



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

MATHEUS DE SOUZA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA E ESTUDO DO PERFIL DAS
CITOCINAS IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 E TGF- β 1 EM INDIVÍDUOS COM FEBRE
CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL.**

FORTALEZA

2020

MATHEUS DE SOUZA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA E ESTUDO DO PERFIL DAS
CITOCINAS IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 E TGF- β 1 EM INDIVÍDUOS COM FEBRE
CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Ueda Navarro Yaochite.

FORTALEZA

2020

MATHEUS DE SOUZA SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO SOROEPIDEMIOLÓGICA E ESTUDO DO PERFIL DAS
CITOCINAS IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 E TGF- β 1 EM INDIVÍDUOS COM FEBRE
CHIKUNGUNYA NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Ueda Navarro Yaochite (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Kelen Cristina Ribeiro Malmegrim de Farias
Universidade de São Paulo (USP)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S236c Santos, Matheus de Souza.
Caracterização Soroepidemiológica e Estudo do Perfil das Citocinas IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 em indivíduos com febre chikungunya no estado do Ceará, Brasil. / Matheus de Souza Santos. – 2023.
9 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yachite.
1. Febre chikungunya. 2. Sorologia. 3. Citocinas. I. Título.

CDD 616.9

Aos meus pais, Rosa e Evandro, pelo amor incondicional demonstrado, principalmente, ao respeitarem e apoiarem as minhas escolhas.

Ao meu irmão, Lucas, e a minha prima, Ana Paula, por me inspirarem e incentivarem a valorizar cada vez mais a educação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu núcleo familiar: minha mãe, Rosa Felício, meu pai, Evandro Oliveira, meu irmão, Lucas de Souza, e minha prima, Ana Paula Saldanha, pelo apoio constante, e a todos os outros familiares que direta e indiretamente contribuíram durante este período.

Ao Jailson Cordeiro (Roque), pelos momentos que compartilhamos neste último ano morando juntos e pela paciência diária com as minhas ocupações; e aos meus outros amigos de vida, Breno Queiroz, Luís Pereira, Anaclecia Moreira, Gustavo Oliveira, Sávio de Borba, Evando Trajano, Rita Uchôa, Lara Wolfgang, Luanna Amaral, Rubia Torres, Islanya Aguiar e João Victor Oliveira, por deixarem a minha vida mais leve.

Aos amigos da pós-graduação, Anderson Costa, Bruno Nascimento, Expedito Maia, Vandbergue Santos, Jonathas Sales, Nicole Fiallos e Mirele Rodrigues, pelo companheirismo, incentivo e compreensão que passamos a ter uns pelos outros com o início do curso.

À Profa. Dra. Juliana Ueda, minha orientadora, pela responsabilidade na condução do projeto que permitiu a realização deste estudo, por ter se mostrado sempre muito disponível para a minha orientação e pela serenidade ao lidar com todos os desafios que surgiram durante este processo.

À Profa. Dra. Aparecida Nagao, pela humanidade e profissionalismo demonstrados desde meu primeiro contato com a imunologia durante a graduação, por ter me indicado para participar desta pesquisa e pela disponibilização do espaço e dos equipamentos do Laboratório de Imunologia (LABIM) para a realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Fábio Miyajima, pelas excelentes ideias para este trabalho e pela cooperação que possibilitou o seu desenvolvimento, mediando nossa colaboração com o Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE) e ajudando com a análise dos dados.

À farmacêutica Vania Angélica Feitosa, pela parceria no planejamento e no cumprimento de todas as etapas deste estudo, estando sempre disponível para ajudar quando solicitada.

Ao farmacêutico Raphael Rodrigues, pelo suporte técnico-científico dado na execução dos experimentos.

Às amigas Camilla Mateus e Andressa Albuquerque, doutorandas no LABIM; ao amigo Wilker Gotay e a todos que fazem parte do LIMCEMO, pelo companheirismo diário, pelos ensinamentos e pela colaboração na organização e realização dos experimentos.

À amiga da graduação em Farmácia Letícia Rodrigues, pela ajuda na realização dos experimentos.

À Dra. Lianna Perdigão, diretora do LACEN-CE; às Dras. Fernanda Montenegro, Lêda Simões, Maria Elizabeth Lisboa; à Débora Bezerra, Shirlene Telmos, Jaqueline Souto Vieira e Sônia Maria Santana, farmacêuticas do setor de virologia da instituição, pelo apoio na coleta dos dados sociodemográficos e na obtenção das amostras.

A todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pelo compartilhamento de conhecimentos e pelo incentivo à inovação e pesquisa científica.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pelo financiamento do projeto obtido através da Chamada 01/2017 – Programa Pesquisa para o SUS: gestão compartilhada em Saúde/PPSUS – CE FUNCAP-SESA-Decit/SCTIE/MS-CNPq.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES) pela bolsa de mestrado.

“Tudo o que é bom é custoso. Requer tempo,
requer paciência, e não há um fim para isso.”

(Carl Gustav Jung)

RESUMO

A febre chikungunya é uma arbovirose que vem causando grande impacto na saúde publicado Brasil, por ser transmitida pelo *Aedes aegypti*, mosquito amplamente disseminado no país, e por ser de alta morbidade, evoluindo com artrite crônica em muitas pessoas infectadas. Os mecanismos imunológicos que produzem estes sintomas, bem como os mecanismos de proteção ainda não foram totalmente elucidados. Assim, neste estudo foi caracterizado o perfil soropidemiológico e avaliada a resposta das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 em indivíduos com febre chikungunya nas fases aguda, pós-aguda e crônica, e nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV. Tratou-se de um estudo descritivo e transversal, com coleta de informações sociodemográficas e análise de amostras de soro de 351 pacientes com febre chikungunya em 2017 no estado do Ceará, Brasil. A sorologia para anticorpos anti-CHIKV e anti-DENV e a quantificação das citocinas séricas foram realizadas pelo método de ELISA. Todos os dados foram analisados e modelados por intermédio do software Stata® 15, tendo sido utilizados os testes estatísticos de *Mann-Whitney*, *Kruskal-Wallis* e qui-quadrado de *Pearson*, com significância de $p < 0,05$. No estudo, predominaram indivíduos naturais de Fortaleza (54,99%), do sexo feminino (78,92%) e na faixa etária de 18 a 69,9 anos (69,05%). Sujeitos acima da mediana de idade (51,73) estavam mais frequentes nas fases pós-aguda e crônica ($p = 0,033$). Sujeitos do sexo feminino apresentaram uma duração maior dos sintomas quando comparados aos do sexo masculino ($p = 0,0321$). As medianas das idades por grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV foram: 48,02 para IgM+ IgG-; 53,44 para IgM+ IgG+ e 59,45 para IgM- IgG+. Em todos os grupos foi visto predomínio do sexo feminino. No grupo com IgM+ IgG-, 50,00% dos sujeitos estavam na fase aguda e os outros 50,00% na fase pós-aguda; no grupo com IgM+ IgG+, 53,41% estavam na fase pós-aguda; no grupo com IgM- IgG+, 70,83% estavam na fase crônica. Foi encontrado 7,98% de codetecção IgM anti-CHIKV/IgM anti-DENV. Os indivíduos com IgM- IgG+ apresentaram níveis mais altos de IL-2 ($p = 0,0317$) em comparação com os dos outros grupos. Na fase crônica da doença, os sujeitos apresentaram níveis mais elevados de TGF- β 1 em comparação às outras fases. Sujeitos com IgM+ IgG+ e IgM- IgG+ apresentaram níveis mais elevados de TGF- β 1 ($p = 0,0121$) em comparação aqueles com IgM+ IgG-. Não foi observada diferença significativa na comparação dos níveis de IL-1 β , IL-17A e MCP-1 nas fases da doença e nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV. Foi observada uma diminuição das razões

MCP-1/TGF- β 1 com a progressão para a fase crônica da doença ($p = 0,0203$) e também no grupo com IgM- IgG+ quando comparado aos demais grupos ($p = 0,0038$). Assim, foi possível concluir que sujeitos acometidos pela chikungunya do sexo feminino e com idade maior que 51,73 anos apresentaram duração maior dos sintomas e que níveis elevados de IL-2 e de TGF- β 1 foram relacionados ao grupo com IgM- IgG+ e à fase crônica da doença, sugerindo que as características imunológicas da cronificação da CHIKF estão associados à alteração nos mecanismos de imunotolerância.

Palavras-chave: Febre chikungunya. Sorologia. Citocinas.

ABSTRACT

Chikungunya fever is an arbovirus that has had a major impact on public health in Brazil, as it is transmitted by *Aedes aegypti*, a mosquito widely spread in the country, and due to its high morbidity, evolving with chronic arthritis in many infected people. The immunological mechanisms that produce these symptoms as well as the protection mechanisms have not been fully elucidated yet. Thus, in this study, the seroepidemiological profile was characterized and the response of cytokines IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 and TGF- β 1 was evaluated in individuals with chikungunya fever in the acute, post-acute and chronic phases, and in the seropositivity groups for anti-CHIKV antibodies. It was a descriptive and cross-sectional study, with collection of sociodemographic data and analysis of serum samples from 351 patients with chikungunya fever in 2017 in the state of Ceará, Brazil. Serology for anti-CHIKV and anti-DENV antibodies and quantification of serum cytokines were performed using the ELISA method. All data were analyzed and modeled using the Stata® 15 software, using the Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Pearson chi-square statistical tests, with significance of $p < 0.05$. In the study, predominant individuals were born in Fortaleza (54.99%), female (78.92%) and aged between 18 and 69.9 years (69.05%). Subjects above the median age (51.73) were more frequent in the post-acute and chronic phases ($p = 0.033$). Female subjects had a longer duration of symptoms when compared to male subjects ($p = 0.0321$). The medians of age by seropositivity groups for anti-CHIKV were: 48.02 for IgM + IgG-; 53.44 for IgM + IgG + and 59.45 for IgM-IgG +. There was a predominance of females in all groups. In the group with IgM + IgG-, 50.00% of the subjects were in the acute phase and the other 50.00% in the post-acute phase; in the group with IgM + IgG +, 53.41% were in the post-acute phase; in the group with IgM-IgG +, 70.83% were in the chronic phase. 7.98% of IgM anti-CHIKV / IgM anti-DENV codetection was found. Individuals with IgM-IgG + had higher levels of IL-2 ($p = 0.0317$) compared to the other groups. In the chronic phase of the disease, the subjects had higher levels of TGF- β 1 compared to the other phases. Subjects with IgM + IgG + and IgM- IgG + showed higher levels of TGF- β 1 ($p = 0.0121$) compared to those with IgM + IgG-. No significant difference was observed when comparing the levels of IL-1 β , IL-17A and MCP-1 in the disease phases and in the seropositivity groups for anti-CHIKV antibodies. A decrease in the MCP-1 / TGF- β 1 ratios was observed with progression to the chronic phase of the disease ($p = 0.0203$), also in the group with IgM- IgG +, when compared to the other groups ($p = 0.0038$). Thus, it was possible to conclude that female subjects affected by chikungunya and aged over 51.73 years had longer duration of symptoms

and that high levels of IL-2 and TGF- β 1 were related to the group with IgM-IgG+ and the chronic phase of the disease, suggesting that the immunological characteristics of CHIKF chronicity are associated with changes in immunotolerance switches.

