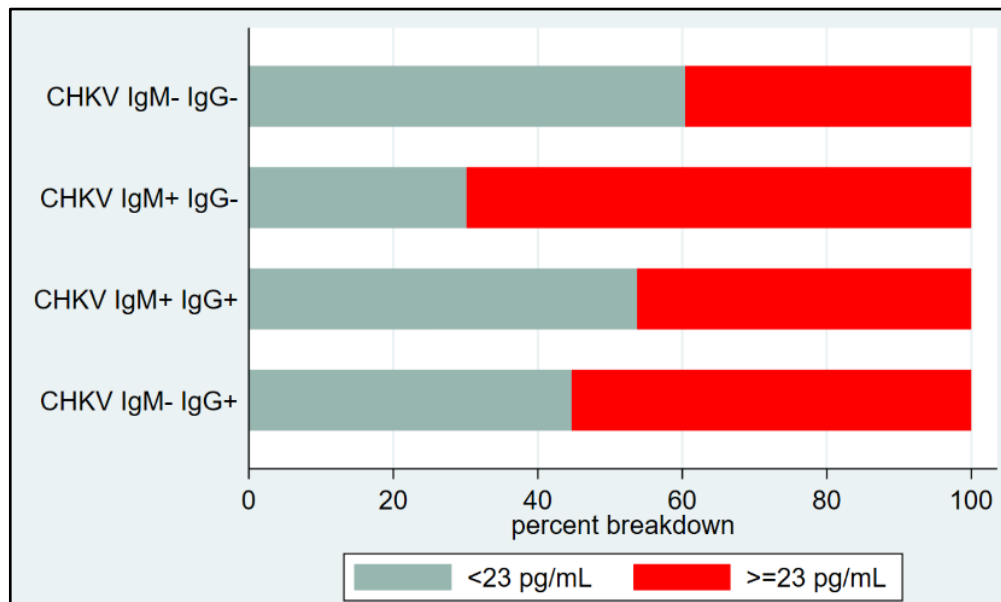
Os níveis séricos de IFN- γ estão mais elevados em indivíduos que apresentaram em média um menor tempo de sintomas (Teste de *Mann Whitney*, $p= 0,0001/ z= 6,222$).

Gráfico 11: Correlação das concentrações da citocina IFN- γ , dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste *Kruskal Wallis* em relação ao período de sintomas relatado (agudo, pós-agudo e crônico), $p=0,0001$.

Gráfico 12: Correlação das concentrações da citocina IFN- γ , dosada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.



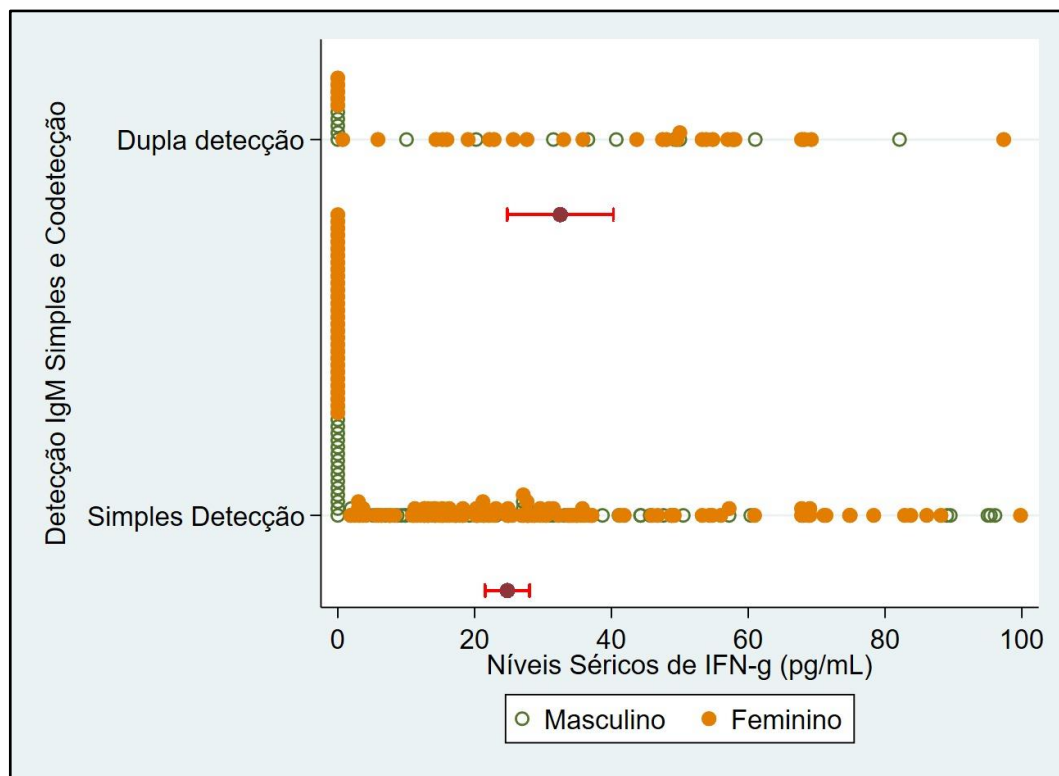
Fonte: Elaborado pela autora. (+) reagente (-) não reagente / Teste *Kruskal Wallis* em relação ao perfil sorológico IgM e IgG anti-CHIKV, $p=0,0005$.

Os participantes que apresentaram dupla detecção (51) de anticorpos IgM entre as arboviroses: chikungunya, dengue e Zika obtiveram concentrações séricas de IFN- γ maiores,

em média, que os com detecção apenas de IgM anti-CHIKV (225) (Teste de *Mann Whitney*, $p= 0,0289 / z= -2,185$) (Gráfico 13).

A distribuição das concentrações séricas da citocina IFN- γ ($<$ ou ≥ 23 pg/mL) nas codeteccões: IgM anti-CHIKV/DENV; IgM anti-CHIKV/ZIKV; IgM anti-DENV/ZIKV e IgM anti-CHIKV/ZIKV/DENV estão representadas na Tabela 7. Observou-se uma tendência de elevação dos níveis de IFN- γ nas codeteccões IgM anti-CHIKV / DENV, porém devido ao número amostral e distribuição insuficiente não foi possível a realização de testes estatísticos.

Gráfico 13: Correlação das concentrações da citocina IFN- γ nas detecções de IgM anti-CHIKV e codeteccões entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*, em relação à detecção simples (CHIK) e dupla detecção de IgM entre chikungunya, dengue e Zika ($p= 0,0289 / z= -2,185$).

Tabela 7: Correlação das concentrações da citocina IFN- γ com as codetecções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.

Codetecção IgM anti- CHIK/DENV/ZIKV	FREQUÊNCIA		TOTAL
	IFN- γ		
	< 23pg/mL	\geq 23pg/mL	
IgM anti-CHIK ⁺ /DENV ⁺	15	30	45/54
IgM anti-CHIK ⁺ /ZIKV ⁺	2	3	5/54
IgM anti-DENV ⁺ /ZIKV ⁺	0	1	1/54
IgM anti- CHIK ⁺ /DENV ⁺ /ZIKV ⁺	3	0	3/54

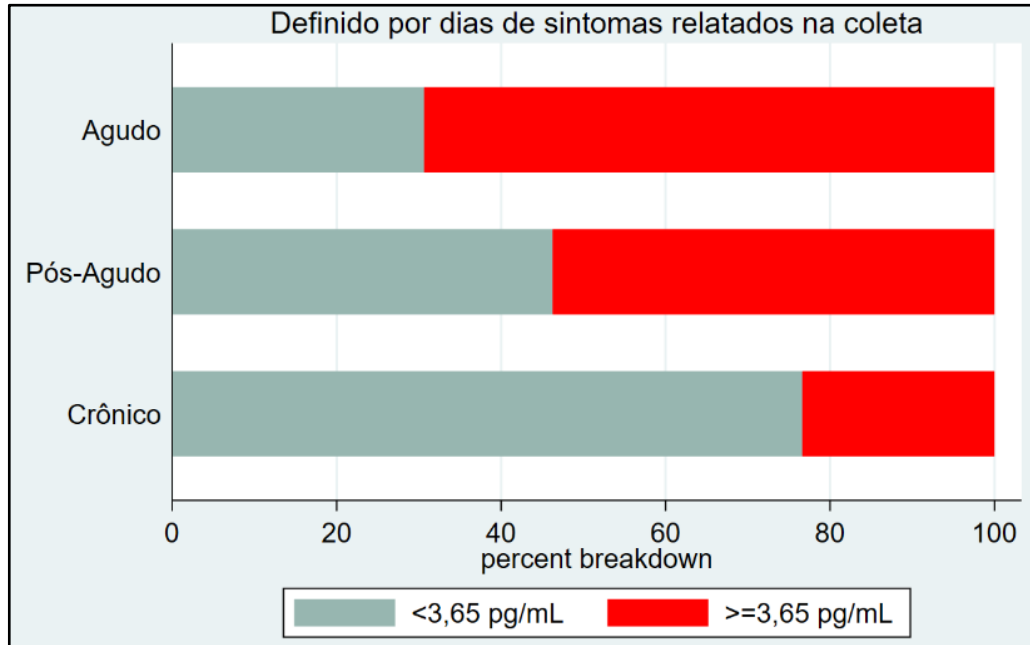
Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente
Número amostral e distribuição insuficiente para a realização de testes estatísticos.

4.2.2 TNF

Ao comparar o comportamento dos níveis séricos do TNF com o período/fase de progressão de CHIK (Gráfico 14), houve significância estatística associando esta citocina a fase aguda da doença (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,0001$), assim como os participantes com apenas IgM anti-CHIK reagente apresentaram concentrações mais elevadas desta citocina quando comparado aos outros perfis sorológicos (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p= 0,0005$) (Gráfico 15).

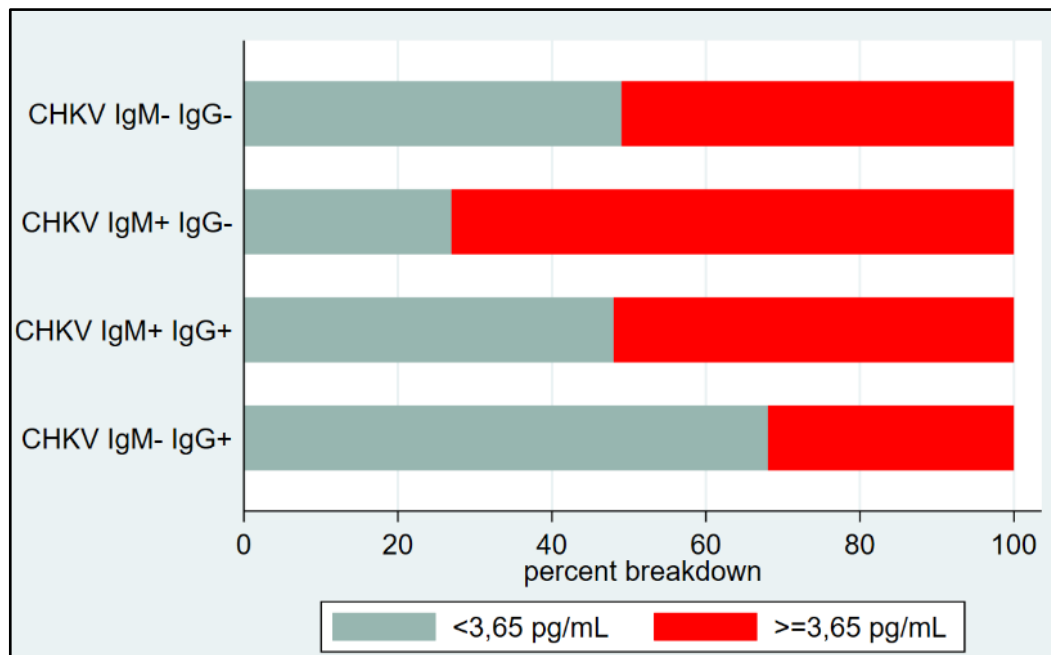
Ao relacionar as concentrações de TNF com o tempo de sintomas relatados foi verificada significância estatística, ou seja, níveis séricos mais elevados da citocina TNF nos indivíduos com, em média, menor tempo de sintomas (Teste de *Mann Whitney*, $p= 0,0001/ z= 7,362$).