Keywords: Chikungunya fever. Serology. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do CHIKV	23
Figura 2 – Genoma do CHIKV	24
Figura 3 – Replicação do CHIKV.....	26
Figura 4 – Ciclos urbano e rural do CHIKV.....	27
Figura 5 – Distribuição dos genótipos e vetores do CHIKV no mundo.....	28
Figura 6 – Rota de infecção do CHIKV.....	32
Figura 7 – Citocinas que participam do processo patogênico na infecção pelo CHIKV.....	35
Figura 8 – Resposta imune ao CHIKV e diagnóstico laboratorial.....	37
Figura 9 – ELISA indireto.....	46
Figura 10 – ELISA sanduíche.....	47
Figura 11 – Fluxo das amostras selecionadas para a pesquisa.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização das variáveis sociodemográficas de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	50
Tabela 2 – Fases da doença em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	51
Tabela 3 – Grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	54
Tabela 4 – Codetecção de IgM anti-CHIKV/IgM anti-DENV.....	59
Tabela 5 - Concentrações mínimas, máximas e medianas em pg/ml das moléculas IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Taxa de incidência de casos confirmados de dengue, chikungunya e zika, segundo mês de início dos sintomas, Ceará, 2016 e 2017, com destaque para chikungunya.....	30
Gráfico 2 –	Relação da idade (maiores e menores de 65 anos) com os dias de sintomas relatados de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	52
Gráfico 3 –	Relação da idade (maiores e menores de 65 anos) com os dias de sintomas por sexo de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	53
Gráfico 4 –	Relação dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV com a idade em anos de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	55
Gráfico 5 –	Relação dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV com as fases da doença em 346 casos de CHIKF em 2017 no Ceará..	56
Gráfico 6 –	Relação dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV com os dias de sintomas relatados em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	57
Gráfico 7 –	Detecção de IgM anti-CHIKV pelos dias de sintomas relatados em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	58
Gráfico 8 –	Detecção de IgG anti-CHIKV e os dias de sintomas relatados em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	61
Gráfico 9 –	Comparação das concentrações de IL-1 β nas fases da doença em 348 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	61
Gráfico 10 –	Comparação das concentrações de IL-1 β nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 343 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	61
Gráfico 11 –	Comparação das concentrações de IL-2 nas fases da doença em 350 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	62
Gráfico 12 –	Comparação das concentrações de IL-2 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 345 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	63
Gráfico 13 –	Comparação das concentrações de IL-17A nas fases da doença em 336 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	64

Gráfico 14 –	Comparação das concentrações de IL-17A nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 331 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	64
Gráfico 15 –	Comparação das concentrações de MCP-1 nas fases da doença em 338 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	65
Gráfico 16 –	Comparação das concentrações de MCP-1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 333 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	66
Gráfico 17 –	Comparação das concentrações de TGF- β 1 nas fases da doença em 232 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	67
Gráfico 18 -	Comparação das concentrações de TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 231 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	67
Gráfico 19 –	Razões IL-1 β /TGF- β 1 nas fases da doença em 228 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	68
Gráfico 20 –	Razões IL-1 β /TGF- β 1 nos grupos de soropositividade em 227 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	69
Gráfico 21 -	Razões IL-17A/TGF- β 1 nos grupos de soropositividade em 226 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	70
Gráfico 22 -	Razões IL-17A/TGF- β 1 nos grupos de soropositividade em 226 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	70
Gráfico 23 -	Razões MCP-1/TGF- β 1 nas fases da doença em 227 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	71
Gráfico 24 -	Razões MCP-1/TGF- β 1 nos grupos de soropositividade em 226 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico)
ACPA	Anticorpos contra proteínas citrulinadas (<i>Anti-citrullinated protein antibodies</i>)
ADP	Adenosina difosfato (<i>Adenosine diphosphate</i>)
AINE	Anti-inflamatório não-esteróide
ANA	Anticorpos antinucleares (<i>Antinuclear antibodies</i>)
BHK-21	Rim de hamster bebê (<i>Baby hamster kidney</i>)
C	Proteína do capsídio
CCL2	Quimiocina do tipo C-C ligante 2 (<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>)
CCL5	Quimiocina do tipo C-C ligante 5 (<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>)
CD4	Grupo de diferenciação 4 (<i>Cluster of differentiation 4</i>)
CD8	Grupo de diferenciação 8 (<i>Cluster of differentiation 8</i>)
CHIKF	Febre chikungunya (<i>Chikungunya fever</i>)
CHIKV	Vírus chikungunya (<i>Chikungunya virus</i>)
CXCL8	Quimiocina do tipo C-X-C ligante 8 (<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>)
CXCL9	Quimiocina do tipo C-X-C ligante 9 (<i>C-X-C motif chemokine ligand 9</i>)
CXCL10	Quimiocina do tipo C-X-C ligante 10 (<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>)
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ECSA	Leste/Central/Sul Africano (<i>East/Central/South African</i>)
EGF	Fator de crescimento epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
ELISA	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
E1	Proteína do envelope 1
E2	Proteína do envelope 2
E3	Proteína do envelope 3
FGF-básico	Fator de crescimento de fibroblastos básico (<i>Fibroblast growth factor</i>)
FEO	Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
FR	Fator reumatóide
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos (<i>Granulocyte colony-</i>

	<i>stimulating fator</i>)
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos (<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator</i>)
HeLa	Henrietta Lacks
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (<i>Hepatocyte growth fator</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α (<i>Tumor necrosis fator-α</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IFN- α	Interferon- α
IFN- β	Interferon- β
IFN- γ	Interferon- γ
IOL	Linhagem do Oceano Índico (<i>Indian Ocean Lineage</i>)
IL-17	Interleucina-17
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-1Ra	Receptor antagonista de IL-1 (<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>)
IL-2	Interleucina-2
IL-2R	Receptor de interleucina-2 (<i>Interleukin-2 receptor</i>)
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IP-10	Proteína 10 induzida por IFN- γ (<i>IFN-γ-induced protein 10</i>)
LABIM	Laboratório de Imunologia
Lacen-CE	Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará
LIMCEMO	Laboratório de Imunologia Celular e Molecular
LLOD	Limite mínimo de detecção (<i>Lower limit of detection</i>)
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1 (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MIG	Monoquina induzida por IFN- γ (<i>Monokine induced by gamma interferon</i>)

MIP-1 α	Proteína 1- α inflamatória de macrófagos (<i>Macrophage inflammatory protein 1-α</i>)
NK	Assassino natural (<i>Natural killer</i>)
nsP-1	Proteína não-estrutural-1 (<i>Nonstructural protein-1</i>)
nsP-2	Proteína não-estrutural-2 (<i>Nonstructural protein-2</i>)
nsP-3	Proteína não-estrutural-3 (<i>Nonstructural protein-3</i>)
nsP-4	Proteína não-estrutural-4 (<i>Nonstructural protein-4</i>)
OPG	Osteoprotegerina
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open reading frame</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
pE2	Precursor da proteína E2
pH	Potencial hidrogeniônico
POC	Ponto de atendimento (<i>Point of care</i>)
qRT-PCR	Transcrição reversa quantitativa seguida de reação em cadeia da polimerase (<i>Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction</i>)
RANK	Receptor ativador do fator nuclear κ B (<i>Receptor activator of nuclear factor-κB</i>)
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (<i>Receptor activator of nuclear factor-κB ligand</i>)
RANTES	Regulada após ativação, célula T normal expressa e presumivelmente secretada (<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted</i>)
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RRV	Vírus do Rio Ross (<i>Ross River virus</i>)
PRNT	Neutralização por redução de placas (<i>Plaque reduction neutralization test</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (<i>Reverse-transcription polymerase chain reaction</i>)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α (<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
UFC	Universidade Federal do Ceará

UTR	Região não-codificante (<i>Untranslated region</i>)
VEEV	Vírus da encefalite equine venezuelana (<i>Venezuelan equine encephalitis virus</i>)
Vero	Rim verde (<i>Verda reno</i>)
5PL	Modelo logístico de 5 partes (<i>Fifth party logistic model</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Vírus chikungunya	23
2.1.1	<i>Estrutura, taxonomia, genoma e replicação</i>	23
2.1.2	<i>Ecologia e filogenia</i>	26
2.2	Febre chikungunya	28
2.2.1	<i>Histórico e epidemiologia</i>	28
2.2.2	<i>Rota de infecção</i>	30
2.2.3	<i>Resposta imune e imunopatogênese</i>	32
2.2.4	<i>Diagnóstico laboratorial</i>	36
2.2.5	<i>Manifestações clínicas</i>	38
2.2.6	<i>Tratamento</i>	41
2.2.7	<i>Justificativa e relevância</i>	41
3	HIPÓTESES	43
4	OBJETIVOS	44
4.1	Objetivo geral	44
4.2	Objetivos específicos	44
5	METODOLOGIA	45
5.1	Tipo de pesquisa	45
5.2	Aspectos éticos da pesquisa	45
5.3	Sujeitos	45
5.4	Processamento das amostras e delineamento experimental	46
5.5	ELISA	47
5.5.1	<i>Sorologia</i>	47
5.5.2	<i>Quantificação das citocinas nas amostras</i>	48
5.6	Análises descritivas e estatísticas dos dados	49
6	RESULTADOS	50
6.1	Características sociodemográficas da população	50
6.2	Caracterização das diferentes formas clínicas de progressão da doença	51
6.3	Caracterização das diferentes formas clínicas de progressão da doença	53
6.4	Concentrações das citocinas IL-1β, IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β1	60

6.4.1	<i>Quantificação dos níveis de IL-1β</i>	60
6.4.2	<i>Quantificação dos níveis de IL-2</i>	62
6.4.3	<i>Quantificação dos níveis de IL-17A</i>	63
6.4.4	<i>Quantificação dos níveis de MCP-1</i>	65
6.4.5	<i>Quantificação dos níveis de TGF-β1</i>	66
6.5	Razões entre as citocinas IL-1β, IL-17A, MCP-1 e TGF- β1	68
6.5.1	<i>Razão entre as citocinas IL-1β e TGF-β1</i>	68
6.5.2	<i>Razão entre as citocinas IL-17A e TGF-β1</i>	69
6.5.3	<i>Razão entre as citocinas MCP-1 e TGF-β1</i>	71
7	DISCUSSÃO	73
8	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO	94

1 INTRODUÇÃO

A febre chikungunya é uma arbovirose de grande impacto para a saúde pública no Brasil. A doença pode se manifestar apenas com sintomas agudos ou pode levar a dores articulares que persistem por semanas e até meses após seu início. Pouco se sabe sobre os mecanismos imunes envolvidos na origem e no controle destes sintomas, como níveis de moléculas que atuam nas fases da doença e suas repercussões.

Este estudo objetiva caracterizar o perfil soropidemiológico de indivíduos com CHIKF e avaliar nestes a resposta das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 em diferentes fases de progressão da doença; realizando descrição de variáveis sociodemográficas dos indivíduos, relacionando as variáveis sociodemográficas com as diferentes fases de progressão da doença, caracterizando o perfil sorológico de IgM e IgG anti-CHIKV nas diferentes fases de progressão da doença e de acordo com as variáveis sociodemográficas, investigando a presença de codeteção de anticorpos IgM anti-CHIKV e IgM anti-DENV, quantificando e comparando as concentrações de IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 nas diferentes fases da doença e nos diferentes grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV e determinando as razões das diferentes citocinas proinflamatórias pela citocina anti-inflamatória (TGF- β 1) nas diferentes fases da doença e nos diferentes grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV .

Houve uma epidemia da doença em 2017 no Ceará, atingindo uma população que não teve contato com o vírus anteriormente; ainda não se entende como o patógeno se comporta no cenário de epidemia nesta população, o que é importante para se pensar em melhores estratégias de controle da disseminação da doença. A determinação dos níveis de citocinas nas fases da doença pode ajudar a esclarecer possíveis relações entre os níveis de determinadas moléculas e a evolução da doença e permitir a observação de marcadores de prognóstico viáveis, além de contribuir para o estudo e desenvolvimento de vacinas e de novas terapias.

Foram incluídos 351 indivíduos com febre chikungunya, um número elevado em comparação ao estudado na maioria dos outros trabalhos do mesmo formato; estes foram analisados quanto às suas informações sociodemográficas presentes no Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL); nas suas amostras de soro foram realizadas sorologia para CHIKV e para DENV e quantificação das citocinas pela técnica de ELISA.

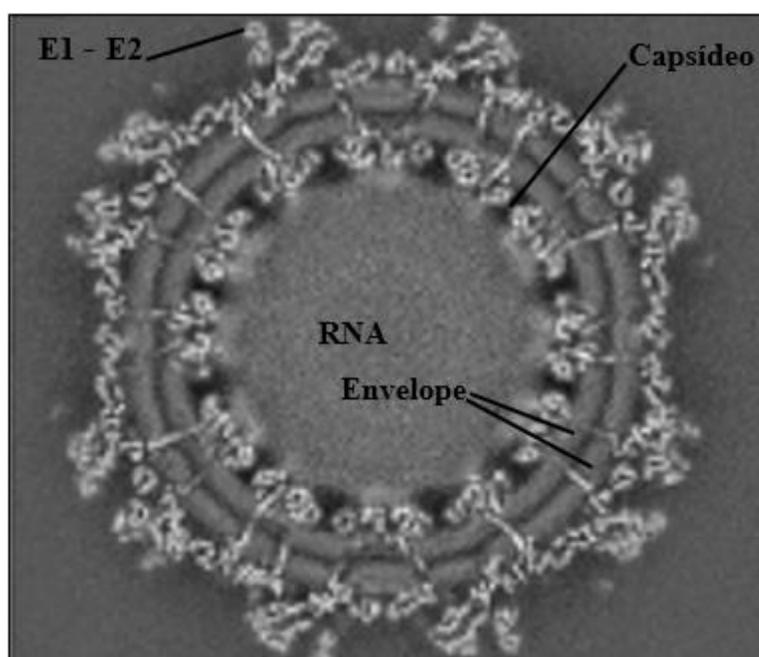
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus chikungunya

2.1.1 Taxonomia, genoma, estrutura e replicação

O vírus chikungunya (CHIKV) é um membro do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*, que possui como material genético uma fita simples de RNA de polaridade positiva, contendo 11,8kb. Um capsídeo icosaédrico com aproximadamente 70 nm de diâmetro, o qual é envolvido por um envelope lipídico, protege o ácido nucléico (ROUGERON *et al.*, 2015; VU; JUNGKIND; LABEAUD; 2017). O capsídeo é composto por 240 cópias da proteína do capsídeo (C). O envelope se constitui de uma bicamada lipídica incrustada de heterodímeros das glicoproteínas E1-E2, arranjados em trímeros que são chamados de espículas (Figura 1) (SILVA E DERMODY, 2017; CHEN *et al.*, 2018).

Figura 1 – Estrutura do CHIKV.



Fonte: Adaptado de Basore *et al.* (2019).

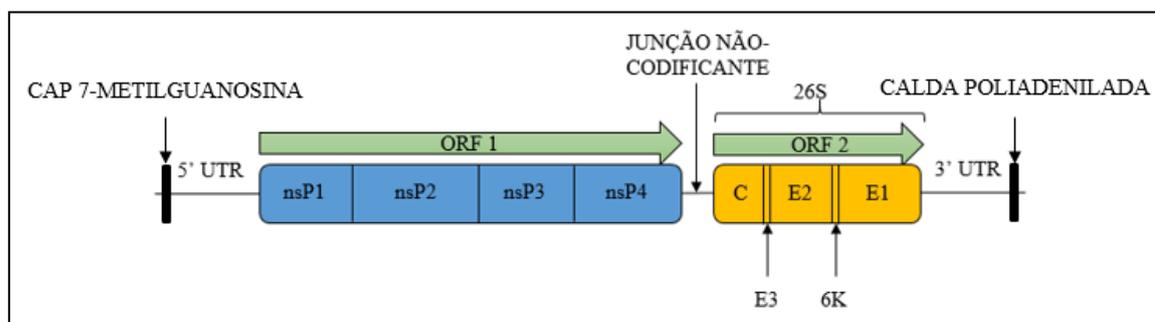
O gênero *Alphavirus* consiste no único gênero vinculado à família *Togaviridae*, que compreende mais de 30 espécies de vírus, os quais contam, em sua maioria, com mosquitos

como transmissores e com primatas humanos e não-humanos, equídeos, aves, anfíbios e répteis como hospedeiros vertebrados (CHEN *et al.*, 2018).

Alguns alfavírus causam doenças humanas e estas podem ter diferentes evoluções: classicamente aqueles que surgiram na América, como o vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), causam sintomas neurológicos, incluindo encefalite grave; por outro lado, os que tiveram origem na Eurásia e África provocam principalmente exantema e artrite, à semelhança do CHIKV (GIRY *et al.*, 2017).

O genoma do CHIKV se baseia em duas fases de leitura aberta (ORFs), separadas por uma junção não-codificante e delimitadas por duas regiões não-codificantes (UTRs): 5', que contém um cap 7-metilguanossina, e 3', que possui uma cauda poliadenilada. A ORF 1 codifica quatro proteínas não-estruturais (nsP1-4), que formam diferentes componentes do complexo da RNA replicase, responsável pela multiplicação do RNA genômico, enquanto que a ORF 2 dá origem a um RNA subgenômico (26S), que codifica cinco proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K) a partir de um promotor subgenômico de fita negativa (Figura 2) (THIBERVILLE *et al.*, 2013).

Figura 2 - Genoma do CHIKV.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A nsP1 desempenha atividades de metiltransferase e guanililtransferase; a nsP2 possui as funções de helicase e protease; a nsP3 atua como fosfoproteína, ADP-ribosil hidrolase e interage com fatores do hospedeiro; e a nsP4 é uma RNA polimerase RNA dependente (RNA replicase), e tem atividade adenililtransferase terminal (CHEN *et al.*, 2018). As proteínas C estão envolvidas no crescimento e montagem viral; as glicoproteínas E1 e E2 funcionam, respectivamente, mediando as fases de fusão da membrana e de ligação ao receptor; E3 ajuda a dar estabilidade estrutural a E2 e protege E1-E2 da fusão prematura com a membrana; e 6K

participa da permeabilização da membrana e da liberação dos vírions (SILVA E DERMODY, 2017).

O CHIKV apresenta tropismo amplo, se multiplicando em vários tipos celulares de vertebrados e invertebrados. Foi visto que os glicosaminoglicanos presentes em uma grande variedade de células parecem participar da etapa de ligação aumentando a infecctividade (SILVA E DERMODY, 2017). Foi demonstrado que o receptor Mrxa8 está comprometido na ligação do CHIKV à célula, que abrange E1-E2 e é menor quando o vírion perde E3 (BASORE *et al.*, 2019).

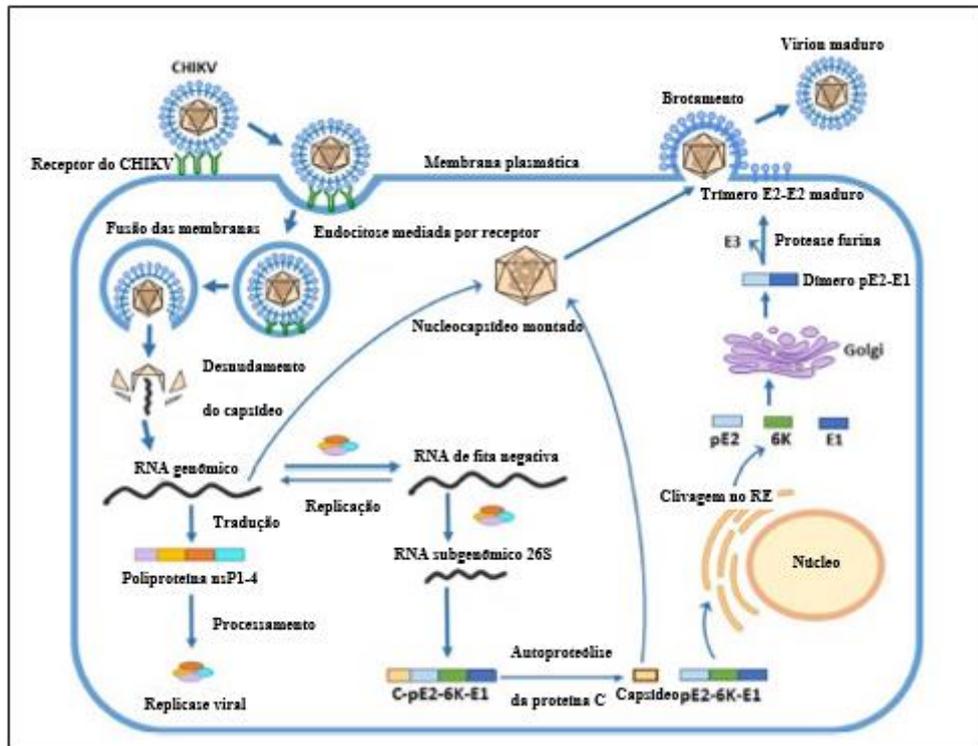
A entrada do CHIKV na célula ocorre por endocitose mediada por clatrina (BURT *et al.*, 2017; LOMBARDI PEREIRA *et al.*, 2019). Após a infecção, as glicoproteínas do envelope sofrem alterações conformacionais devido ao pH ácido da vesícula endossômica, de forma que a glicoproteína E1 é exposta e pode atuar na fusão do envelope viral com a membrana endossômica. Neste processo o nucleocapsídeo vai para o citoplasma e libera o RNA viral, que é traduzido em poliproteína não-estrutural e esta é então clivada em nsP1-4. As nsPs geram um intermediário de RNA de sentido negativo usado como molde para a produção de RNA genômico; o intermediário também é utilizado para a síntese de uma poliproteína estrutural, a qual posteriormente origina as proteínas estruturais (THIBERVILLE *et al.*, 2013; LUM E NG, 2015).

A replicação viral ocorre inicialmente em reentrâncias na membrana plasmática das células infectadas, chamadas de esférulas, onde ficam armazenados o RNA e as nsPs recém-sintetizadas (LOMBARDI PEREIRA *et al.*, 2019). Os intermediários são protegidos da degradação e do reconhecimento por receptores da imunidade inata no colo destas estruturas. Com a progressão da infecção, as esférulas são deslocadas para o citoplasma onde formam grandes vacúolos citopáticos (SILVA E DERMODY, 2017).

A proteína C presente na poliproteína estrutural sofre autoproteólise e o restante da molécula precursora é processado no retículo endoplasmático (RE) (ABDELNABI; NEYTS; DELANG; 2015). No citoplasma, unidades de proteína C em número suficiente se agrupam com RNAs genômicos e formam os nucleocapsídeos (CHEN *et al.*, 2018). No RE, as glicoproteínas E1 e pE2 se associam em heterodímeros, os quais se trimerizam, formando as espículas. A glicoproteína pE2 é clivada em E2 e E3 pela furina celular no interior do endossomo; este processo ocorre durante o transporte das glicoproteínas do RE, onde o ambiente é ácido, para a superfície celular, que apresenta pH neutro, fazendo com que E3 seja liberada. As espículas e o envelope proveniente da membrana plasmática envolvem os

nucleocapsídeos, ao passo que a proteína 6K contribui para a morfogênese das novas partículas virais infecciosas (Figura 3) (YAP *et al.*, 2017).

Figura 3 – Replicação do CHIKV.

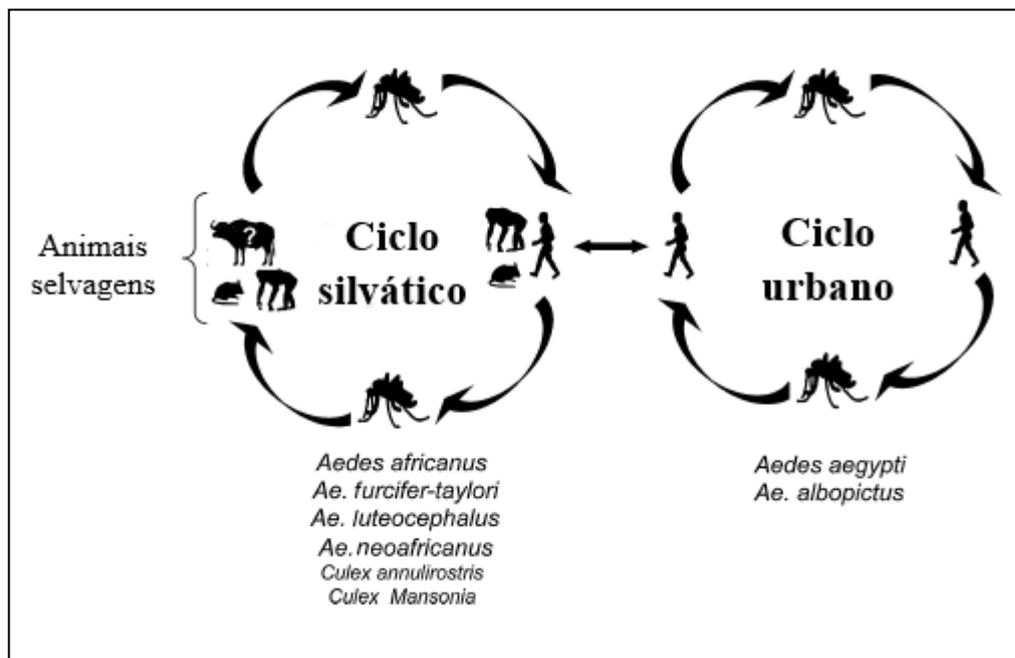


Fonte: Adaptado de Abdelnabi; Neyts; Delang (2015).

2.1.2 Ecologia e filogenia

O CHIKV é um vírus transmitido por artrópodes (arbovírus) que tem como principais vetores os mosquitos *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, espécies bastante adaptadas a presença humana. As fêmeas destes mosquitos necessitam fazer repasto sanguíneo para o amadurecimento dos seus ovos e é nesta ocasião que pode ocorrer a transmissão homem-mosquito-homem, que define o ciclo urbano. Na África, um ciclo enzoótico/silvático de transmissão é mantido em períodos interepidêmicos e se dá entre mosquitos arbóreos (*Ae. furcifer-taylori*, *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Culex annulirostris* e *Mansonia africana*, por exemplo) e macacos, roedores, aves e o homem; o último essencialmente em zonas rurais. Os surtos acontecem durante períodos chuvosos, quando o número de vetores aumenta (Figura 4) (THIBERVILLE *et al.*, 2013; ROUGERON *et al.*, 2015).

Figura 4 – Ciclos urbano e rural do CHIKV.



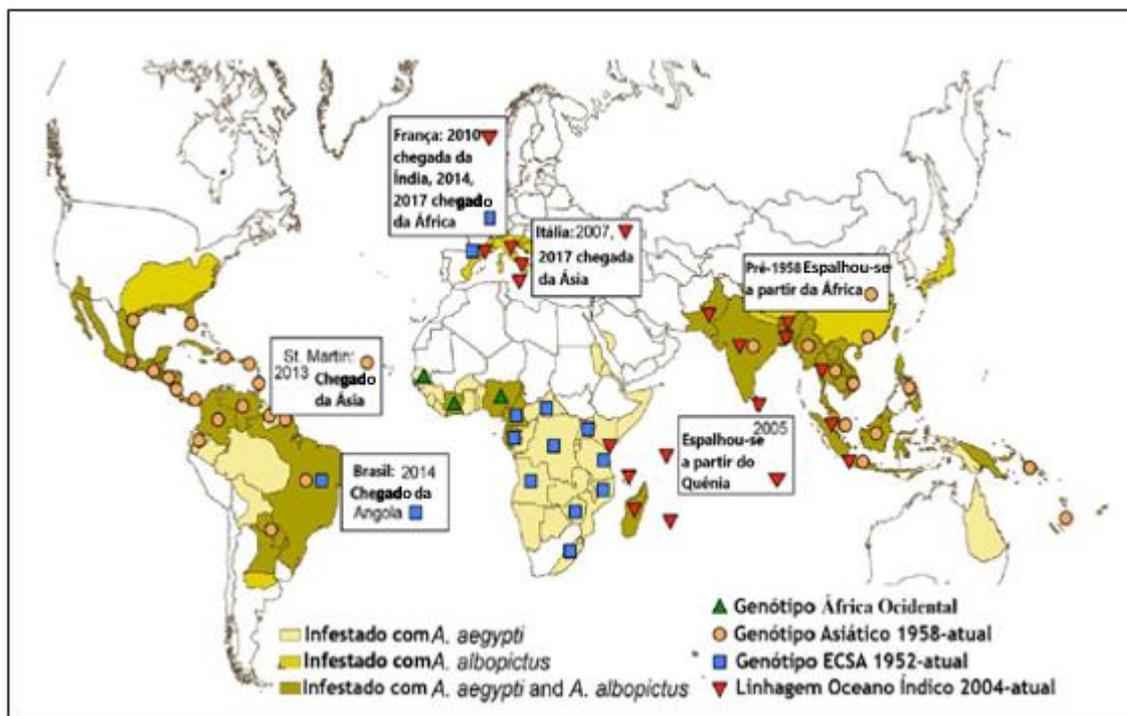
Fonte: Adaptado de Rougeron *et al.* (2015).