Gráfico 14: Correlação das concentrações da citocina TNF, dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste *Kruskal Wallis* em relação ao período de sintomas relatado (agudo, pós-agudo e crônico), $p=0,0001$.

Gráfico 15: Correlação das concentrações da citocina TNF, dosada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.

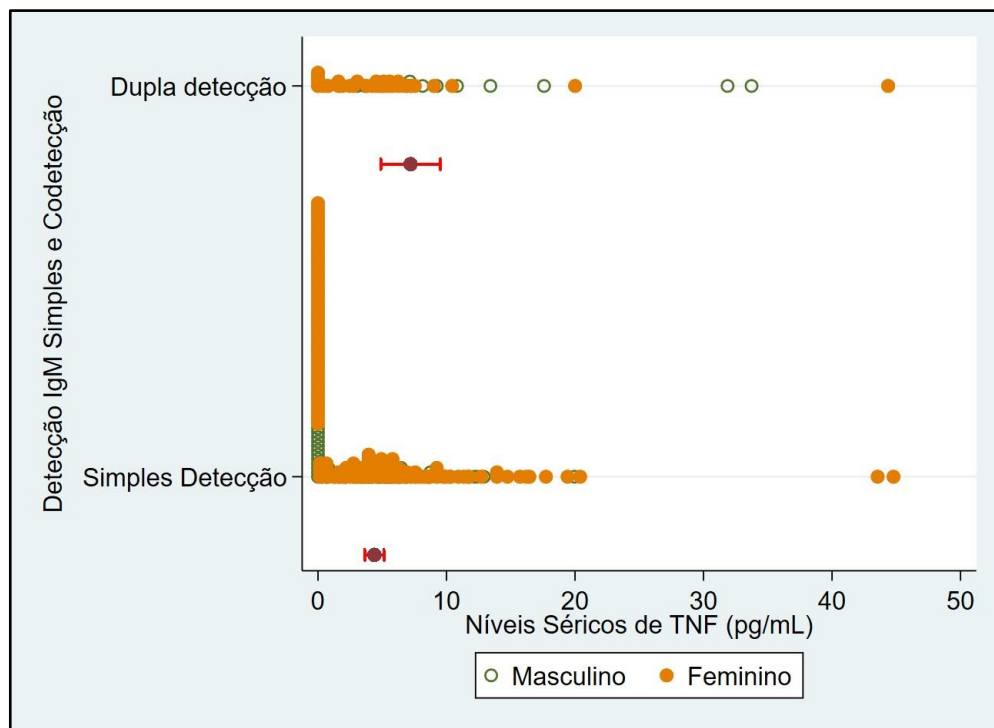


Fonte: Elaborado pela autora. (+) reagente (-) não reagente / Teste de *Kruskal - Wallis* em relação à codeteccção de IgM e IgG anti- CHIKV, $p=0,0005$.

Os participantes que apresentaram dupla detecção (51) de anticorpos IgM entre as arboviroses chikungunya, dengue e Zika obtiveram concentrações séricas, em média, de TNF mais elevadas que os com detecção de apenas IgM anti-CHIKV (225) (Teste de *Mann Whitney*, $p=0,0040$ / $z=-2,875$) (Gráfico 16).

A distribuição das concentrações séricas da citocina TNF (< ou >= 3,65 pg/mL) nas codetecções: IgM anti-CHIKV/DENV; IgM anti-CHIKV/ZIKV; IgM anti-DENV/ZIKV e IgM anti-CHIKV/ZIKV/DENV estão representadas na Tabela 8. Observou-se uma tendência para concentrações mais elevadas de IFN- γ nas codetecções IgM anti-CHIKV / DENV, mas devido ao número amostral e distribuição insuficiente não foi possível a realização de testes estatísticos.

Gráfico 16: Correlação das concentrações da citocina TNF nas detecções de IgM anti-CHIKV e codetecções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*, em relação à detecção simples (CHIK) e dupla detecção de IgM entre chikungunya, dengue e Zika ($p=0,0040$ / $z=-2,875$).

Tabela 8: Correlação das concentrações da citocina TNF com as codeteccões entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.

Codeteccão IgM anti- CHIK/DENV/ZIKV	FREQUÊNCIA TNF		TOTAL
	< 3,65pg/mL	>= 3,65pg/mL	
IgM anti-CHIK ⁺ /DENV ⁺	13	35	45/54
IgM anti-CHIK ⁺ /ZIKV ⁺	2	3	5/54
IgM anti-DEN ⁺ /ZIKV ⁺	1	0	1/54
IgM anti- CHIK ⁺ /DENV ⁺ /ZIKV ⁺	0	3	3/54

Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente

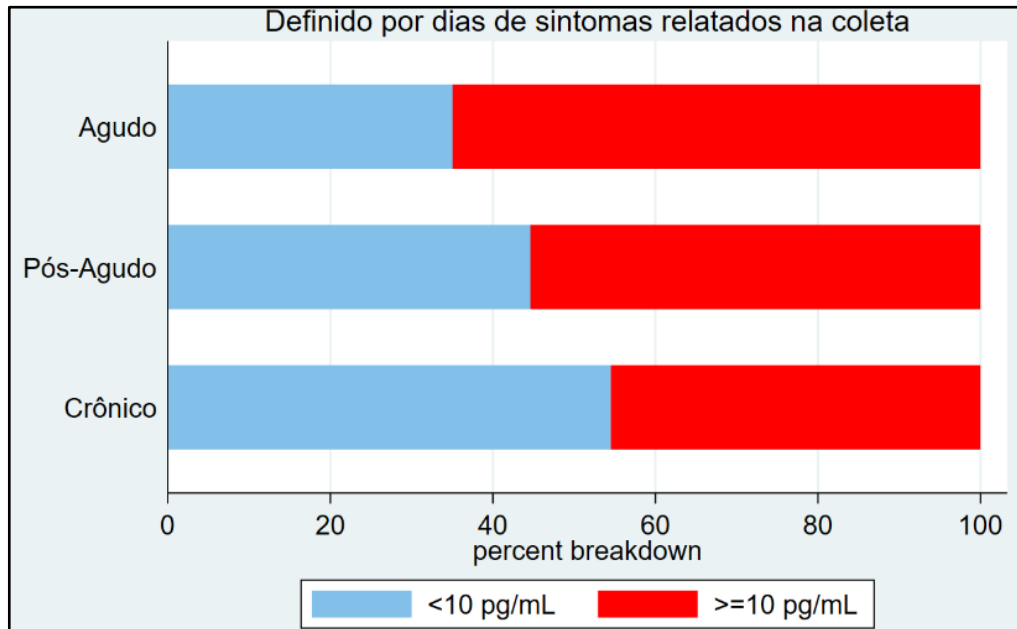
Número amostral e distribuição insuficiente para a realização de testes estatísticos.

4.2.3 IL-6

Ao comparar o comportamento desta citocina com o período/fase de progressão de CHIK (Gráfico 17), houve significância estatística associando esta citocina a fase aguda da doença (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,0147$), assim como os participantes com apenas IgM anti-CHIK reagente apresentaram concentrações mais elevadas de IL-6 quando comparado aos outros perfis sorológicos, porém não houve significância estatística (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p= 0,1598$) (Gráfico 18).

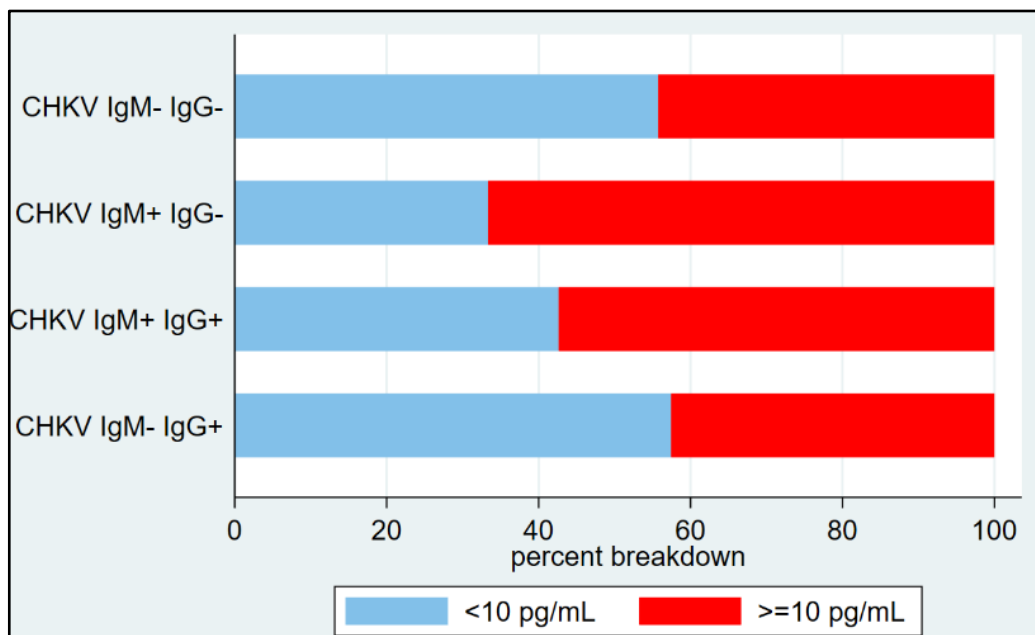
Ao relacionar as concentrações de IL-6 com o tempo de sintomas relatados foi verificado níveis séricos mais elevados nos indivíduos com, em média, menor tempo de sintomas (Teste de *Mann Whitney*, $p= 0,0006/ z= 3,453$).

Gráfico 17: Correlação das concentrações da citocina IL-6, dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste *Kruskal Wallis* em relação ao período de sintomas relatado (agudo, pós-agudo e crônico), $p=0,0147$.

Gráfico 18: Correlação das concentrações da citocina IL-6, dosada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.

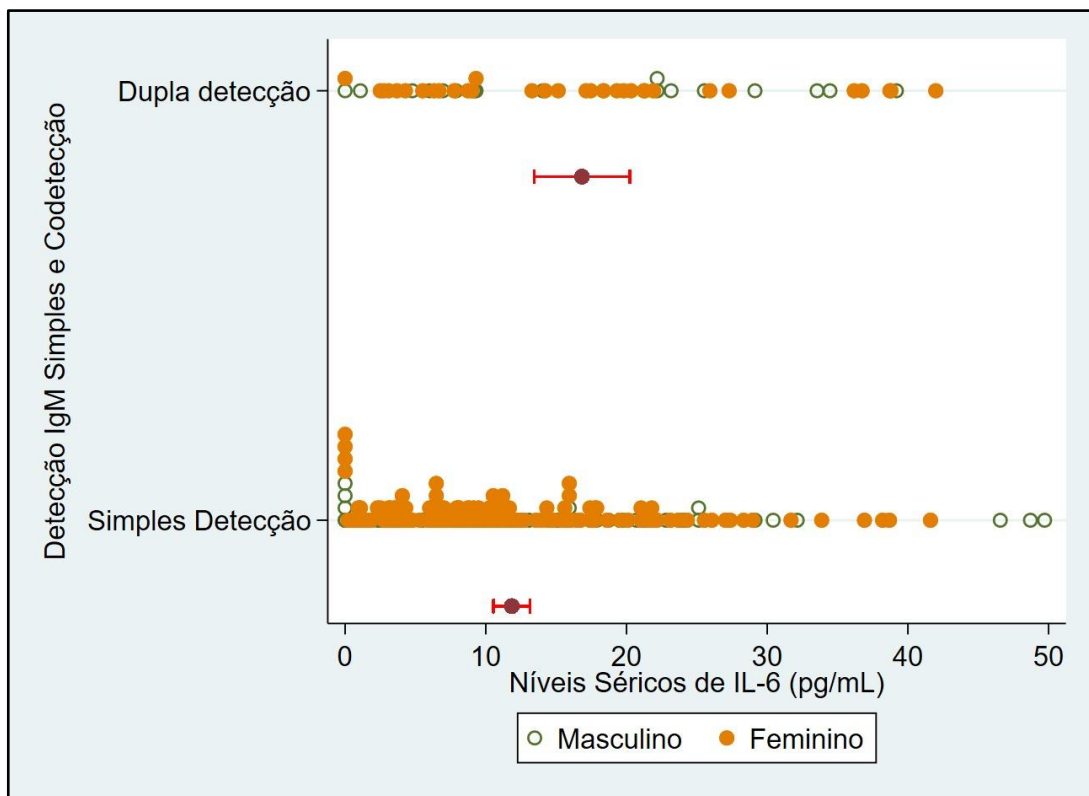


Fonte: Elaborado pela autora. (+) reagente (-) não reagente / Teste de *Kruskal - Wallis* em relação à codeteção de IgM e IgG anti- CHIK, $p=0,1598$.

Os participantes que apresentaram dupla detecção (51) de anticorpos IgM entre as arboviroses chikungunya, dengue e Zika obtiveram concentrações séricas de TNF mais elevadas que os com detecção de apenas IgM anti-CHIKV (225) (Teste de *Mann Whitney*, $p=0,0387 / z=-2,067$) (Gráfico 19).

A distribuição das concentrações séricas da citocina IL-6 ($<$ ou ≥ 10 pg/mL) nas codetecções: IgM anti-CHIKV/DENV; IgM anti-CHIKV/ZIKV; IgM anti-DENV/ZIKV e IgM anti-CHIKV/ZIKV/DENV estão representadas na Tabela 9. Observou-se uma tendência para concentrações mais elevadas de IFN- γ nas codetecções IgM anti-CHIKV / DENV, mas devido ao número amostral e distribuição insuficiente não foi possível a realização de testes estatísticos.

Gráfico 19: Correlação das concentrações da citocina IL-6 nas detecções de IgM anti-CHIKV e codetecções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*, em relação à detecção simples (CHIK) e dupla detecção de IgM entre chikungunya, dengue e Zika ($p=0,0387 / z=-2,067$).

Tabela 9: Correlação das concentrações da citocina IL-6 com as codeteccões entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.

Codeteccão IgM anti- CHIK/DENV/ZIKV	FREQUÊNCIA		TOTAL
	IL-6		
	< 10pg/mL	>= 10pg/mL	
IgM anti-CHIK ⁺ /DENV ⁺	15	30	45/54
IgM anti-CHIK ⁺ /ZIKV ⁺	2	3	5/54
IgM anti-DENV ⁺ /ZIKV ⁺	1	0	1/54
IgM anti- CHIK ⁺ /DENV ⁺ /ZIKV ⁺	1	2	3/54

Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente

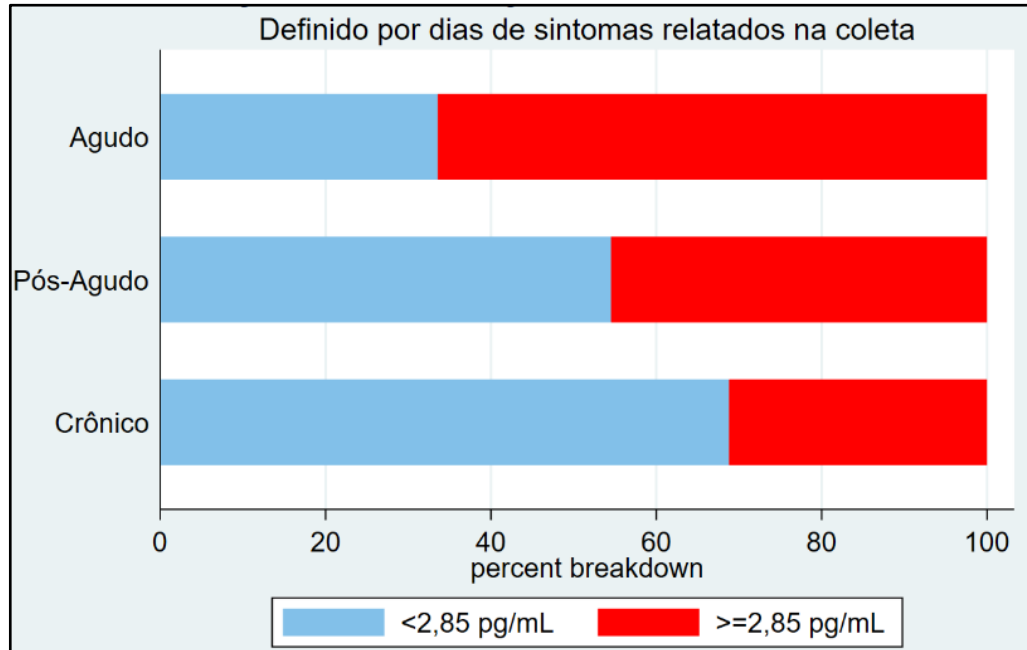
Número amostral e distribuição insuficiente para a realização de testes estatísticos.

4.2.4 IL-10

Houve significância estatística ao analisar as concentrações da citocina IL-10 com as fases de progressão de CHIK (Gráfico 20), o que leva a uma associação desta citocina a fase aguda da doença (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,0001$), assim como os participantes com apenas IgM anti-CHIK reagente apresentaram concentrações mais elevadas de IL-10 quando comparado aos outros perfis sorológicos (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p= 0,0001$) (Gráfico 21).

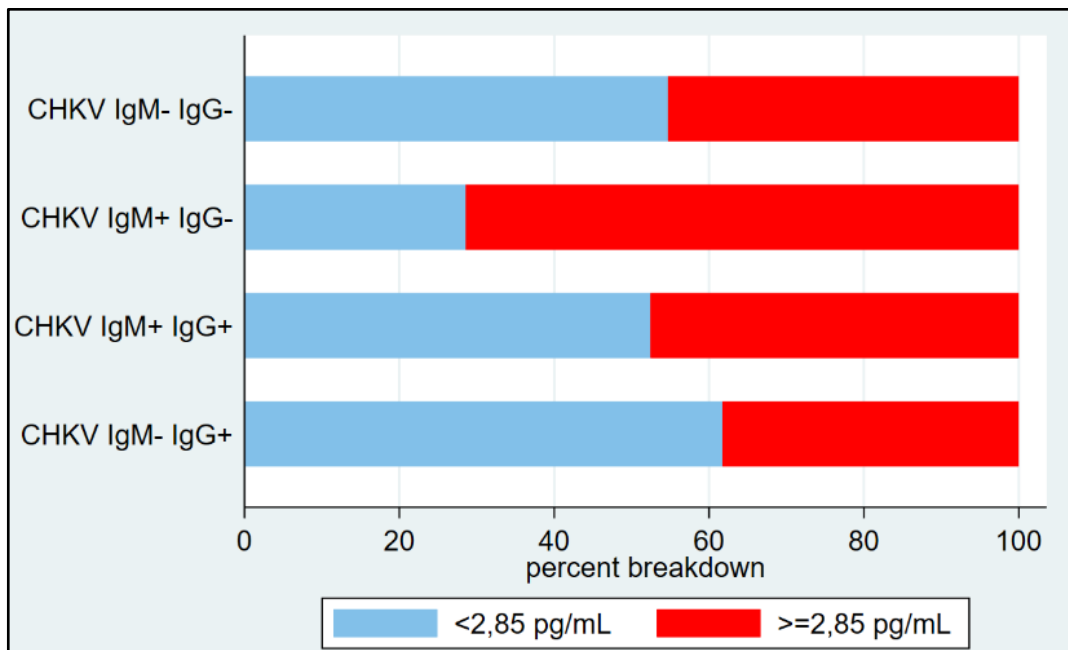
A correlação de IL-10 com tempo de sintomas mostrou níveis séricos mais elevados da citocina IL-10 nos indivíduos com, em média, menor tempo de sintomas (Teste de *Mann Whitney*, $p= 0,0001/ z= 4,576$).

Gráfico 20: Correlação das concentrações da citocina IL-10, dosada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste *Kruskal Wallis* em relação ao período de sintomas relatado (agudo, pós-agudo e crônico), $p=0,0001$.

Gráfico 21: Correlação das concentrações da citocina IL-10, dosada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.

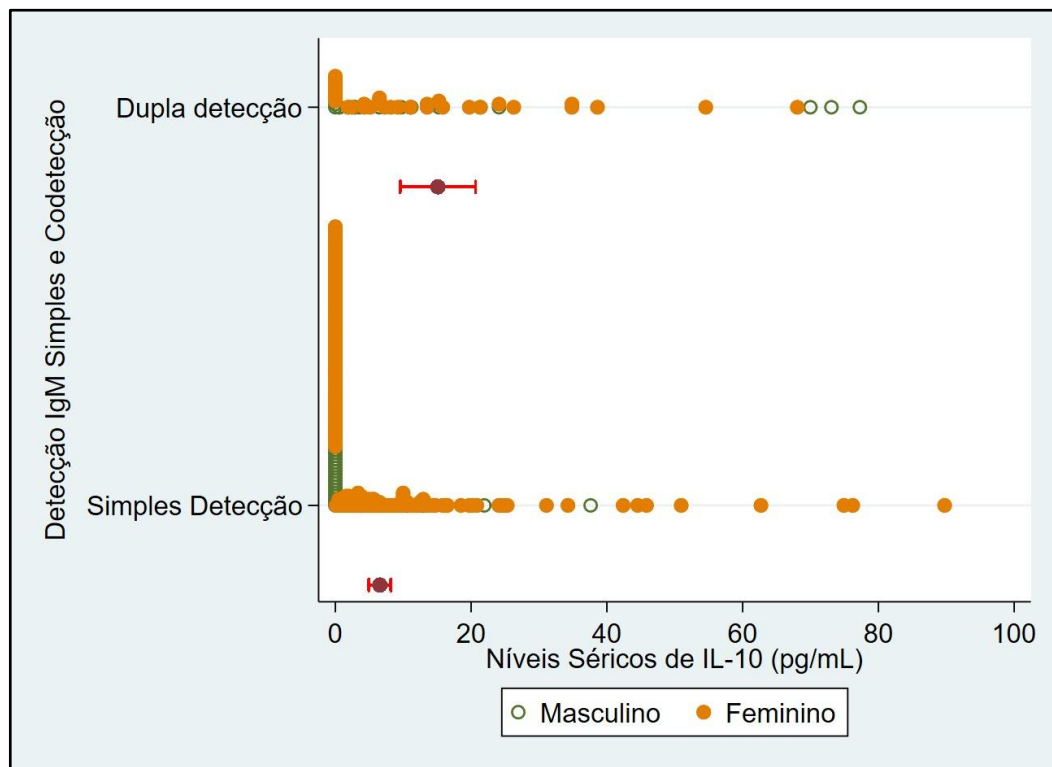


Fonte: Elaborado pela autora. (+) reagente (-) não reagente Teste de *Kruskal - Wallis* em relação à codeteção de IgM e IgG anti- CHIK, $p=0,0001$.

Os participantes que apresentaram dupla detecção (51) de anticorpos IgM entre as arboviroses chikungunya, dengue e Zika obtiveram concentrações séricas de IL-10 mais elevadas que os com detecção simples (225) (Teste de *Mann Whitney*, $p < 0,0002$ / $z = -3,667$) (Gráfico 22).

A distribuição das concentrações séricas da citocina IL-10 ($<$ ou $\geq 2,85$ pg/mL) nas codetecções: IgM anti-CHIKV/DENV; IgM anti-CHIKV/ZIKV; IgM anti-DENV/ZIKV e IgM anti-CHIKV/ZIKV/DENV estão representadas na Tabela 10. Observou-se uma tendência para concentrações mais elevadas de IFN- γ nas codetecções IgM anti-CHIKV / DENV, mas devido ao número amostral e distribuição insuficiente não foi possível a realização de testes estatísticos.

Gráfico 22: Correlação das concentrações da citocina IL-10 nas detecções IgM anti-CHIK e codetecções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 393 casos suspeitos de CHIK, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborado pela autora. Teste de *Mann Whitney*, em relação à detecção simples (CHIK) e dupla detecção de IgM entre chikungunya, dengue e Zika ($p = 0,0002$ / $z = -3,667$).

Tabela 10: Correlação das concentrações da citocina IL-10 om as codetecções entre IgM anti-CHIKV/DENV/ZIKV, em 54 participantes com positividade IgM combinada, Ceará, 2017.