O mosquito *Ae. aegypti* se propaga em regiões áridas e de clima tropical; no entanto, não sobrevive em regiões temperadas, ao contrário do *Ae. albopictus*, que possui alta capacidade de invadir e se prolifera com sucesso em países onde predominam temperaturas mais baixas (MASCARENHAS *et al.*, 2018).

Acredita-se que o CHIKV tenha surgido na África Subsaariana há centenas de anos, a partir de um ancestral que foi transmitido dos mosquitos do gênero *Aedes* para primatas e talvez para outros vertebrados, uma vez que o *Ae. aegypti* evoluiu de uma espécie arbórea e zoofílica também nesta região (WEAVER E FORRESTER, 2015).

Estudos filogenéticos identificaram três genótipos de CHIKV: o oeste africano e o Leste/Central/Sul Africano (ECSA), que são endêmicos e responsáveis por epidemias na África, sendo que o segundo também foi identificado nas Américas; o asiático, que esteve relacionado com a disseminação da doença no sudeste asiático, no Caribe e nas Américas. A linhagem do Oceano Índico (IOL), que surgiu a partir do genótipo ECSA, causou surtos em ilhas do Oceano Índico (Figura 5) (NUNES *et al.*, 2015; NAVECA *et al.*, 2019).

Figura 5 – Distribuição dos genótipos e vetores de CHIKV no mundo.



Fonte: Adaptado de Rezza e Weaver (2019).

2.2 Febre chikungunya

2.2.1 Histórico e epidemiologia

A doença causada pelo CHIKV, caracterizada por febre, exantema e artralgia foi inicialmente reportada em 1952-53, durante um surto na região que corresponde atualmente a Tanzânia. A população local passou a chamá-la de chikungunya, um termo em Makonde que significa “aquele que se dobra”, se referindo a postura recurvada assumida pelos indivíduos doentes devido às dores articulares (THIBERVILLE *et al.*, 2013; WEAVER E FORRESTER, 2015; BURT *et al.*, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2018).

O fato do solo do local ser altamente permeável levou as famílias a estocarem a água para uso doméstico em seus vilarejos, o que resultou no aumento da densidade populacional de *Ae. aegypti* no peri e no intradomicílio e, conseqüentemente, em incontáveis casos da doença (WEAVER E FORRESTER, 2015).

Após sua descoberta, a febre chikungunya (CHIKF) provocou pequenos surtos em diversos países africanos e em alguns países asiáticos entre as décadas de 1950 e 1990 (VU; JUNGKIND; LABEAUD; 2017; BURT *et al.*, 2017). Houveram registros de epidemias em

países como África do Sul (1956, 1975-1977), República Democrática do Congo (1958, 1960 e 1999-2000), Senegal (1960, com surtos frequentes até 1996-1997), Tailândia (1960 e casos esporádicos em 1988), Uganda (1961-1962 e 1968), Camboja (1961), Índia (1963, 1964-1965 e 1973), Nigéria (1964, 1969 e 1974), República Centro Africana (1978-1979) e Malásia (1998) (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016).

A IOL causou um surto no litoral do Quênia em 2004 e depois levou a infecção de milhões de pessoas em ilhas do Oceano Índico e Índia. Através do deslocamento aéreo de viajantes infectados, a IOL chegou à Europa, sudeste da Ásia e Américas, com transmissão iniciada localmente (autóctone) relatada em países como Itália (2007), França (2010) e muitos países asiáticos. O genótipo asiático, que passou pela Índia, sudeste asiático e Polinésia Francesa, esteve implicado na chegada da doença nas Américas, tendo entrado primeiro na Ilha de São Martinho em 2013 e, em seguida, circulado pelo restante do Caribe e América Central, norte da América do Sul e Flórida (WEAVER E LECUIT, 2015; SILVA E DERMODY, 2017).

Observou-se que algumas cepas da IOL apresentaram maior capacidade de se adaptar em *Ae. albopictus*, em consequência da substituição de uma alanina por uma valina na posição 226 da proteína E1 (E1-A226V) do vírus, o que levou ao aumento da dispersão do CHIKV; já no *Ae. aegypti*, esta mutação evolutiva não mostrou interferir na aptidão para infecção (TSETSARKIN *et al.*, 2007; ARIAS-GOETA *et al.*, 2014). Com o estabelecimento da transmissão da doença pelo *Ae. albopictus*, em parte explicada pela mutação referida, países temperados passaram a ser afetados por surtos de CHIKF (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016; REZZA E WEAVER, 2019).

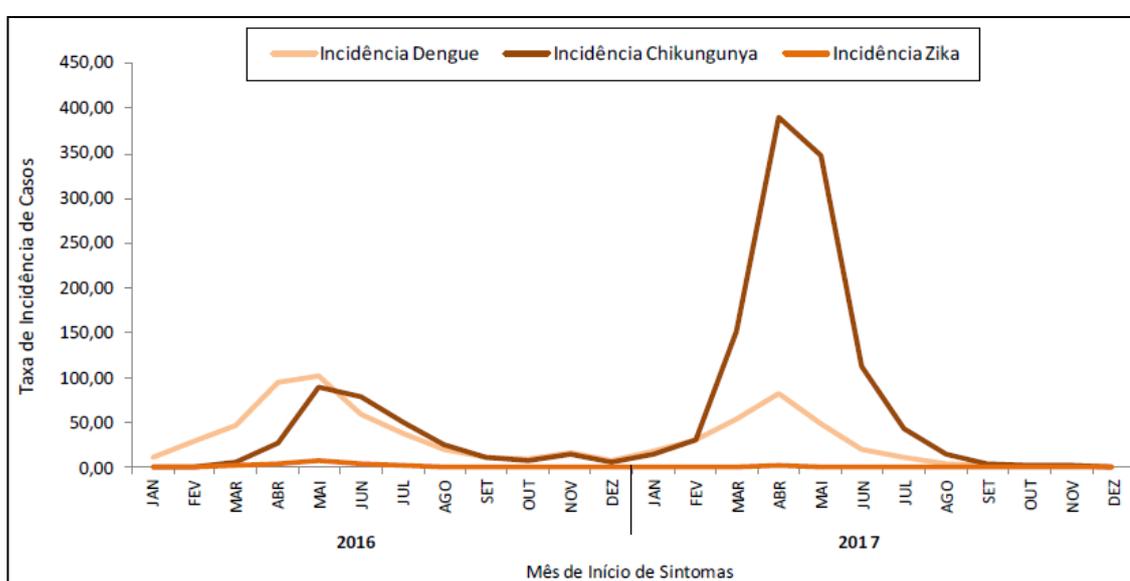
Nas Américas a transmissão autóctone de doença foi confirmada em 50 países ou territórios, incluindo o Brasil, que teve a confirmação de seus primeiros casos em 2014 nas cidades de Oiapoque (estado do Amapá) e Feira de Santana (estado da Bahia), quase ao mesmo tempo (NUNES *et al.*, 2015; NAVECA *et al.*, 2019). Foi demonstrada a circulação de dois genótipos no país: o asiático, que entrou pelo município de Oiapoque, possivelmente vindo da Guiana Francesa; e o ECSA, que foi trazido para Feira de Santana por um viajante que havia retornado da Angola (MASCARENHAS *et al.*, 2018).

Em 2016 foram registrados 277.882 casos prováveis de CHIKF no Brasil e, em 2017, 185.737, sendo que destes 151.966 (81,8%) foram confirmados. No ano de 2017 também foi verificado que a região Nordeste apresentou o maior número de casos suspeitos da doença

(142.131), em relação ao total de casos suspeitos do país, o que corresponde a 76,5% das notificações (BRASIL, 2018).

No ano de 2016 houve transmissão sustentada de CHIKF no Ceará, caracterizando epidemia, com 49.516 casos suspeitos, dos quais 31.482 (63,6%) foram confirmados e estiveram distribuídos em 139 (75,5%) dos 184 municípios cearenses (CEARÁ, 2017). Em 2017 foram notificados 137.424 casos prováveis da CHIKF no estado, com 103.007 destes (75,5%) confirmados, um aumento expressivo no número de confirmações em relação a 2016, mostrando caráter explosivo entre os meses de fevereiro e junho (Gráfico 1). No mesmo ano foi observado um expressivo número de óbitos em decorrência da doença (CEARÁ, 2018). A unidade federativa do Ceará concentrou 66% dos casos da doença no país em 2017, com 57,4% dos casos apenas em Fortaleza, a cidade do Brasil com a maior epidemia da doença até então (BASTOS; ABREU; SILVA JÚNIOR, 2018).

Gráfico 1 – Taxa de incidência de casos confirmados de dengue, chikungunya e zika, segundo mês de início dos sintomas, Ceará, 2016 e 2017, com destaque para chikungunya.



Fonte: CEARÁ, 2018.

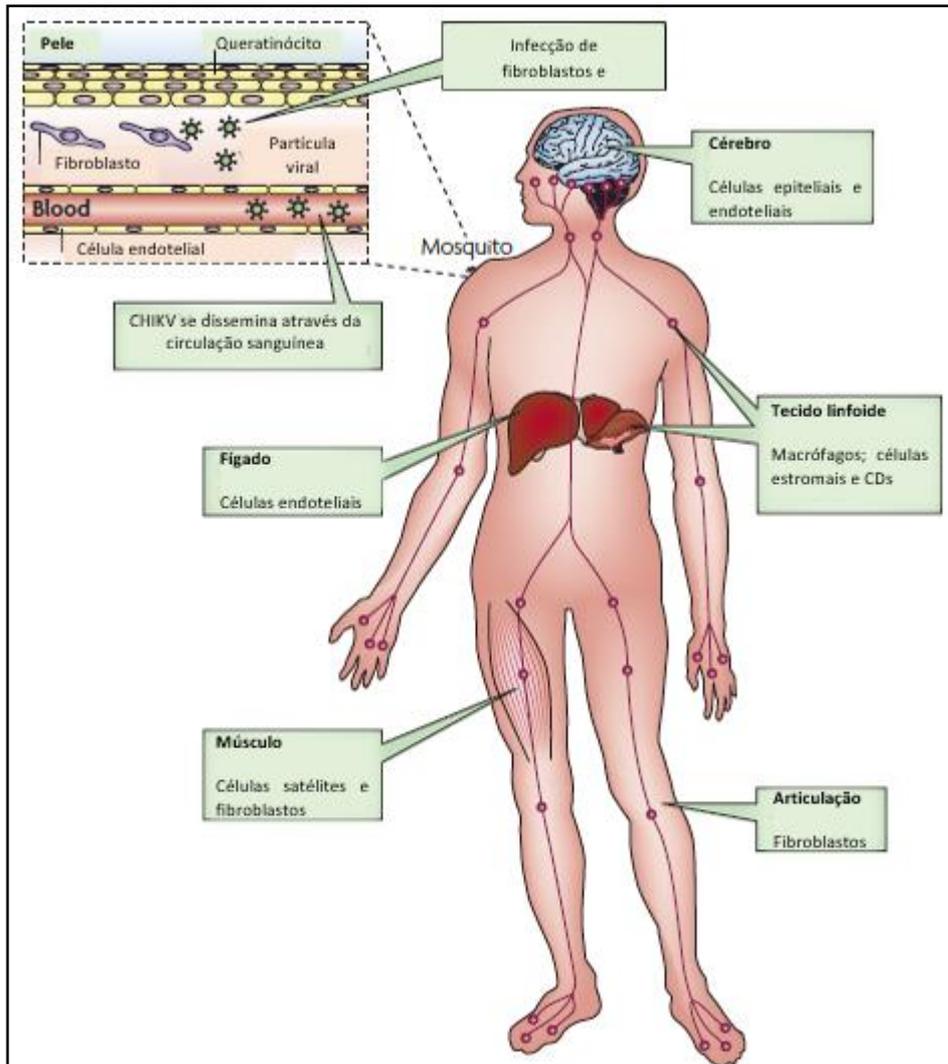
2.2.2 Rota de infecção

Quando o mosquito infectado pelo CHIKV pica o homem, o vírus é injetado na derme e nos capilares sanguíneos. O vírus se multiplica primeiramente em células presentes na pele, como fibroblastos e macrófagos, depois ele acaba por se espalhar pelas vias linfáticas e de lá para órgãos e tecidos periféricos através do sistema circulatório. Baço, músculos, articulações,

fígado e cérebro são outros locais do corpo em que a replicação passa a ocorrer; no momento em que se estabelece uma fase de alta viremia no indivíduo infectado, o vírus pode ser passado para um mosquito susceptível que o picar (LUM E NG, 2015; SILVA E DERMODY, 2017).