Codetecção IgM anti-CHIK/DENV/ZIKV	FREQUÊNCIA IL-10		TOTAL
	< 2,85pg/mL	>= 2,85pg/mL	
IgM anti-CHIK ⁺ /DENV ⁺	15	30	45/54
IgM anti-CHIK ⁺ /ZIKV ⁺	2	3	5/54
IgM anti-DENV ⁺ /ZIKV ⁺	1	0	1/54
IgM anti-CHIK ⁺ /DENV ⁺ /ZIKV ⁺	1	2	3/54

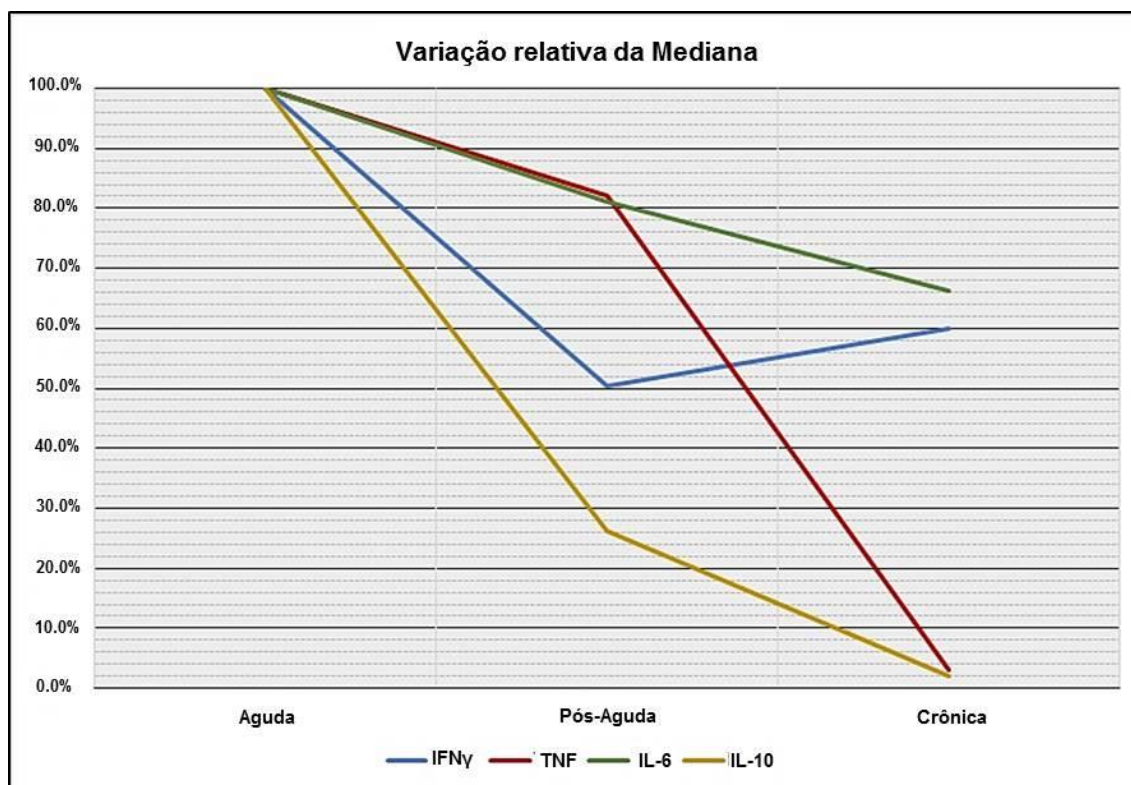
Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente

Número amostral e distribuição insuficiente para a realização de testes estatísticos.

4.3 PROPORÇÕES ENTRE AS CITOCINAS IFN- γ , TNF, IL-6 E IL-10 NOS CASOS SUSPEITOS DE CHIK

Ao comparar as fases de progressão de CHIK foi verificado que as citocinas TNF, IL-6 e IL-10 apresentaram uma diminuição em seus níveis à medida que a doença progredia, já o IFN- γ apresentou um discreto aumento na fase crônica, ou seja, cada citocina estudada apresentou trajetórias distintas em relação às fases de progressão doença (Gráfico 23). Após a quantificação dessas citocinas foram determinadas três razões: IFN- γ / IL-10; TNF / IL-10 e IL-6 / IL-10 com o intuito de avaliar a relação entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Essas razões foram correlacionadas entre os grupos: agudo, pós-agudo, crônico e entre os perfis: CHIKV IgM- IgG- ; CHIKV IgM+ IgG- ; CHIKV IgM- IgG+ e CHIKV IgM+ IgG+. Os resultados foram inseridos em categorias de acordo com a mediana das razões: IFN- γ / IL-10 (< ou >= 4,43 pg/mL), TNF / IL-10 (< ou >= 0,48 pg/mL) e IL-6 / IL-10 (< ou >= 2,87 pg/mL).

Gráfico 23: Diminuição dos níveis das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 entre as fases pós-aguda e crônica em comparação à fase aguda observados em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, Ceará, 2017.

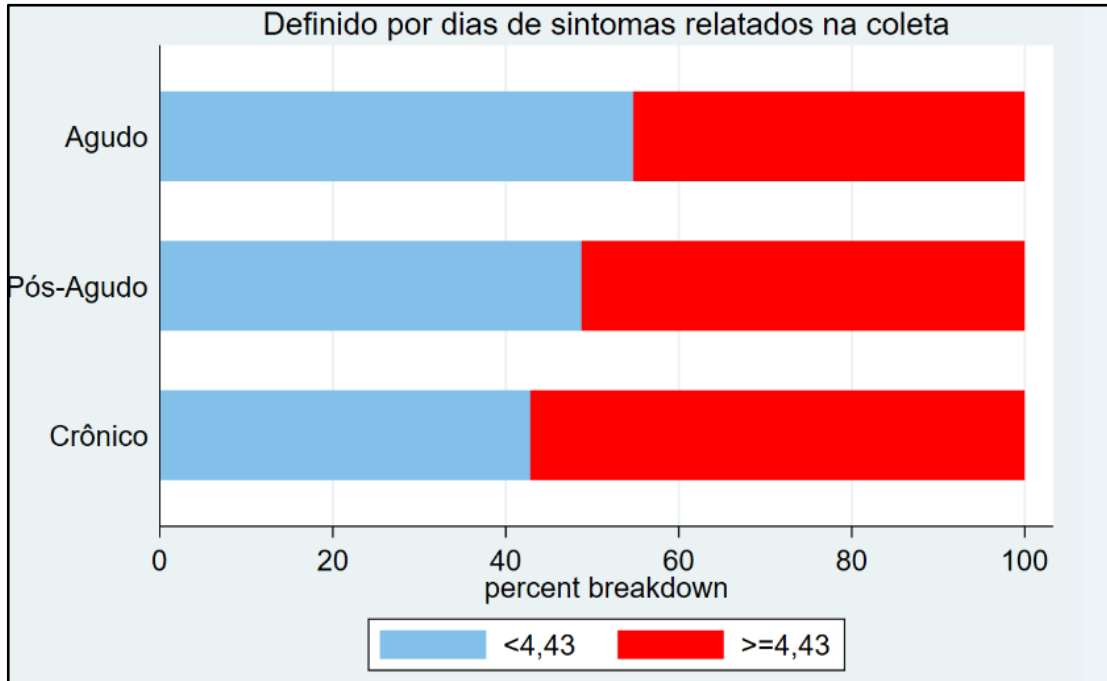


Fonte: Elaborada pela autora.

Ao comparar a proporção entre as concentrações séricas das citocinas IFN- γ e IL-10 com o período/fase de progressão de CHIK, não houve significância estatística (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,1948$), porém foi observada uma elevação na proporção IFN- γ / IL-10 à medida que ocorreu a progressão da doença (Gráficos 24). Ao relacionar os perfis sorológicos (IgM e IgG anti-CHIK) foi observado que os participantes com apenas IgG anti-CHIK reagente apresentaram concentrações mais elevadas de IFN- γ quando comparado a IL-10, porém não houve significância estatística (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,1969$) (Gráfico 25), adicionalmente, no grupo crônico (80) os indivíduos com o perfil CHIKV IgM⁻ IgG⁺ (média: 100,0; mediana: 35,3) apresentaram média e mediana das concentrações de IFN- γ bem mais elevadas que o perfil CHIKV IgM⁺ IgG⁺ (média: 38,2; mediana: 16,3), porém sem significância estatística.

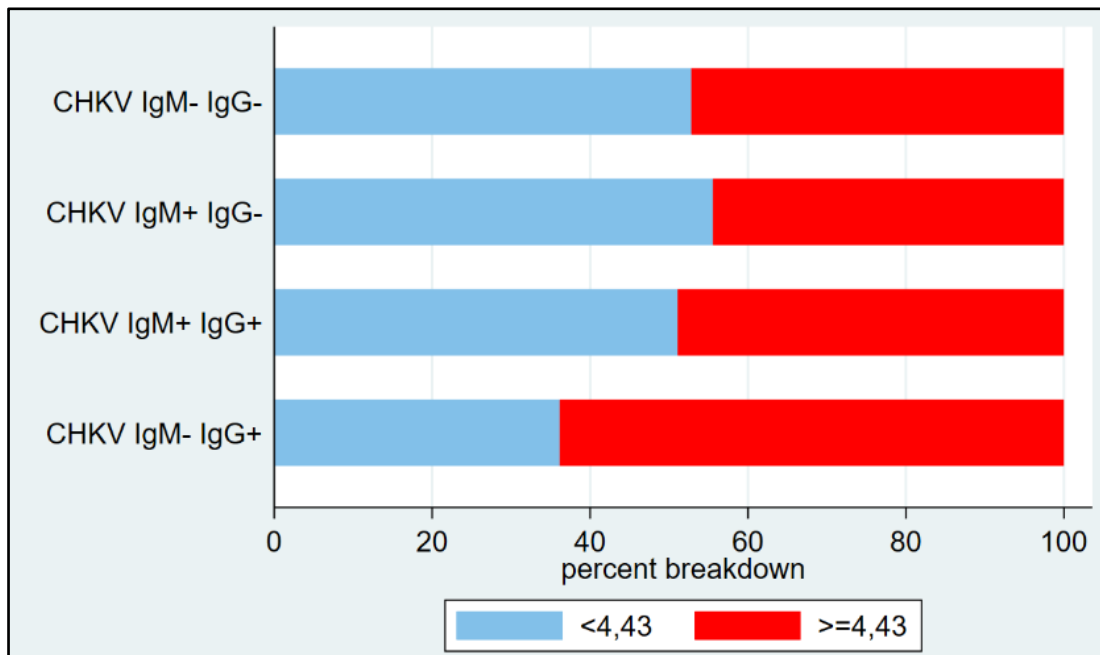
A correlação da razão IFN- γ / IL-10 com tempo de sintomas não foi estatisticamente significativa (Teste de *Mann Whitney*, $p= 0,1309$ / $z= -1,510$).

Gráfico 24: Correlação da razão IFN- γ / IL-10, calculada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.



Fonte: Elaborada pela autora. Teste *Kruskal Wallis* em relação ao período de sintomas relatado (agudo, pós-agudo e crônico), $p=0,1948$.

Gráfico 25: Correlação da razão IFN- γ / IL-10, calculada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.

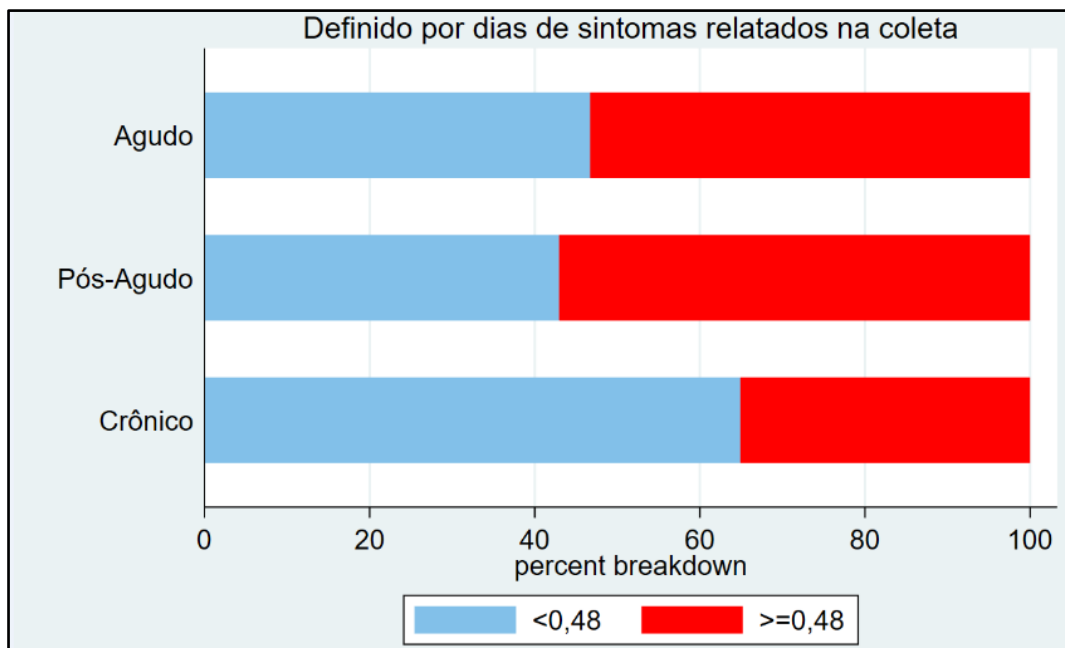


Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente (-) não reagente Teste *Kruskal Wallis* em relação ao perfil sorológico IgM e IgG anti- CHIKV, $p=0,1969$.

Ao comparar a proporção entre as concentrações séricas das citocinas TNF e IL-10 com o período/fase de progressão de CHIK (Gráficos 26), houve significância estatística (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,0002$), ou seja, foi observada uma diminuição da proporção TNF / IL-10 à medida que ocorreu a progressão da doença, assim como os participantes com IgM anti-CHIK reagente apresentaram elevação na razão TNF / IL-10 quando comparada aos outros perfis sorológicos (IgM e IgG ani-CHIK), contudo não houve significância estatística (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,0681$) (Gráfico 27).

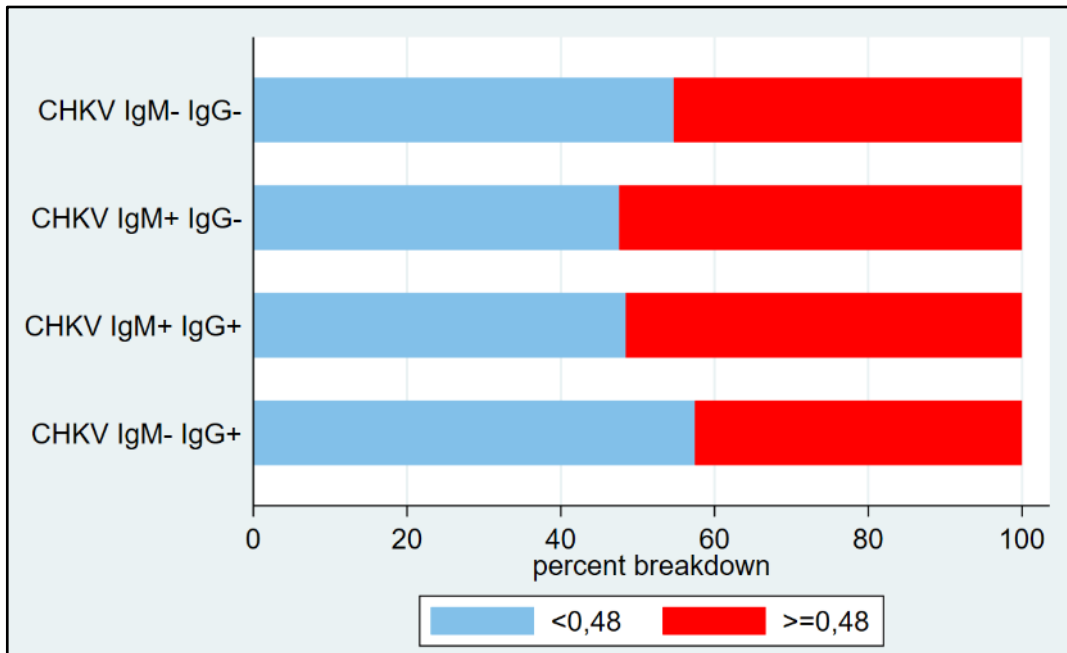
O aumento da razão TNF / IL-10 está associado com menor tempo de sintomas, ou seja tendência maior de associação do TNF com a fase aguda da doença (Teste de Mann Whitney, $p= 0,0093/ z= 2,600$).

Gráfico 26: Correlação da razão TNF / IL-10, calculada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.



Fonte: Elaborada pela autora. Teste *Kruskal Wallis* em relação ao período de sintomas relatado (agudo, pós-agudo e crônico), $p= 0,0002$.

Gráfico 27: Correlação da razão TNF / IL-10, calculada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.

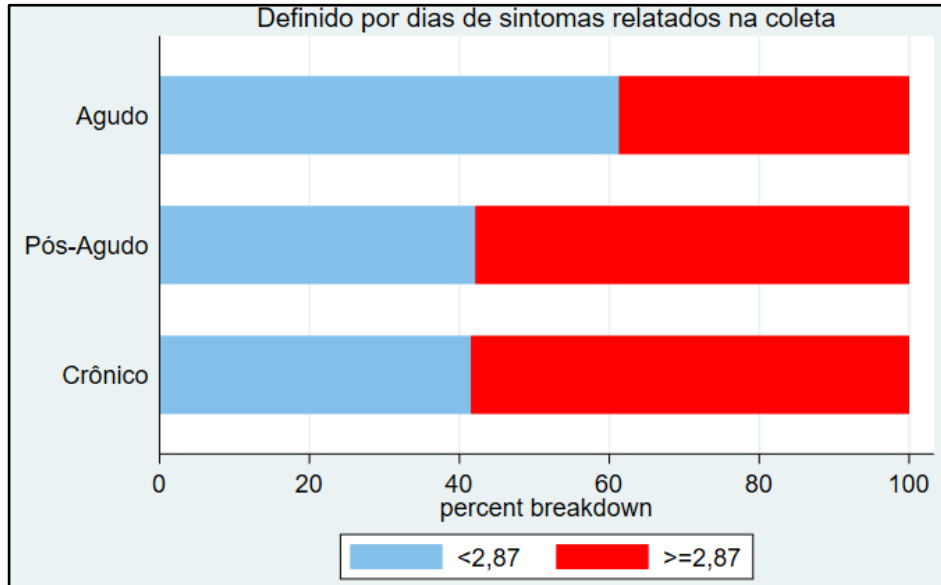


Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente (-) não reagente / Teste *Kruskal Wallis* em relação ao perfil sorológico IgM e IgG anti- CHIKV, $p= 0,0681$.

Ao comparar a proporção entre as concentrações séricas das citocinas IL-6 e IL-10 com o período/fase de progressão de CHIK (Gráficos 28), houve significância estatística (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,0054$) associando a diminuição da razão IL-6 / IL-10 a fase aguda da doença. Nas fases pós-aguda e crônica ocorreu uma elevação da razão. Os participantes com o IgM anti-CHIK reagente e IgG anti-CHIK não reagente apresentaram uma diminuição da proporção IL-6 / IL-10, sendo estatisticamente significativa (Teste de *Kruskal – Wallis*, $p= 0,0334$) (Gráfico 29).

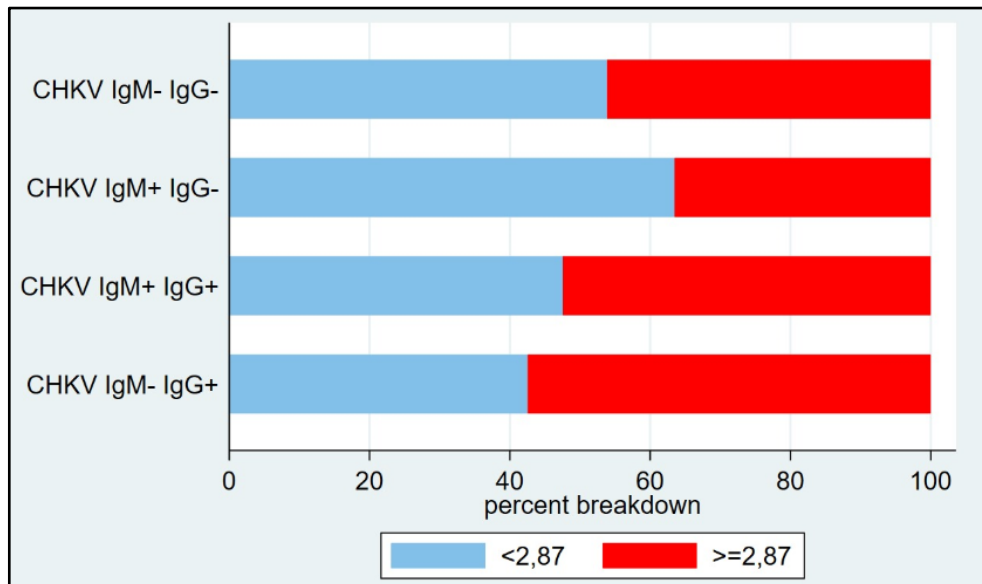
A elevação da proporção IL-6 / IL-10 está associada com maior tempo de sintomas (Teste de *Mann Whitney*, $p=0,0001/ z= -3,936$), consequentemente na fase crônica os níveis de IL-6 foram mais elevados que os da citocina IL-10.

Gráfico 28: Correlação da razão IL-6 / IL-10, calculada em 339 pacientes com diagnóstico laboratorial de CHIK, em relação às diferentes fases de progressão da doença (aguda, pós-aguda e crônica), Ceará, 2017.



Fonte: Elaborada pela autora. Teste Kruskal Wallis em relação ao período de sintomas relatado (agudo, pós-agudo e crônico), $p= 0,0054$.

Gráfico 29: Correlação da razão IL-6 / IL-10 calculada em 393 casos suspeitos de CHIK, em relação aos resultados da sorologia IgM e IgG anti-CHIKV, Ceará, 2017.



Fonte: Elaborada pela autora. (+) reagente (-) não reagente / Teste Kruskal Wallis em relação ao perfil sorológico IgM e IgG anti- CHIKV, $p= 0,0334$.

5. DISCUSSÃO

Apesar do CHIKV ter sido isolado pela primeira vez em 1952, os mecanismos patogênicos da artralgia e artrite na infecção por CHIK ainda não são bem compreendidos. O papel das citocinas na resposta imune ao CHIKV tem sido relacionado com a severidade da doença observada durante a fase aguda da infecção, ambos nos modelos humanos e não primatas. Entretanto, ainda é desconhecida se as citocinas e outros mediadores, tais como as quimiocinas, estão envolvidas na indução da artrite crônica pela infecção causada pelo CHIKV (CHOW *et al.*, 2011). Portanto, os estudos com a finalidade de compreender a resposta imune inata nas diferentes fases da infecção pelo CHIKV são pertinentes. Diante deste cenário, esta pesquisa foi conduzida com um “N” amostral relevante (393 indivíduos) quando comparado à maioria dos estudos de resposta imune na CHIK, ampliando o poder de elucidação do comportamento das biomoléculas estudadas (NG *et al.* 2009; HOARAU *et al.*, 2010; CHOW *et al.*, 2011; KELVIN *et al.*, 2011; WAUQUIER *et al.*, 2011; CHAAITHANYA *et al.*, 2011; CHIRATHAWOM *et al.*, 2013; VENUGOPALAN *et al.*, 2014; DANTAS *et al.*, 2016 e CHANG *et al.*, 2018).

O Estado do Ceará, em 2017, notificou 139.498 casos suspeitos de CHIK, destes 75,4% (105.231/139.498) foram confirmados, revelando o caráter explosivo da CHIK na epidemia do Ceará. Dos casos confirmados, 66,0% (69.321/105.231) concentram-se nas faixas etárias entre 20 e 59 anos com predomínio do sexo feminino. O perfil apresentado neste estudo corrobora com os dados notificados pela Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA-CE) que apontou um maior número de casos confirmados em adultos, predomínio de casos do sexo feminino, procedência do município de Fortaleza e alto percentual de positividade para CHIK (CEARÁ, 2017).

Sobre o predomínio de indivíduos do gênero feminino, Van Genderen *et al.*, 2016 apontaram em estudo ocorrido em Suriname, durante surto de CHIK em 2014, que a maioria (81,8%) das pessoas suspeitas da infecção foram de fato mulheres que procuraram cuidados de saúde nos serviços ambulatoriais locais. Os cuidados com a saúde estão associados à prevenção, logo os serviços de saúde costumam ser procurados mais frequentemente por mulheres pela percepção que estas possuem de seu papel no processo saúde/doença. (LEVORATO *et al.*, 2014).