No sítio de inoculação o CHIKV interage com células dendríticas, incluindo células de Langerhans, que ajudam no transporte do patógeno para outros locais do corpo (GASQUE *et al.*, 2015). Os monócitos aparentemente passam a ser infectados na fase virêmica, se tornando os agentes da disseminação viral e, portanto, da infecção sistêmica. Células endoteliais e satélites e fibroblastos são infectados nos músculos e nas articulações, células endoteliais no fígado, células epiteliais e endoteliais no cérebro e macrófagos e células estromais nos linfonodos e no baço; estes últimos órgãos juntamente com os tecidos articulares podem ser os locais de persistência viral (Figura 6) (ROUGERON *et al.*, 2015).

Figura 6 – Rota de infecção do CHIKV.



Fonte: Adaptado de Schwartz e Albert (2010).

2.2.3 Resposta imune e imunopatogênese

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e é essencial na defesa contra o CHIKV, posto que a resposta imune adaptativa demora mais de uma semana para ser desenvolvida. Neste contexto, os interferons (IFNs) do tipo I α e β foram estabelecidos como determinantes da atividade antiviral inata na CHIKF (LUM E NG, 2015). A marca registrada da imunidade inata durante a CHIKF é a produção de IFN do tipo I, que prontamente responde ao aumento do título viral desencadeando a síntese de diversas proteínas antivirais e estabelecendo um estado antiviral geral (SCHWARTZ E ALBERT,

2010). Nas articulações, os IFNs levam a alta produção de prostaglandinas que ativam e sensibilizam nociceptores e assim causam dor (GASQUE *et al.*, 2015).

A febre na CHIKF está associada ao aumento dos níveis das citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-1 β e IL-6, conhecidas por isso como pirogênios endógenos; mas não à elevação de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (NG *et al.*, 2009; CHAAITHANYA *et al.*, 2011). Foi verificado que estas citocinas atingem altos níveis na fase aguda e que, quando a febre e a viremia passam, estes níveis retornam ao normal (CHOW *et al.*, 2011).

Manifestações cutâneas, como o exantema maculopapular, surgem e desaparecem dentro de alguns dias sem deixar repercussões e são resultantes de uma resposta inflamatória à primeira rodada de síntese do CHIKV. A uveíte, uma das afecções oculares mais frequentemente associadas à infecção pelo vírus, provavelmente advém da ação deste em fibroblastos de tecidos oculares, como córnea, esclera e íris, e nos músculos motores oculares (GASQUE *et al.*, 2015).

De modo geral a imunoglobulina (Ig) M é detectável entre os dias três e oito da infecção, enquanto que a IgG com atividade neutralizante é produzida a partir do dia quatro. IgM e IgG são neutralizantes e participam da eliminação do vírus na primeira fase da infecção, sendo que a IgM neutralizante tem importância até o dia dez da infecção, momento no qual passa a ter atividade complementar a da IgG precoce. Finalmente, a resposta humoral progride com predominância de IgG neutralizante que pode persistir por toda a vida (CHUA *et al.*, 2017). A IgM geralmente persiste por três a quatro meses, mas pode persistir por até um ano, particularmente em pacientes com artralgia à longo prazo (VAIRO *et al.*, 2019).

Pacientes com CHIKF na fase aguda muito precoce (no dia em que começaram a manifestar os sintomas) mostraram ter níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (IFN- α , IFN- γ , IL-6), da citocina antiinflamatória IL-10, e dos quimiotraentes quimiocina de neutrófilos (CXCL8/IL-8), proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2/MCP-1), monoquina induzida por IFN- γ (CXCL9/MIG) e proteína 10 induzida por IFN- γ (CXCL10/IP-10) quando comparados a indivíduos controles (TANABE *et al.*, 2019).

No pico da fase aguda, pacientes com CHIKF apresentaram concentrações elevadas das moléculas IFN- α , IL-6, citocinas que participam da ativação de linfócitos NK (IL-12 e IL-15), um estimulante do crescimento e maturação de linfócitos B e da ativação de linfócitos T (IL-7), inibidor do efeito pró-inflamatório da IL-1 β (IL-1Ra) e das quimiocinas CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 em comparação a pessoas saudáveis. Na fase convalescente, os pacientes doentes apresentaram níveis aumentados das moléculas relacionadas a um perfil

antinflamatório (eotaxina e IL-4), do receptor de IL-2 (IL-2R), dos fatores estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), de crescimento de hepatócitos (HGF) e de crescimento de fibroblastos básico (FGF-básico) e das quimiocinas CXCL9/MIG e proteína inflamatória 1- α de macrófagos (MIP-1 α); os mediadores CCL5/RANTES e fator de crescimento epidermal (EGF) atingiram seus picos no final desta fase. Com a progressão da doença para a fase crônica, a citocina IL-17, estimulante de inflamação por neutrófilos, passou a ser detectada (CHOW *et al.*, 2011).

Três hipóteses foram levantadas na tentativa de explicar o porquê de alguns pacientes com CHIKF evoluírem com artrite crônica: persistência da partícula viral infecciosa; persistência de ácidos nucléicos e antígenos virais (sustentação da estimulação imunológica), e ativação imunológica persistente em certos indivíduos mesmo após a eliminação do vírus (patogênese imunomediada) (BURT *et al.*, 2017).

Foi verificado que uma forte resposta de citocina, como o TNF- α , na fase aguda da CHIKF está relacionada à diminuição da incidência de dor articular crônica, e que a presença de IL-2, IL-4 e IL-13 nesta fase é protetora para a desenvolvimento de artrite crônica na doença (CHANG *et al.*, 2018).

A gravidade dos fenômenos agudos da infecção pelo CHIKV parece estar relacionada as altas cargas virais (até 10^6 cópias de RNA viral/ml de sangue) que podem ser atingidas nesta fase, na qual os sintomas têm duração média de aproximadamente uma semana, até que a viremia comece a cair (STAIKOWSKY *et al.*, 2009).

A gravidade da CHIKF aguda (febre maior que $38,5^{\circ}\text{C}$ ou pulso máximo de 100 batimentos/min. ou plaquetas menores que 100×10^6) está associada a níveis elevados de IL-1 β e IL-6 e níveis diminuídos da quimiocina CCL5/RANTES. As moléculas referidas podem ser as causadoras da febre alta nestes casos e IL-1 β pode mediar a artralgia, uma vez que ela está envolvida na gênese de muitas patologias artríticas. Concentrações menores de CCL5 na CHIKF aguda grave parecem estar ligadas a plaquetopenia observada, já que as plaquetas podem atuar como reservatórios desta quimiocina (NG *et al.*, 2009).

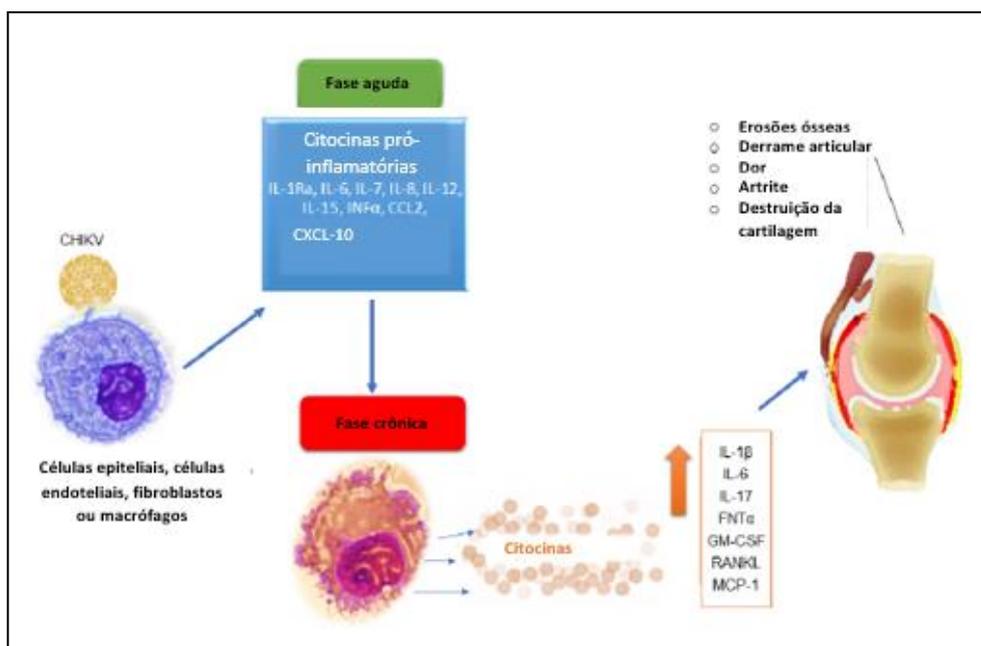
Danos osteoarticulares e musculares são repercussões da replicação do CHIKV nas células destes tecidos e da resposta inflamatória resultante da replicação, marcada pela produção de citocinas e quimiocinas, as quais levam a uma forte infiltração de linfócitos NK, neutrófilos, macrófagos e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. O infiltrado celular provoca abundante degeneração das miofibras e lesão e perda das células mesenquimais da sinóvia e do periósteo em modelo murino de CHIKF (FOX E DIAMOND, 2016).

Foi visto que as concentrações de IFN- α e de IL-12 se mantiveram altas em pacientes com CHIKF crônica, mas não nos recuperados. A IL-12, que atua na ativação de células imunes inatas, como linfócitos NK (*Natural killer*), que são citotóxicos para células infectadas pelo CHIKV, e macrófagos (responsivos ao desafio infeccioso), juntamente com o IFN- α em altos níveis indica combate ao CHIKV, sendo possível supor que o vírus pode persistir por meses e contribuir para o desenvolvimento da artrite crônica (HOARAU *et al.*, 2010).

Os níveis séricos de IL-6 e de fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) em pacientes com artrite induzida por CHIKV são mais elevados do que aquelas dos pacientes que se recuperaram completamente, o que teria relação com a neutrofilia observada na fase aguda. A neutrofilia está relacionada ao aumento de IL-17, que adiante leva a produção de IL-6 (CHOW *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que osteoblastos infectados pelo vírus passam a produzir IL-6 e ligante do receptor ativador do fator nuclear κ -B (RANKL) e que a relação entre RANKL e osteoprotegerina (OPG) pode estar elevada em pacientes com CHIKF, possibilitando sugerir a participação deste sistema na artrite crônica por CHIKV. A IL-6 estimula a liberação de RANKL e suprime a OPG. O RANKL se liga ao receptor RANK em células precursoras de osteoclastos e induz o amadurecimento de osteoclastos e a reabsorção óssea, e a OPG inibe RANKL (NORET *et al.*, 2012) (Figura 7).

Figura 7 – Citocinas que participam do processo patogênico na infecção pelo CHIKV.



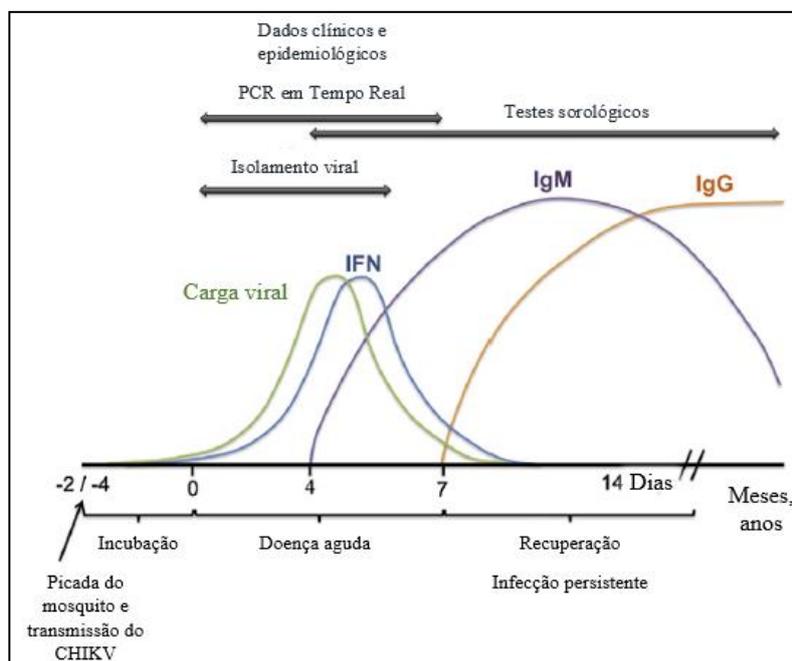
Fonte: Adaptado de Amaral *et al.* (2019).