Foi verificada, neste estudo, uma associação significativa entre o sexo feminino e os dias de sintomas, mostrando que as mulheres em geral apresentaram mais tempo de sintomas,

consequentemente, uma frequência maior de mulheres na fase crônica da doença. Similarmente, houve uma associação significativa entre indivíduos maiores de 45 anos e um maior tempo de sintomas. De acordo com a literatura a cronificação é significativamente maior no sexo feminino e em maiores de 45 anos (BRASIL, 2017).

Sabe-se que as mulheres, principalmente acima de 40 anos, representam o grupo etário mais acometido por doenças reumatológicas (CASTRO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2017). Thiberville *et al.*, 2013 associaram as mulheres a um alto número de articulações dolorosas no início da doença e em torno de 10 meses após o início dos sintomas, relataram também a possibilidade de suscetibilidade clínica específica relacionada ao gênero ou uma percepção diferente da doença em homens e mulheres. Desta forma, o predomínio de mulheres na fase crônica de CHIK pode estar relacionado ao fato de que a infecção pelo CHIKV pode contribuir para uma doença inflamatória reumática, ou até mesmo colaborar para o diagnóstico precoce da artrite reumatoide e artrite psoriática em pacientes suscetíveis.

Segundo o Guia de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, 2019, as formas graves de infecção por CHIKV acometem com maior frequência as seguintes faixas etárias: < 2 anos e > 65 anos. Nesse sentido, foi também encontrada, no presente estudo, uma relação significativa entre > 65 anos e o tempo de sintomas, mostrando uma maior quantidade de idosos na fase crônica da doença, podendo levar a complicações e formas graves. Pacientes de maior risco certamente necessitam de maiores cuidados e acompanhamento clínico mais rigoroso. Consequentemente, a estratificação desse grupo de indivíduos pode ser de valia para a triagem precoce e prescrição da terapia com possível prevenção de complicações clínicas e evolução mórbida da doença.

Neste trabalho foi verificado uma maior frequência de IgM anti-CHIKV reagente a partir do 3º dia do início dos sintomas, com um maior número de casos entre o período de 6 a 8 dias. Quanto à positividade IgG anti-CHIKV, houve uma concentração maior de casos entre 7 a 9 dias do início dos sintomas relatados, o que corrobora com o estabelecido na literatura e preconizado no Manejo Clínico para CHIK publicado pelo Ministério da Saúde em 2017, o qual relata que os testes sorológicos permitem a detecção de anticorpos específicos do tipo IgM, a partir do segundo dia após o aparecimento dos sintomas e do tipo IgG a partir do sexto dia (BRASIL, 2017). Salienta-se que devido à natureza deste estudo e pelo fato de se utilizar de um bioarquivo de conveniência, a grande maioria das amostras da pesquisa são referentes às amostras com início dos sintomas com 6 dias ou mais, limitando-se as conclusões em relação ao início da soropositividade IgM anti-CHIKV.

Foi encontrado 10% de indivíduos que apresentaram sorologia IgM anti-CHIK não reagente e IgG anti-CHIK reagente, apesar de estarem com até 14 dias do início de sintomas. Estes pacientes provavelmente já podem ter se infectado anteriormente por CHIK e devido à sintomatologia recorrente deste arbovírus procuraram o serviço de saúde novamente, informando equivocadamente a data da recorrência dos sintomas. Não se pode também descartar a possibilidade do critério subjetivo da data do início dos sintomas informada pelo paciente.

Foi verificado neste estudo uma positividade de IgM anti-CHIKV em pacientes com mais de 90 dias de sintomas (48/85). Evidências clínicas da persistência de uma resposta IgM específica meses após o início da infecção pode estar associada a persistência no organismo do CHIKV ou de seus antígenos, e a consequente artrite erosiva e cronificação dos sintomas articulares (MALVY *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2016). Petitdemange *et al.*, 2015 relataram que a permanência da IgM por meses após a infecção inicial foi observada em pacientes com várias outras infecções por alfavírus, podendo estar relacionada à persistência viral por mecanismos pouco compreendidos.

Foram encontradas 54 codeteções entre CHIKV, DENV e ZIKV. Os casos com sorologia IgM reagente para DENV e para ZIKV podem ser interpretados como infecção recente por dengue e/ou Zika, reação cruzada ou coinfeção (BRASIL, 2019b). Vale salientar que esses achados não permitem afirmar se os casos são de infecção recente ou de coinfeção, pois não foram realizados os testes moleculares. Contudo, as coinfeções não são eventos raros durante períodos de transmissão arboviral intensa e em áreas de cocirculação do CHIKV, ZIKV e DENV. CASTRO *et al.*, 2016 encontraram reatividade para IgM anti-DENV e anti-ZIKV em nove de 30 pacientes para IgM anti-DENV e anti-ZIKV, mas sem amplificação de RNA de DENV por RT-PCR. Portanto, provavelmente ocorreu reatividade cruzada entre anticorpos IgM anti-DENV e anti-ZIKV, o que condiz com a literatura sobre a possível reatividade cruzada entre DENV e ZIKV e outros flavivírus quando os métodos imunológicos são usados para a detecção de IgM (LANCIOTTI *et al.*, 2008; DUFFY *et al.*, 2009). A ocorrência de falsa reatividade para dengue em indivíduos com infecção por ZIKV, principalmente em grupos que estão em risco da doença, como mulheres grávidas, pode ser preocupante, devido a provável relação causal com microcefalia, mostrando a importância do diagnóstico diferencial preciso (CASTRO *et al.*, 2016). Contudo, neste estudo foi encontrado uma baixa frequência (1/54) de codeteções sorologia IgM anti-DENV e anti-ZIKV, a frequência maior foi entre IgM anti-CHIK e anti-DENV (45/54). Como no Ceará existe a circulação do DENV há muitos anos, possui vetor competente e população suscetível, talvez,

com a introdução do CHIKV casos de coinfeção tenham ocorrido em 2017. No entanto, não é possível afirmar com os dados desse estudo que realmente houve coinfeção, pois não foi realizada a pesquisa dos vírus. Outra hipótese é o indivíduo ter se infectado primeiramente por um desses arbovírus e posteriormente pelo outro, ou seja, infecção subsequente. Adicionalmente, não pode ser descartada a possibilidade de reação cruzada, mesmo sendo entre flavivírus e alfavírus, por possuírem alguma homologia genética.

Em relação à detecção de anticorpos IgG, Vasconcelos *et al.*, 1998 observaram uma prevalência de 44% IgG anti-DENV. Desde o ano de 1986 o estado do Ceará tem vivido com episódios de epidemias, estando há mais de 30 anos com a circulação do DENV, onde os 4 sorotipos (DENV1- a partir de 1986, DENV2- a partir de 1994, DENV3- a partir de 2002 e DENV4- a partir de 2011) já circularam dentro do estado. Durante este período o Ceará confirmou quase um milhão de casos de dengue e registrou pelo menos 14 epidemias (CAVALCANTI *et al.*, 2017; BRASIL, 2019a). A faixa etária deste estudo foi predominantemente de adultos, indicando um maior período de exposição do indivíduo ao vetor, logo a possibilidade de infecção pelo DENV aumenta; o que explica os achados deste estudo, onde foi encontrado, um total de 91,3% (357/391) de IgG anti-DENV reagente.

Matheus *et al.*, 2019 revelaram em um estudo a especificidade de 79% do ensaio de IgG anti-Zika Euroimmun o que indica especificidade sub-ótima, que é uma preocupação para diagnóstico sorológico da infecção pelo ZIKV, achados que podem elucidar o que foi encontrado no presente estudo onde quase a totalidade (97,3%) dos pacientes que apresentaram IgG anti-ZIKV reagente foram reagente também para IgG anti-DENV. Esse alto percentual de codetecção IgG anti-ZIKV/DENV pode ser devido ao alto grau de semelhança estrutural e sequencial entre esses flavivírus justificando a presença de anticorpos de reatividade cruzada em indivíduos que já tiveram dengue (PRIYAMVADA *et al.* 2016).

As citocinas são proteínas ou glicoproteínas produzidas pelas células, atuando na superfície dos receptores celulares mediando à comunicação celular (DINARELLO, 2007). Essas proteínas regulam tanto o início quanto a manutenção e equilíbrio das respostas imunológicas contra patógenos, além de selecionar o tipo de resposta imune de acordo com o perfil da infecção (ABBAS *et al.*, 2012). Neste estudo, as concentrações de IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 foram quantificadas a fim de verificar seu comportamento quando testadas entre os grupos (de acordo com os dias de sintomas): agudo, pós-agudo e crônico de pacientes com diagnóstico laboratorial de chikungunya.

Ao relacionar os dias de sintomas com as dosagens de IFN- γ foi verificada uma significância estatística ($p < 0,005$), mostrando que os participantes com concentrações maiores

dessa citocina tinham em média menos tempo de sintomas. De acordo com Verteeg *et al.*, 2016, o IFN- γ é uma das principais citocinas produzidas durante a infecção inicial pelo CHIKV, a partir de células T CD4+ específicas. Por outro lado, é possível que o aumento nos níveis de expressão do IFN- γ possam estar envolvidos na transição precoce da classe de imunoglobulina IgM para IgG específicos, observada na infecção pelo CHIKV. Do mesmo modo, é provável que o aumento nos níveis de IFN- γ poderia estar contribuindo para a ativação de uma resposta imune mais específica precocemente (VENUGOPALAN *et al.*, 2014). Ao comparar as concentrações de IFN- γ entre os grupos agudo, pós-agudo e crônico, em pacientes com diagnóstico laboratorial de chikungunya, levando em consideração as diferentes fases de progressão da doença foi observada significância estatística ($p < 0,005$) com a fase aguda, o que corrobora com os estudos de Hoarau *et al.*, 2010, Wauquier *et al.*, 2011 e Venugopalan *et al.*, 2014.

As células NK aparecem no início da doença para controlar a infecção por CHIK, produzindo ou liberando IFN- γ , o que pode explicar o seu aumento na fase aguda da doença (CHOW *et al.*, 2011). O IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, já a IL-4 e a IL-10 regulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada. O balanço entre essas duas respostas tem papel relevante na imunidade e na patogênese de muitas doenças infecciosas (MILLS; MCGUIRK, 2004). As células NK parecem ser benéficas na fase aguda da infecção pelo CHIKV. No entanto, posteriormente, as células NK poderiam contribuir para mecanismos imunopatológicos, infiltrando tecidos sinoviais e mantendo um ambiente inflamatório que poderia contribuir para o desenvolvimento de artralgia (PETITDEMANGE *et al.*, 2015).

O TNF é uma citocina multifuncional que tem efeitos na inflamação, sendo um importante mediador de apoptose (WILEY; SCHOOLEY *et al.*, 1995). O principal efeito fisiológico do TNF é promover a resposta imune e a inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (ABBAS *et al.*, 2012). Os achados desse estudo mostraram significância estatística da citocina TNF com a fase aguda da doença, adicionalmente, ao relacionar os dias de sintomas com as dosagens de TNF foi verificada uma significância estatística ($p < 0,005$) mostrando que os participantes com concentrações maiores desta citocina tinham em média menos tempo de sintomas. Estes resultados diferem dos achados de Ng *et al.* 2009, Wauquier *et al.*, 2011, Chaithania *et al.* 2011 e Venugopalan *et al.* 2014, pois não apresentaram associação significativa dessa citocina com a fase aguda de CHIK; Kelvin *et al.* 2011 e Chang *et al.* 2018 acharam uma correlação negativa de TNF com a fase aguda da doença.

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que possui função anti e pró-inflamatória e é o maior mediador da febre e das reações da fase aguda de infecções, sendo produzida durante as respostas imune inata e adaptativa por linfócitos T e B, macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais ativadas e células dendríticas (DCs) (MARTINA; KORAKA; OSTERHAUS, 2009).

Neste estudo, foi observada uma associação significativa ($p= 0,0147$) da citocina IL-6 com a fase aguda da doença, ao comparar as concentrações séricas em pacientes com diagnóstico laboratorial de chikungunya que estavam nas fases aguda, pós-aguda e crônica. Ao relacionar os dias de sintomas com as dosagens de IL-6 foi verificada uma significância estatística ($p= 0,0006$), logo os participantes com concentrações maiores desta citocina tinham em média menos tempo de sintomas. Os achados de Ng *et al.* 2009, Chow *et al.*, 2011, Wauquier *et al.*, 2011, Chirathawom *et al.*, 2013 e Chang *et al.*, 2018 mostraram significância de IL-6 na fase aguda da doença. Porém, outros estudos relatam a falta de significância estatística da citocina IL-6 durante a fase aguda da infecção pelo CHIKV (KELVIN *et al.*, 2011; CHAAITHANYA *et al.*, 2011 e VENUGOPALAN *et al.*, 2014). Na fase crônica, tem sido relatada a elevação dos níveis de IL-6 produzido por fibroblastos infectados, o que resulta em aumento da produção de prostaglandina que, por sua vez, favorece a inflamação, resultando nas manifestações clínicas de artrite, devido à destruição tecidual nas articulações (NG *et al.*, 2009; HOARAU *et al.*, 2010; CHOW *et al.*, 2011; MALFAIT; SCHNITZER, 2013;).

A IL-10 é produzida pelas células Th2, logo exibe propriedades anti-inflamatórias, incluindo a inibição da secreção de mediadores imunes, a apresentação de antígenos e estímulo à fagocitose (DUELL; TAN *et al.*, 2012). Nesta pesquisa, os níveis séricos de IL-10 foram maiores, estatisticamente significante, na fase aguda de CHIK quando comparado às outras fases de progressão, o que pode ser devido ao efeito supressor dessa citocina na geração de respostas Th1, corroborando com os estudos anteriores de Ng *et al.* 2009, Chaaithanya *et al.* 2011 e Chang *et al.* 2018 que também mostraram significância estatística da IL-10 com a fase aguda da doença. Já os achados de Hoarau *et al.* 2010, Wauquier *et al.* 2011 e Venugopalan *et al.* 2014 não associaram a IL-10 a fase aguda. Ao relacionar os dias de sintomas com os níveis de IL-10 foi verificada significância estatística ($p<0,005$), onde os participantes com concentrações maiores dessa citocina tinham em média menos tempo de sintomas.

Contudo, os resultados relacionados às citocinas em pacientes com infecção pelo CHIKV são às vezes contraditórios. Discrepâncias entre os estudos de alguns marcadores

podem refletir diferentes origens genéticas, bem como diferenças nas técnicas de laboratório (PETITDEMANGE *et al.*, 2015). Além de existir uma variação dos níveis de citocinas relacionada com o momento da doença e muitas das proteínas reguladas positivamente apresentam um padrão de expressão dinâmica com níveis mudando ao longo do tempo (WAUQUIER *et al.*, 2011).

Com o intuito de avaliar a relação entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias nas fases de progressão da doença, foi realizado o cálculo das razões entre IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10. O equilíbrio entre essas duas respostas tem papel importante na imunidade e na patogênese de muitas doenças infecciosas. Logo, foi encontrada uma elevação das razões: IFN- γ / IL-10 e IL-6 / IL-10 na fase crônica da CHIK quando comparada a fase aguda, assim como nos indivíduos que apresentaram apenas anticorpos IgG para CHIK. A elevação da proporção IL-6 / IL-10 apresentou uma associação significativa com maior tempo de sintomas, consequentemente na fase crônica os níveis de IL-6 foram mais elevados que os da citocina IL-10. Ao analisar o grupo que estava na fase crônica da CHIK os indivíduos com o perfil CHIKV IgM⁻ IgG⁺ apresentaram média e mediana das concentrações de IFN- γ bem mais elevadas que o perfil CHIKV IgM⁺ IgG⁺, porém sem significância estatística. Estes achados podem sugerir uma forte resposta inflamatória na fase crônica da doença. A resposta das citocinas inflamatórias é essencial para promover a ativação das células imunes desempenhando um papel crucial no controle da infecção, porém pode também contribuir para a disseminação do vírus e imunopatologia (PETITDEMANGE *et al.*, 2015). Já a razão TNF / IL-10 apresentou uma diminuição na fase crônica, e uma elevação nos pacientes que apresentaram apenas IgM anti-CHIK reagente, consequentemente TNF apresentou uma associação apenas com a fase aguda da doença.

No presente estudo os indivíduos com detecção dupla de IgM entre as arboviroses dengue, chikungunya e Zika apresentaram níveis mais elevados das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 que os que apresentaram detecção de apenas CHIK. (RESTREPO *et al.*, 2008). No entanto, o papel dessas citocinas em indivíduos coinfectados ainda é pouco conhecido.

Por ser um estudo baseado em amostras de conveniência, este trabalho apresentou algumas limitações, uma delas relacionada à distância do tempo da coleta das amostras (2017) e a realização das dosagens de citocinas (2019). Contudo, as amostras selecionadas para este estudo foram bem documentadas e acondicionadas durante este período e constituem valioso acervo científico para estudos retrospectivos, e que se refere à primeira grande epidemia já registrada de chikungunya no Ceará onde a grande maioria da população era imunologicamente *naïve* para CHIKV. O fato de não existir um grupo controle com

indivíduos saudáveis (2017), para uma comparação com as concentrações das citocinas estudadas, como também a falta de cobertura de informações sobre a sintomatologia e comorbidades no momento da coleta para se associar aos dados com as citocinas, pode ser citado como outros aspectos limitantes do estudo.

Devido à natureza deste trabalho, não foi possível realizar seguimento destes pacientes, desta forma, futuras iniciativas deverão focar no estabelecimento de estudos de coorte prospectivos com aquisição de dados primários, avaliação de desfechos clínicos e obtenção de amostras seriais para análises longitudinais que possam gerar novas evidências e hipóteses.

6. CONCLUSÃO

- O perfil epidemiológico desse estudo foi caracterizado com predomínio de casos provenientes do município de Fortaleza, do sexo feminino e da faixa etária de 40 a 59,9 anos;
- As sorologias IgM e IgG anti-CHIKV foram reagentes a partir do 3º dia do início dos sintomas; com uma maior concentração de casos entre 6 a 8 dias para IgM e entre 7 e 9 para IgG;
- Houve persistência de detecção IgM anti-CHIKV em pacientes com mais de 90 dias de sintomas (61,2%);
- Os participantes do sexo feminino e com idade acima de 45 anos apresentaram um tempo significativamente maior de sintomas da doença, fatores contributivos para a cronificação da CHIK;
- As codetecções encontradas corresponderam a quase totalidade (83,3%) de IgM anti-CHIKV com IgM anti-DENV;
- Na fase aguda da CHIK houve elevação significativa das citocinas: IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10, assim como nos indivíduos com sorologia reagente para IgM e não-reagente para IgG anti-CHIKV;
- Na fase pós-aguda os níveis de IFN- γ diminuíram, contrastando com o aumento do mesmo na fase crônica;
- Na fase crônica da CHIK os níveis séricos de TNF e IL-10 diminuíram acentuadamente quando comparados às fases aguda e pós-aguda;
- O grupo de indivíduos na fase crônica com sorologia IgM anti-CHIK não reagente e IgG anti-CHIK reagente apresentou concentrações séricas de IFN- γ mais elevadas que o grupo dos indivíduos com anticorpos IgM e IgG reagentes;
- Os casos de dupla detecção IgM (chikungunya, dengue e Zika) apresentaram níveis estatisticamente mais elevados das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 que os com detecção simples.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esses achados auxiliam a compreensão dos mecanismos de resposta imune da infecção por CHIK, sendo relevantes para um melhor conhecimento da imunopatologia da doença, na identificação de perfis seletivos de citocinas nas fases da infecção pelo CHIKV e subsídios para estudos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Técnicas de laboratório comumente utilizadas em imunologia. In. Imunologia celular e molecular. 7º ed. Saunders: Elsevier, 2012, p. 513-525.
- AZEVEDO RDO, S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. Chikungunya risk for Brazil. *Rev Saude Publica*, v. 49, p. 58, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Chikungunya: Manejo Clínico – 2 edição. Brasília. 2017.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Volume 49 N° 1 – 2018 ISSN 2358-9450.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 12 de 2019 e Levantamento Rápido de Índices para Aedes aegypti (LIRAA). Volume 50 | N° 13 | Abr. 2019a Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde ISSN 9352-7864.
- BRASIL Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde Volume único 3 edição Brasília - DF – 2019b ISBN 978-85-334-2706-8.
- BURT, F. J. *et al.* Chikungunya: A re-emerging virus. *The Lancet*, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012.
- BURT, F. J. *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis*, v. 17, n. 4, p. e107-e117, Apr 2017. ISSN 1474-4457. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28159534>>.
- CABRAL-CASTRO, MAURO JORGE *et al.* Molecular and serological techniques to detect cocirculation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. *Journal of Clinical Virology*, v. 82, p. 108-111, 2016.
- CASTRO AP, LIMA RA, NASCIMENTO JS. Chikungunya: vision of the pain clinician. *Rev Dor*. 2016;17(4):299-302.
- CAVALCANTI, Luciano Pamplona de Góes *et al.* Trinta anos de dengue no Ceará: história, contribuições para ciência e desafios no cenário atual com tripla circulação de arbovírus. *Journal of Health & Biological Sciences*, v. 6, n. 1, p. 65-82, 2017.
- CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico SE 36. 2016; 1-6.
- _____, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico SE 39. 2017; 1-13.
- _____, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico SE 52 de 2018. 18 de janeiro de 2019a; 1-17.
- _____, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico SE 12. 29 de março de 2019b; 1-14.

_____, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico SE 43. 13 de dezembro de 2019c; 1-15.

CHAAITHANYA IK, Muruganandam N, Raghuraj U, Sugunan AP, Rajesh R, Anwesh M *et al* (2014) Chronic inflammatory arthritis with persisting bony erosions in patients following chikungunya infection. *Indian J Med Res* 140:142–145.

CHANG AY, ENCINALES L, PORRAS A, *et al.* Frequency of chronic joint pain following Chikungunya virus infection: a Colombian cohort study. *Arthritis Rheumatol* 2018;70:578–584.

CHEVILLON, Christine *et al.* The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends in Microbiology*, v. 16, n. 2, p. 80-88, 2008.

CHEN, K. C. *et al.* Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. *Virology Journal*, v. 10, p. 1, 2013.

CHIRATHAWORN, C. *et al.* Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 6, n. 8, p. 631–634, 2013.

CHOPRA A, Saluja M, Venugopalan A (2014) Effectiveness of chloroquine and inflammatory cytokine response in patients with early persistent musculoskeletal pain and arthritis following chikungunya virus infection. *Arthritis Rheumatol* 66:319–326.

CHOW, A. *et al.* Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

COUDERC, Thérèse *et al.* Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 200, n. 4, p. 516-523, 2009.

DINARELLO, C. A. Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*, v. 37, n. S1, p. S34-S45, 2007.

DUELL, B. L.; TAN, C. K.; CAREY, A. J. *et al.* Recent insights into microbial triggers interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 64, n. 3, p. 295-313, 2012.

DUFFY MR, Chen T, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* 360 (2009) 2536–2543.

DUPUIS-MAGUIRAGA, Laurence *et al.* Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.

EKSTROM M, Liljeström P, Garoff H. Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *The EMBO Journal*. 1994;13(5):1058-64.

FENNER, Frank *et al.* Family and generic names for viruses approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses, June 1974. *Intervirology*, v. 3, n. 3, p. 193-198, 1974.

FOX, J. M ; DIAMOND, M. S. Immune-mediated protection and pathogenesis of chikungunya virus. *HHS Public Access*. v. 21, n. 2, p. 129–139, 2017.

FRAGKLOUDIS, R. *et al.* The type I interferon system protects mice from Semliki Forest virus by preventing widespread virus dissemination in extraneural tissues, but does not mediate the restricted replication of avirulent virus in central nervous system neurons. *Journal of General Virology*, v. 88, n. 12, p. 3373–3384, 2007.

GERARDIN P, BARAU G, MICHAULT A, BINTNER M, RANDRIANAIVO H, CHOKER G, *et al.* Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med* 2008; 5:e60.

GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *The open rheumatology journal*, v. 10, p. 129–140, 2016.

GUBLER, Duane J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

HENNESSEY M, Fischer M and Staples JE (2016) Zika virus spreads to new areas—region of the Americas, May 2015–January. *Morbidity and Mortality Weekly Rep*; 65 (3): 55–58.