A análise do fluido sinovial de alguns pacientes com CHIKF crônica não mostrou RNA viral ou antígenos virais indicando, portanto, que a persistência viral não seria uma explicação completa para a doença crônica causada pelo CHIKV e também que pode haver o envolvimento de autoantígenos e linfócitos autorreativos neste contexto (CHANG *et al.*, 2017). Há poucas evidências de autoimunidade por meio da detecção de anticorpos antinucleares (ANA), fator reumatoide (FR) e anticorpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) e polimorfismos de epítomos compartilhados (TANAY *et al.*, 2017).

2.2.4 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da infecção por CHIKV pode ser direto, por meio do isolamento viral e da investigação do RNA viral (métodos virológicos), ou indireto, através do emprego da pesquisa de anticorpos específicos (métodos sorológicos). Sangue total, plasma, soro, líquido cefalorraquidiano, saliva e urina são amostras clínicas que podem ser utilizadas nestes exames (BRASIL, 2017). A escolha entre um método e outro vai depender do período da doença em que a amostra foi coletada (Figura 8) (CUNHA E TRINTA, 2017; VAIRO *et al.*, 2019).

Figura 8 – Resposta imune ao CHIKV e diagnóstico laboratorial.



Fonte: Adaptado de Rougeron *et al.* (2015).

O isolamento viral, embora geralmente não seja utilizado no diagnóstico de rotina, pode ser realizado em amostras de soro coletadas até sete dias após o início dos sintomas da CHIKF em linhagens celulares de mosquitos ou mamíferos, nas quais podem ser observados efeitos citopáticos passados um a três dias da inoculação. Os resultados podem ser confirmados por imunofluorescência ou RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) (SILVA *et al.*, 2018). As principais linhagens celulares utilizadas nesta técnica são Vero, BHK-21 e HeLa. O isolamento viral é um método altamente específico, no entanto requer um longo tempo para a obtenção dos resultados e um laboratório de nível de biossegurança 3 (BRASIL, 2014).

A investigação de RNA viral é realizada através de técnicas de biologia molecular; as mais utilizadas são a RT-PCR) e a qRT-PCR (*Quantitative RT-PCR*), as quais permitem um diagnóstico rápido e sensível. Estas técnicas são capazes de identificar o ácido nucléico viral especialmente entre o primeiro e o quinto dia (período de maior viremia), até aproximadamente o oitavo dia depois do surgimento dos sintomas, sendo assim essenciais no diagnóstico precoce da infecção (BRASIL, 2017). O diagnóstico precoce da CHIKF é importante, em especial nos casos de meningoencefalite e de dermatite vesiculobolhosa em recém-nascidos (BRASIL, 2014). Os produtos da RT-PCR das amostras clínicas também

podem ser utilizados no contexto de epidemiologia molecular com a genotipagem viral, que permite comparações entre vírus de diferentes fontes geográficas (VAIRO *et al.*, 2019).

As principais técnicas para pesquisa de anticorpos específicos são o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e o teste imunocromatográfico do tipo POC (*Point-of-care*); elas possibilitam a detecção de anticorpos específicos do tipo IgM e do tipo IgG. A IgM pode ser detectada a partir do segundo dia após o início dos sintomas, entretanto o período mais recomendado para esta análise é a partir do quinto dia; a IgG pode ser detectada a partir do sexto dia (BRASIL, 2017). A vantagem dos testes do tipo POC é que eles dispensam a estrutura laboratorial, equipamentos e refrigeração, podendo ser levados à campo em locais de acesso difícil e fornecerem resultados em dez a 20 minutos (CUNHA E TRINTA, 2019).

Outro teste sorológico é o teste de neutralização por redução de placas (PRNT) que possibilita a dosagem dos títulos de anticorpos séricos requeridos para neutralizar uma quantidade definida de vírus. Um aumento de quatro vezes no título de PRNT em amostras de fase aguda e convalescente indica resultado reagente (BRASIL, 2014). O PRNT é utilizado como padrão ouro para a confirmação do diagnóstico de CHIKF (BRASIL, 2017). Imunofluorescência indireta e inibição de hemaglutinação são técnicas alternativas para a detecção de anticorpos anti-CHIKV (BRASIL, 2014; SILVA *et al.*, 2018).

2.2.5 Manifestações clínicas

O período de incubação da CHIKF no homem não foi estudado detalhadamente, apesar disso, observações relatadas na literatura médica indicam um período de tempo de 1 a 12 dias. Uma grande parcela dos indivíduos acometidos pela doença apresenta sintomas que requerem cuidados médicos e apenas cerca de um terço dos infectados se apresenta assintomático, o que difere da maior parte das outras infecções por arbovírus (THIBERVILLE *et al.*, 2013; BRASIL, 2017).

A CHIKF tem início rápido, em média três dias depois da picada do mosquito infectado, cursando à princípio com febre alta (temperatura superior a 39°C), fadiga profunda, dor de cabeça, exantema maculopapular (restrita a uma única região da pele ou afetando toda a sua extensão), mialgia e poliartralgia intensas (principalmente em grandes articulações, mas também nas pequenas articulações e na coluna vertebral), edema periarticular e artrite aguda, fora dores nas inserções dos ligamentos (WEAVER E LECUIT, 2015). Sintomas atípicos, como manifestações neurológicas e cardíacas graves, e casos de óbitos também foram

descritos nos enfermos, sobretudo em neonatos, indivíduos com idade avançada e com doenças de base (MORRISON, 2014; GOUPIL E MORES, 2016).

A enfermidade aguda pode progredir para as fases pós-aguda e crônica. Após o período de incubação começa a fase aguda ou febril que pode se estender até o 14º dia. Em alguns casos as dores articulares podem persistir para além de 14 dias, levando a uma fase pós-aguda, que pode se estender por 90 dias. Os sintomas podem durar por mais de três meses, quando se instala a fase crônica (BRASIL, 2017).

Lesões de pele são comumente identificadas no estágio agudo da doença; são mais frequentes no tronco, na face e nos membros de mais da metade dos pacientes, podendo perdurar por dois a três dias. O achado dermatológico mais comum é o exantema maculopapular, acompanhado ou não de prurido. Outros tipos de manifestações cutâneas, como dermatite vesiculobolhosa em recém-nascidos, úlceras orais e descamação também foram observadas (CUNHA E TRINTA, 2017).

A febre na infecção aguda por CHIKV é prevalentemente alta, durando até uma semana, algumas vezes apresentando um padrão bifásico, com início repentino seguido de arrefecimento por alguns dias e retornando posteriormente (SILVA E DERMODY, 2017). Poliartralgia é o sintoma de destaque nesta etapa; ela pode vir acompanhada de inchaço articular, que é menos habitual, e se apresenta de forma tipicamente simétrica em pulsos, ombros, joelhos, cotovelos, tornozelos e falanges. Dores nas articulações temporomandibulares e esternocostoclaviculares também foram descritas (THIBERVILLE *et al.*, 2013; AMDEKAR, PARASHAR, ALAGARASU, 2017).

Os pulsos, joelhos, tornozelos e articulações dos dedos são as conexões mais prejudicadas pela artralgia (BURT *et al.*, 2012; MORRISON, 2014). As dores nas articulações, acompanhadas de edema e rigidez matinal grave sinalizam artrite inflamatória (BURT *et al.*, 2017). Outro sintoma importante nesta etapa é a mialgia, que predomina nos braços, antebraços, nas coxas e panturrilhas e pode ser potencialmente incapacitante quando associado à artralgia (CUNHA E TRINTA, 2017).

Os sintomas gastrintestinais são menos frequentes e incluem náusea, vômito, dor abdominal e diarreia (VAIRO *et al.*, 2019). Poucos relatos tratam do acometimento oftálmico, como fotofobia, dor retro orbital e conjuntivite. A uveíte anterior, muitas vezes relacionada a precipitado cerático pigmentado e hipertensão ocular, é especialmente observada (ANDRADE *et al.*, 2017).

A transmissão materno-fetal do CHIKV é rara e pode acontecer quando a mãe está virêmica, tanto no pré-parto quanto durante o parto, independentemente do tipo de parto (normal ou cesariana). A CHIKF neonatal é potencialmente grave ao levar a encefalite, que pode ter repercussões funcionais para o bebê (GÉRARDIN *et al.*, 2008). Os sintomas em neonatos variam de febre, erupção cutânea e edema periférico a convulsões, distúrbios hemodinâmicos, disfunção miocárdica e encefalopatia (VAIRO *et al.*, 2019).

Após a fase aguda uma minoria dos pacientes não volta a apresentar dores no corpo, a maior parte apresenta uma breve melhora e posteriormente têm uma recaída e um número significativo de pacientes continua a ter poliartralgia na mesma intensidade após duas semanas de sintomas (CUNHA E TRINTA, 2017). A fase pós-aguda é caracterizada por uma continuação da artralgia após o quadro inicial, quando pode ser reportada rigidez de membros, sinovite com ou sem derrame, tenossinovite e bursite. Artropatias degenerativas ou traumáticas preexistentes, como osteoartrite e tendinite, podem ser agravadas; síndromes compressivas de nervos e dor neuropática também foram documentadas nesta fase (CUNHA E TRINTA, 2017; VAIRO *et al.*, 2019).

Um conjunto de sintomas reumáticos e musculoesqueléticos observados na fase pós-aguda pode persistir para além de três meses, em alguns pacientes até vários anos após a doença aguda (VAIRO *et al.*, 2019). Pessoas com idade maior que 45 anos, do sexo feminino, com doença articular preexistente e que tiveram maior intensidade dos sintomas no início da CHIKF são mais propensas a cronificação (JAVELLE *et al.*, 2015; BRASIL, 2017; AMARAL *et al.*, 2019). A poliartralgia é recidivante em aproximadamente metade dos pacientes, principalmente nas articulações periféricas, provocando artrite e erosões ósseas. As pessoas afetadas cronicamente pelos sintomas álgicos podem apresentar graves limitações de mobilidade, que resultam em incapacidade para o trabalho e, desta forma, ônus econômico (WEAVER E LECUIT, 2015; BURT *et al.*, 2017; BASTOS; ABREU; SILVA JÚNIOR, 2018).

Dores reumáticas crônicas e disfunções osteoarticulares, englobando poliartrite inespecífica, AR, artrite inflamatória indiferenciada, espondiloartrite soronegativa e artrite psoriática foram fortemente associadas a fase crônica da doença (AMDEKAR, PARASHAR, ALAGARASU, 2017; AMARAL *et al.*, 2019). Sintomas menos frequentes da CHIKF crônica incluem febre, fadiga, dor de cabeça, dor neuropática, disestesia e/ou parestesia, síndromes compressivas, distúrbios digestivos, erupção cutânea, alopecia, prurido, síndrome de Raynaud bilateral, rigidez articular, bursite, tenossinovite e sinovite com ou sem derrame

(THIBERVILLE *et al.*, 2013). Distúrbios do sono, alterações de memória, déficit de atenção, alterações do humor, turvação visual e depressão também foram relatados (BRASIL, 2017).

Complicações nos sistemas cardiovascular, renal, respiratório, gastrointestinal (insuficiência hepática) e, sobretudo, no sistema nervoso, compreendem as principais apresentações atípicas da CHIKF. O envolvimento neurológico é representado por casos de encefalite, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré, entre outras manifestações, relatadas usualmente em pacientes com distúrbios subjacentes, como hipertensão e condições respiratórias ou cardiológicas prévias (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2008).

2.2.6 Tratamento

Não há até o momento nenhuma vacina licenciada ou medicamento antiviral para o CHIKV. O tratamento atualmente preconizado na fase aguda tem como objetivo aliviar os sintomas e dar suporte. Utilizam-se anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), como o paracetamol, para o manejo da dor e da febre, e é recomendada a ingestão de líquidos em abundância. O uso de AINES que interferem com a coagulação sanguínea, como a aspirina, é contraindicado (BRASIL, 2014; SILVA *et al.*, 2018).

Para o tratamento da artralgia nas fases pós-aguda e crônica pode ser empregado um tratamento curto de corticosteroide por via oral ou injetável (intra-articular) ou um AINE tópico. Terapia com metotrexato pode ser avaliada em casos de artrite refratária. Além dos recursos farmacológicos, a fisioterapia se mostra benéfica para casos de dor prolongada e rigidez articular (BRASIL, 2014).

As principais moléculas anti-CHIKV em investigação são os inibidores da entrada do vírus (cloroquina), inibidores da síntese protéica viral (RNAs de interferência direcionados aos genes de CHIKV, harringtonina), inibidores da proteína não-estrutural 2 do CHIKV, inibidores da replicação do genoma viral (ribavirina, favipiravir) e anticorpos monoclonais (ABDELNABI; NEYTS; DELANG; 2015).

2.2.7 Justificativa e relevância

Sabendo do problema de deficiência no saneamento básico (desabastecimento de água e grandes depósitos de lixo) somado a desinformação da população sobre a CHIKF, e por ser de

elevada morbidade, gerando gastos com diagnóstico, tratamento e reabilitação, é preciso que ela seja melhor estudada.