HOARAU, Jean-Jacques *et al.* Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.

HONÓRIO NA, CASTRO MG, BARROS FSM, MAGALHÃES MAFM, Sabroza PC. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saúde Pública* 2009; 25:1203-14.

HONÓRIO NA, CÂMARA DCP, CALVET GA, Brasil P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 31(5): 906-908, mai, 2015.

HORCADA, M. Loreto *et al.* Fiebre Chikungunya. Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa. *Reumatología Clínica*, v. 11, n. 3, p. 161-164, 2015.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses, *Virology*, New York, v. 344, p. 119-130, 2005.

IOOS S, Mallet HP, Leparç Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2014;44(7):302-7.

KELVIN, A. A. *et al.* Inflammatory cytokine expression is associated with Chikungunya virus resolution and symptom severity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 8, 2011.

KIELIAN, Margaret; REY, Félix A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 67-76, 2006.

KUEK A, Hazleman BL, Gatson JH, Oostor AJK (2006) Chikungunya outbreak—remember the arthropathy. *Rheumatology* 45:1449–1450.

KULARATNE SA, Weerasinghe SC, Gihan C, Wickramasinghe S, Dharmarathne S, Abeyrathna A *et al* (2012) Epidemiology, clinical manifestations, and long-term outcomes of a major outbreak of chikungunya in a hamlet in Sri Lanka, in 2007: a longitudinal cohort study. *J Trop Med* 2012:1–7.

LABADIE, Karine *et al*. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 3, p. 894-906, 2010.

LANCIOTTI RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, *et al.*, Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007, *Emerg. Infect. Dis.* 14 (8) (2008) 1232–1239.

LEVORATO, Cleice Daiana *et al*. Fatores associados à procura por serviços de saúde numa perspectiva relacional de gênero. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, v. 19, n. 4, 2014.

LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 50, n. 36, p. 1-7, 2016.

LUM F-M, Ng LFP. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Research*. 2015;120:165-74.

MALVY D, Ezzedine K, Mamani-Matsuda M, Autran B, Tolou H, Receveur M-C, *et al*. Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. *BMC Infect Dis.* 2009;9:200.

MANIMUNDA SP, Vijayachari P, Uppoor R, Sugunan AP, Singh SS, Rai SK *et al* (2010) Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104:392–399.

MARQUES CDL, CAVALCANTI N, LUNA M, Toche P, ANDRADE C, DANTAS A, *et al*. Chikungunya fever outbreak in Brazil: preliminary assessment in a cohort of patients with rheumatological manifestations. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68 Suppl 10.

MARTINA BE, KORAKA P, OSTERHAUS AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):564-81

MATHEUS S, Talla C, Labeau B, Laval F, Briolant S, Berthelot L, Vray M, Dominique Rousset *et al*. Performance of 2 Commercial Serologic Tests for Diagnosing Zika Virus Infection *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 25, No. 6, June 2019 p. 1153-1169.

MALFAIT, A. M.; SCHNITZER, T. J. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 2013.

MEDLOCK, Jolyon M; LEACH, Steve A. Effect of climate change on vector-borne disease risk in the UK. *The Lancet Infectious Diseases*, 2015.

MILLS, K. H.; MCGUIRK, P. Antigen-specific regulatory T cells—their induction and role in infection. *Seminars in immunology*, 2004. Elsevier. p.107-117.

MOTA, M. T. *et al.* Mosquito-transmitted viruses - the great Brazilian challenge. *Braz J Microbiol*, v. 47 Suppl 1, p. 38-50, Dec 2016. ISSN 1678-4405. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27818091>. Acesso em: 25 nov. 2019.

MUSSO, Didier *et al.* Detection of chikungunya virus in saliva and urine. *Virology Journal*, v. 13, n. 1, p. 102, 2016.

NG, L. F. P. *et al.* IL-1 β , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PLoS ONE*, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2009.

NORET, M. *et al.* Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts. *Journal of Infectious Diseases*, 2012.

NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, p. 102, 2015.

PATTERSON J, SAMMON M, GARG M. Dengue, Zika e Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med*. 2016; 17(6): 671-9.

PEREIRA MS, LUZ DCM, RAMOS JMN, KHOURI PBS, VIANA NETO RE, SOUZA CMF, *et al.* Avaliação do perfil sociodemográfico, clínico, laboratorial e terapêutico dos pacientes com artrite reumatoide em um ambulatório-escola de Tersina, Piauí. *Arch Health Invest*. 2017;6(3):125-8.

PETITDEMANGE C, Wauquier N, Vieillard V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015; 135(4):846-55.

PHUKLIA, W. *et al.* Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in

CHIKV-induced arthralgia/arthritis. *Virus Research*, v. 177, n. 2, p. 179–188, 2013.

PIALOUX, Gilles *et al.* Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 7, n. 5, p. 319-327, 2007.

POO, Y. S. *et al.* Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, n. 12, p. e3354, Dec 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25474568>>.

PRAT, C. M. *et al.* Commercially Available Serologic Diagnostic Tests for Chikungunya Virus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 20, n. 12, p. 2012–2015, 2014.

QUEYRIAUX, B. *et al.* Clinical burden of chikungunya virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 8, n. 1, p. 2–3, 2008.

RAVIDRAN V, Alias G. Efficacy of combination DMARD therapy vs. hydroxychloroquine monotherapy in chronic persistent chikungunya arthritis: a 24-week randomized controlled open label study. 2016. Clin Rheumatol DOI 10.1007/s10067-016-3429-0.

REZZA G, Weaver SC. Chikungunya as a paradigm for emerging viral diseases: Evaluating disease impact and hurdles to vaccine development. 2019 PLoS Negl Trop Dis 13(1): e0006919. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006919>.

RUST RS. Human arboviral encephalitis. Semin Pediatr Neurol. 2012 Sep;19 (3):130-51.
SCHWARTZ O, ALBERT ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. Nat Rev Micro. 2010;8(7):491-500.

SCHILTE, C. *et al.* Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 3, 2013.

SCHUFFENECKER, I. *et al.* Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. PLoS Medicine, v. 3, n. 7, p. 1058–1070, 2006.

SCOTT, C.; M, D, Marc Lecuit. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. N Engl J Med 2015; 372:1231-1239. DOI: 10.1056/NEJMra1406035. March 26, 2015.

SIMIÃO A. R., BARRETO F. K. A., OLIVEIRA R. M. A. B. CAVALCANTE J. W., NETO A. S. L., BARBOSA R. B., LINS C. S., MEIRA A. G., ARAÚJO F. M. C., LEMOS D. R. Q., ALENCAR C. H., CAVALCANTE L. P. G. A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.52 Uberaba 2019 Epub Oct 03, 2019.

SINGH P, Mittal V, Rizvi MMA, Chhabra M, Sharma P, Rawat DS, Bhattacharya D, Chauhan LS, Rai A. The first dominant co-circulation of both dengue and chikungunya viruses during the post-monsoon period of 2010 in Delhi, India. Epidemiology and Infection. 2012;140(7):1337-42.

SUDEEP AB, Parashar D Chikungunya: an overview. 2008 J Biosci33:443–449.

SERRA OP, CARDOSO BF, RIBEIRO AL, SANTOS FA, Silhessareenko RD. Mayaro Virus and dengue vírus1 and 4 natural infection in culicids from Cuiaba, state of Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(1):20-9.

SOLIGNAT, Maxime *et al.* Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. Virology, v. 393, n. 2, p. 183-197, 2009.

SOURISSEAU, Marion *et al.* Characterization of reemerging chikungunya virus. PLoS Pathog, v. 3, n. 6, p. e89, 2007.

STAIKOWSKY, F. *et al.* Prospective study of chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005–2006 outbreak. PLoS ONE4, e7603 (2009).

STRAUSS, Ellen G.; STRAUSS, James H. Structure and replication of the alphavirus genome. In: The Togaviridae and Flaviviridae. Springer New York, p. 35-90, 1986.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev*, v. 58, n. 3, p. 491-562, Sep 1994.

SUHRBIER A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P (2012) Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nat Rev Rheumatol* 8:420–429.

SUOMALAINEN M, Liljeström P, Garoff H. Spike protein-nucleocapsid interactions drive the budding of alphaviruses. *Journal of Virology*. 1992;66(8):4737-47.

TAUIL, P.L. Condições para a transmissão da febre do vírus chikungunya. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 2014; 773-4.

TEIXEIRA, M. G. *et al.* East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. *Emerg Infect Dis*, v. 21, n. 5, p. 906-7, May 2015.

TENG T-S, Kam Y-W, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng L-C, Ng LFP. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 2015;211(12):1925-35

THIBERVILLE, S. *et al.* Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, Orsay, p. 345–370, v. 99, 2013.

TOIVANEN, A. Alphaviruses: an emerging cause of arthritis? *Curr. Opin. Rheumatol*. 20, 486–490 (2008).

TSETSARKIN, K. A. *et al.* A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

UCHIME, Onyinyechukwu *et al.* The role of E3 in pH protection during alphavirus assembly and exit. *Journal of Virology*, v. 87, n. 18, p. 10255-10262, 2013.

VAN GENDEREN, Farah T. *et al.* First chikungunya outbreak in Suriname; clinical and epidemiological features. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 10, n. 4, p. e0004625, 2016.

VASCONCELOS, P.F.C.; LIMA, J.W.O.; ROSA, A.P.A.T.; TIMBÓ, M.J.; ROSA, E.S.T.; LIMA, H.R. *et al.* Epidemia de dengue em Fortaleza, Ceará: inquérito soropidemiológico aleatório. *Rev Saude Publica*. 1998;32(5):447-54.

VENUGOPALAN, A.; GHORPADE, R. P.; CHOPRA, A. Cytokines in acute chikungunya. *PLoS ONE*, v. 9, n. 10, 2014.

VERTEEG, L.; FEBRES, M. E. C.; BEAUMIER, C. M. The Role of Cellular Immune Responses on Chikungunya Virus Infection-Induced Arthritis. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 3, n. 2, p. 60–66, 2016.

VIJAYAKUMAR, K. P. *et al.* Clinical profile of chikungunya patients during the epidemic of 2007 in Kerala, India. *J. Glob. Infect. Dis.* 3, 221–226 (2011)

WAUQUIER N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With

Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. *The Journal of Infectious Diseases*. 2011;204 (1):115-23.

WEAVER, Scott. C. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 6, e2921, 2014.

WILEY, S. R.; SCHOOLEY, K.; SMOLAK, P. J. *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *immunity*, v. 3, n. 6, p. 673-682, 1995.

WÖLFEL, Silke *et al.* Complete genome sequence of a Chikungunya virus imported from Bali to Germany. *Genome Announcements*, v. 3, n. 2, p. e00164-15, 2015.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL DE RESPOSTA IMUNE, GENÉTICO E USO DE MEDICAÇÃO NAS INFECÇÕES AGUDA E CRÔNICA PELAS ARBOVIROSES E FATORES DIFERENCIAIS DA FEBRE CHIKUNGUNYA.

Pesquisador: VANIA ANGELICA FEITOSA VIANA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 96810618.0.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal do

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.046.022

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de dissertação do programa de Pós-graduação em Farmacologia que pretende compreender melhor a provável relação entre o uso de medicações, principalmente corticóides e AINEs na fase aguda e crônica em pacientes diagnosticados com Chikungunya. Toma-se necessário compreender melhor o perfil de resposta imune, tanto das amostras primárias, como das de seguimento dos participantes, a fim de se determinar associações, tendências e valor preditivo das variáveis investigadas.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Determinar fatores demográficos, farmacológicos e biológicos associados com as fases aguda e crônica da Febre Chikungunya e identificar padrões de diferenciação em relação a outras arboviroses circulantes.

Específicos:

- Descrever a prevalência, a distribuição e a incidência de infecções severas e crônicas de CHIKV de acordo com o sexo, faixa etária e localização geográfica;
- Avaliar o uso de medicação, particularmente corticóides e AINEs, na fase aguda da doença, ajustando-se para o tempo de doença, e verificar associações com a cronificação da doença;
- Examinar dosagens de citocinas em amostras de pacientes na fase aguda utilizando-se de banco de amostras positivas para Chikungunya armazenadas no LACEN, e comparando-se com amostras

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: compe@ufc.br