Surtos de CHIKF vêm ocorrendo em várias partes do território brasileiro nos últimos anos, tendo a incidência da última se destacado na região Nordeste, mais especificamente no estado do Ceará. Em 2017, o Nordeste concentrou o maior número de casos prováveis de CHIKF em relação ao total de notificações do Brasil e o Ceará foi a unidade federativa com o maior número de confirmações da doença, sendo Fortaleza a cidade com o maior número de registros do país; o estado também registrou um expressivo número de óbitos decorrentes da doença. Além disso, a grande epidemia de CHIKF que se instalou no Ceará naquele ano atingiu uma população que não teve contato com o CHIKV anteriormente (imunologicamente virgem). Diante do exposto, é essencial entender como o CHIKV se comporta no cenário de epidemia em diferentes populações, a fim de pensar em melhores estratégias para o controle da disseminação da doença.

Um grupo das pessoas infectadas pelo CHIKV desenvolve artrite recorrente, a qual pode levar a uma acentuada restrição dos movimentos, trazendo redução da capacidade laboral e impacto na sua qualidade de vida. Dado que os complexos mecanismos imunes envolvidos na gênese e no controle dos sintomas são pobremente compreendidos, se fazem necessárias maiores investigações sobre a resposta imune ao vírus, para o esclarecimento de mecanismos patológicos e protetores, especialmente dos danos articulares e ósseos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil soropidemiológico de pacientes com CHIKF, avaliar nestes a resposta de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em diferentes fases de progressão da doença.

4.2 Objetivos específicos

- Descrever as variáveis sociodemográficas dos participantes;
- Relacionar as variáveis sociodemográficas com as diferentes fases clínicas da doença;
- Caracterizar o perfil sorológico de IgM e IgG anti-CHIKV nas diferentes fases clínicas da doença e de acordo com as variáveis sociodemográficas;
- Investigar a presença de codetecção de anticorpos IgM anti-CHIKV e anti-DENV na população de estudo;
- Estabelecer relação entre os níveis de citocinas nas diferentes fases da doença;
- Estabelecer relação entre os níveis de citocinas nos diferentes grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV.
- Determinar as razões das diferentes citocinas proinflamatórias pela citocina anti-inflamatória nas diferentes fases da doença.
- Determinar as razões das diferentes citocinas proinflamatórias pela citocina anti-inflamatória nos diferentes grupos de soropositividade.

5 METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo e transversal, com coleta de informações sociodemográficas e análise de amostras de soro de pacientes que foram acometidos por CHIKF em 2017 no Ceará.

5.2 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob o parecer de nº 2.257.029 e Certificado de Apresentação para Apreciação Ética nº 69347717.6.0000.5054, seguindo as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa em Seres Humanos estabelecidas na Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

5.3 Sujeitos

Foram incluídos nesta pesquisa sujeitos de ambos os sexos, com idade ≥ 18 anos, provenientes de unidades de saúde pública de várias cidades do Ceará, que tiveram amostras de soro encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará (LACEN-CE) no ano de 2017 com a finalidade de realização de exame sorológico para diagnóstico de CHIKF. Foram excluídos os sujeitos com idade < 18 anos, com resultado de sorologia para CHIKV não reagente ou não condizente com os dias de sintomas relatados (IgG não reagente em participantes com mais de 90 dias de sintomas). Amostras com resultado de sorologia indeterminado não foram consideradas para as análises dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV. Amostras com material biológico insuficiente para a realização das análises não foram testadas. A gravidade dos sintomas da CHIKF não foi avaliada neste trabalho, uma vez que não tivemos acesso aos dados clínicos dos participantes.

5.4 Processamento das amostras e delineamento experimental

As sorologias para IgM e IgG anti-CHIKV e anti-DENV foram executadas no setor de virologia do LACEN-CE através da técnica de ELISA e o restante do material foi armazenado em soroteca sob refrigeração de -80°C. As amostras foram escolhidas por estarem mais acessíveis e não por meio de critério estatístico (amostragem por conveniência).

A fonte das informações sociodemográficas dos participantes foi o Sistema Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL) utilizado pelo LACEN-CE; as variáveis sexo, idade e naturalidade foram consideradas. Segundo Brasil (2017), a fase aguda da CHIKF vai até 14 dias de sintomas, a fase pós-aguda de 15 a 90 dias e a fase crônica quando há mais de 90 dias. Diante disso, os pacientes foram classificados quanto a fase da doença com base no número de dias de sintomas relatados, cuja obtenção se deu pela subtração da data de início dos sintomas relatada da data de coleta do material biológico; informações que também foram consultadas no GAL.

As amostras foram transportadas sob refrigeração do LACEN-CE para o Laboratório de Imunologia (LABIM), no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE) da UFC. No LABIM e no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LIMCEMO), do mesmo departamento, foram quantificadas as moléculas IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 nas amostras por meio do método de ELISA.

Os resultados de sorologia para CHIKV e para DENV, os dados sociodemográficos e as concentrações das moléculas de interesse foram organizados em uma tabela criada no programa Microsoft® Excel 2016 para posteriores análises descritivas e estatísticas. Foram atribuídos códigos exclusivos para as amostras incluídas nesta pesquisa.

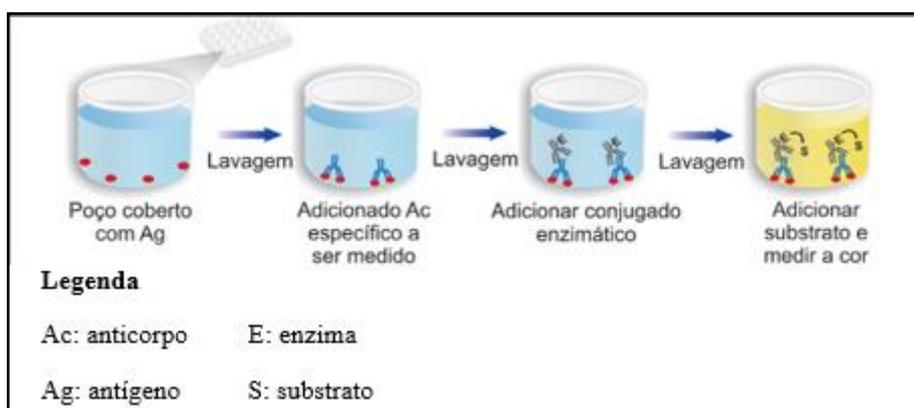
5.5 ELISA

O teste de ELISA se fundamenta em reações antígeno-anticorpo identificáveis mediante reações enzimáticas (teste imunoenzimático). A enzima mais habitualmente utilizada neste ensaio é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2).

5.5.1 Sorologia

Tratam-se de testes de ELISA indireto, onde o antígeno purificado é ligado aos poços da microplaca de poliestireno (fase sólida) durante a fabricação do kit. Ao ser adicionada a amostra de soro do paciente, se esta for positiva, anticorpos específicos (IgM ou IgG) se ligam aos antígenos da fase sólida. Na etapa seguinte, é acrescentado um segundo anticorpo (anti-IgM ou anti-IgG humano) ligado à peroxidase (conjugado enzimático), dirigido contra os anticorpos da espécie. A adição do substrato H_2O_2 e do cromógeno solúvel 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) vai permitir o desenvolvimento de cor. O H_2O_2 é clivado pela peroxidase e gera um intermediário que oxida o TMB e origina um composto azul. A solução de parada, ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 M, é adicionada após um tempo para que a enzima perca a sua atividade e então o composto azul se torna amarelo. A intensidade da cor é proporcional a concentração de anticorpos na amostra (Figura 9).

Figura 9 – ELISA indireto.



Fonte: Adaptado de Voltarelli *et al.* (2008).

Na sorologia para CHIKV foram utilizados os kits ELISA anti-CHIKV (IgM) e ELISA anti-CHIKV (IgG) e na sorologia para dengue foram utilizados os kits ELISA anti-DENV (IgM) e ELISA anti-DENV (IgG) (Euroimmun®, Seekamp, Lubeque, Alemanha). Foram seguidas as recomendações individuais de cada kit.

Os resultados foram expressos como razões, obtidas pela divisão da absorbância da amostra pela absorbância de um calibrador. Resultados $<0,8$ foram consideradas negativos, resultados $\geq 0,8$ a $<1,1$ foram considerados indeterminados e resultados $\geq 1,1$ foram considerados positivos.

5.5.2 Quantificação das citocinas nas amostras

A quantificação consiste em um teste de ELISA sanduíche, onde o antígeno de interesse fica entre dois anticorpos, o anticorpo de captura ligado ao fundo do poço da microplaca e o anticorpo de detecção associado à biotina (anticorpo biotilado). A enzima peroxidase é associada à estreptavidina ou à avidina (kit de IL-17A) e, por estes possuírem alta afinidade pela biotina, se ligam ao anticorpo biotilado e formam um conjugado enzimático. A adição do substrato H_2O_2 e do TMB ou do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) – ABTS (kit de IL-17A) vai permitir o desenvolvimento de cor. O H_2O_2 é clivado pela peroxidase e gera um intermediário que oxida o cromógeno ABTS e origina um composto azul ou azul esverdeado. A solução de parada (H_2SO_4 2,5N) é adicionada após um tempo para que a enzima perca a sua atividade e então o composto azul se torna amarelo (exceção do kit de IL-17A). A intensidade da cor é proporcional a concentração de antígeno na amostra (Figura 10).

Figura 10 – ELISA sanduíche.



Fonte: Adaptado de Voltarelli *et al.* (2008).

Para a quantificação da IL-1 β e da IL-2 nas amostras de soro foram utilizados os kits *BD OptEIA™ Human ELISA IL-1 β Set II* e *BD OptEIA™ Human ELISA IL-2* (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Califórnia, Estados Unidos), respectivamente. Para a dosagem de IL-17A e da MCP-1 nas amostras foram usados o *Human IL-17A Standard ABTS ELISA Development Kit* e o *Human MCP-1 (CCL2) Standard TMB ELISA Development Kit* (PeproTech®, Rocky Hill, Nova Jersey, Estados Unidos). Para a determinação de TGF- β 1 foi utilizado o kit *Human TGF- β CytoSet™* (Ivotrogen, Frederick, Maryland, Estados Unidos). Foram seguidas as recomendações individuais de cada kit.

5.6 Análises descritivas e estatísticas dos dados

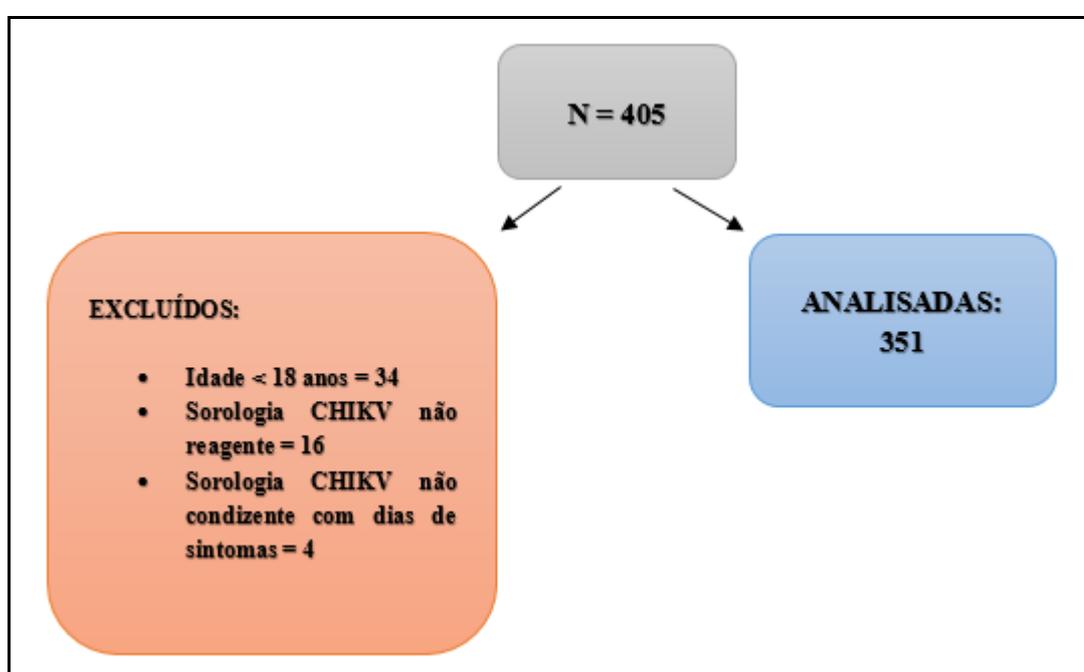
Para a realização dos testes descritivos e estatísticos, todos os dados foram analisados e modelados por intermédio do programa Stata® 15. Os resultados de sorologia para CHIKV foram expressos em mediana. As concentrações de citocinas foram calculadas por meio da relação entre as absorbâncias das amostras e as absorbâncias da curva padrão, utilizando o modelo logístico de 5 partes (5PL) no programa ELISA Analysis. Posteriormente, foi estabelecido um ponto de corte baseado no limite mínimo de detecção (LLOD) para cada molécula a fim de gerar variáveis binárias.

Devido as variáveis contínuas não seguirem distribuição normal, testes não-paramétricos foram empregados: Teste de *Mann-Whitney* (para comparações de variáveis binárias com 1 grau de liberdade), Teste de *Kruskal–Wallis* (para comparações com variáveis categóricas com 2 ou mais graus de liberdade) e teste qui-quadrado de Pearson. 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.

6 RESULTADOS

Inicialmente, foram selecionadas 405 amostras para a pesquisa e destas, 54 foram excluídas: 34 sujeitos com idade menor que 18 anos, 16 sujeitos com sorologia para CHIKV não reagente, quatro sujeitos com resultado de sorologia para CHIKV não condizente com os dias de sintomas relatados (IgG não reagente em participantes com mais de 90 dias de sintomas), restando 351 amostras que foram analisadas (Figura 11).

Figura 11 – Fluxo das amostras selecionadas para a pesquisa.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

6.1 Características sociodemográficos da população do estudo

Dos 351 indivíduos incluídos na pesquisa, 193 (54,99%) eram naturais de Fortaleza e 158 (45,01%) nasceram em outros 40 municípios do estado do Ceará. Em relação ao sexo, 21,08% (74/351) eram do sexo masculino e 78,92% (277/351) eram do sexo feminino. As idades dos participantes variaram de 18,16 a 85,96 anos, com mediana de 51,73; no que se refere à faixa etária destes, 69,05% (152/351) se encontravam no intervalo entre 18 a 59,9 anos (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização das variáveis sociodemográficas de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

VARIÁVEL	OPÇÕES	FREQUÊNCIA	%
NATURALIDADE	Fortaleza	193	54,99
	Outros municípios (40)	158	45,01
SEXO	Masculino	74	21,08
	Feminino	277	78,92
FAIXA ETÁRIA	18 a 29,9	36	10,32
	30 a 39,9	58	16,62
	40 a 49,9	63	18,05
	50 a 59,9	85	24,36
	60 a 69,9	67	19,20
	70 a 79,9	31	8,88
	>80	9	2,57
TOTAL		367	100,00

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2 Caracterização das diferentes formas clínicas de progressão da doença

Dos indivíduos incluídos no estudo, 28,49% (100/351) estavam na fase aguda, 50,71% (178/351) estavam na fase pós-aguda e 20,80% (73/351) estavam na fase crônica (Tabela 2).

Tabela 2 – Fases da doença em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

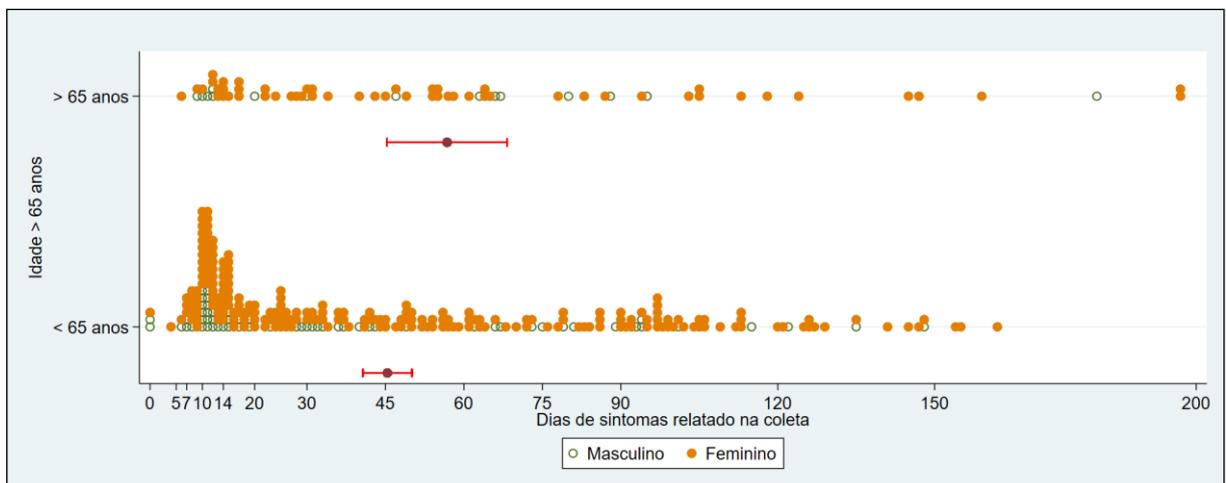
FASE	DIAS DE SINTOMAS	FREQUÊNCIA	%
AGUDA	1 – 14	100	28,49
PÓS-AGUDA	15 – 90	178	50,71
CRÔNICA	> 90	73	20,80
TOTAL		351	100

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pessoas com idade acima da mediana de idade (51,73) estavam 23,56% (41/174) na fase aguda, 51,15% (89/174) na fase pós-aguda e 25,29% (44/174) na fase crônica; portanto mais frequentes nas duas últimas fases da doença (Teste qui-quadrado de *Pearson* = 6,80, $p = 0,033$).

Ao relacionar a idade com os dias de sintomas relatados, foi observado que as pessoas com mais de 65 anos tenderam a ter maior tempo de duração dos sintomas do que as pessoas com menos de 65 anos, mas sem diferença significativa (Teste de *Mann-Whitney*, $p = 0,0548$, $z = -1,921$) (Gráfico 2).

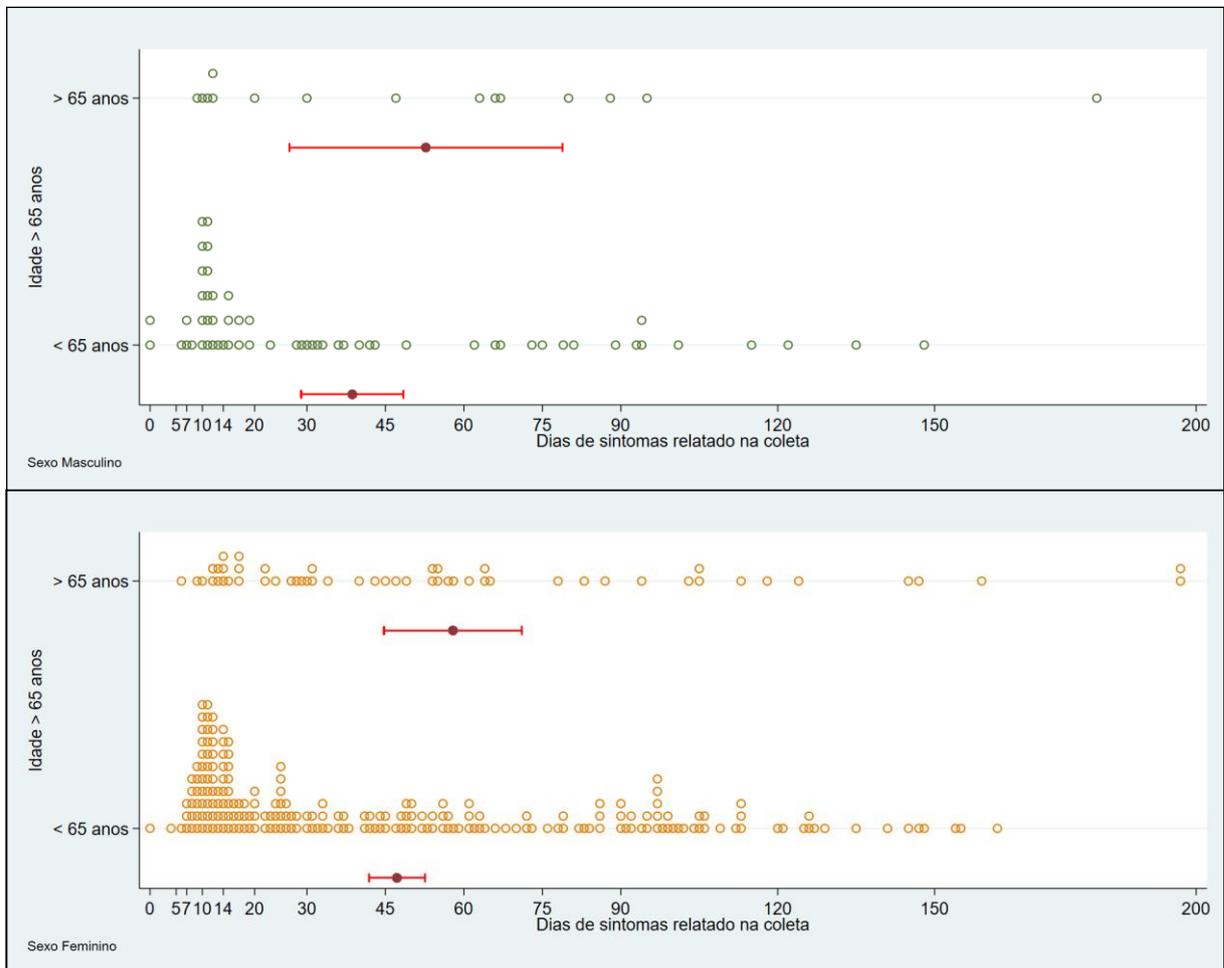
Gráfico 2 – Relação da idade (maiores e menores de 65 anos) com os dias de sintomas relatados de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: próprio autor. Teste de *Mann-Whitney*: idade > e < 65 anos em relação aos dias de sintomas relatados, $p = 0,0548$, $z = -1,921$.

As pessoas do sexo feminino apresentaram maior tempo de duração dos sintomas do que as pessoas do sexo masculino (Teste de *Mann-Whitney*: $p = 0,0321$ e $z = -2,154$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Relação da idade (maiores e menores de 65 anos) com os dias de sintomas por sexo de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: próprio autor. Teste de *Mann-Whitney*: idade em relação aos dias de sintomas relatados por sexo, $p=0,0321$ e $z = -2,154$.

6.3 Caracterização sorológica de anticorpos anti-CHIKV na população de estudo

Os resultados de sorologia das amostras incluídas na pesquisa foram divididos nos seguintes grupos: IgM+ IgG- anti-CHIKV, IgM+ IgG+ anti-CHIKV, IgM- IgG+ anti-CHIKV e IgM+ IgG IND anti-CHIKV, sendo que este último não foi considerado nas análises dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV (Tabela 3).

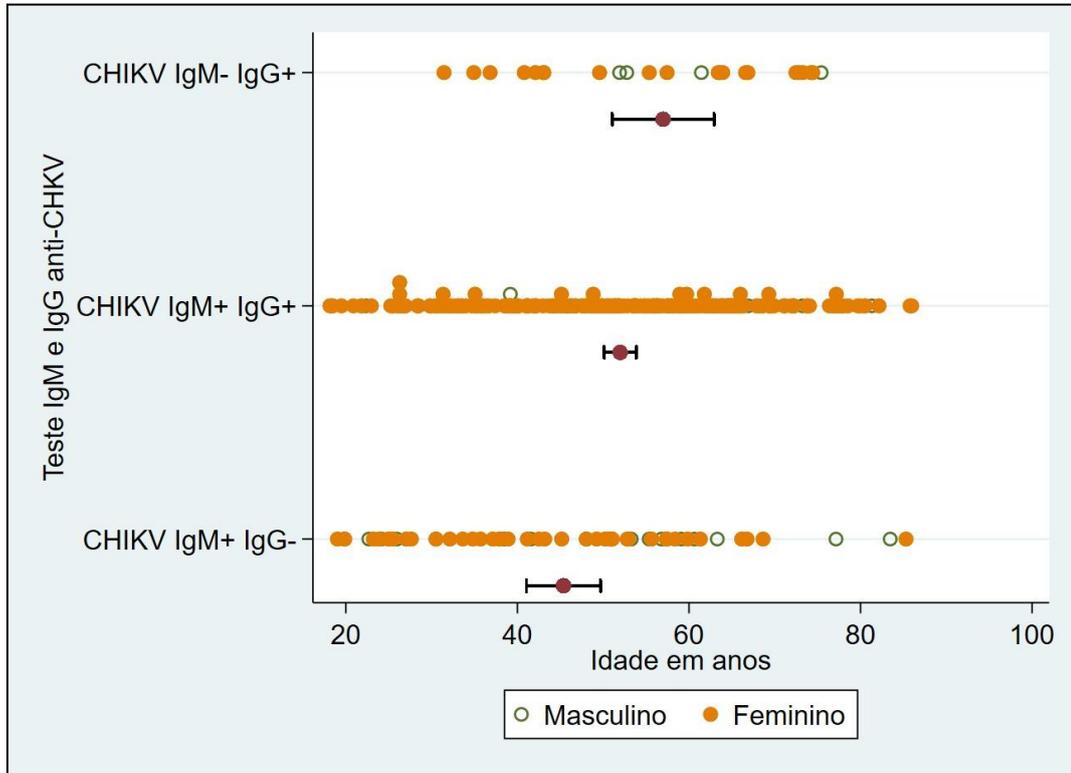
Tabela 3 – Grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV
Em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

GRUPO	FREQUÊNCIA	%
IgM+ IgG- ANTI-CHIKV	58	16,52
IgM+ IgG+ ANTI-CHIKV	264	75,21
IgM- IgG+ ANTI-CHIKV	24	6,84
IgM+ IgG IND ANTI-CHIKV	5	1,43
TOTAL	351	100

Fonte: Elaborado pelo autor. (+) reagente, (-) não-reagente e (IND) indeterminado.

Foram obtidas as seguintes medianas das idades por grupo de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV: IgM+ IgG- anti-CHIKV (mediana: 48,02), IgM+ IgG+ anti-CHIKV (mediana: 53,44) e IgM- IgG+ anti-CHIKV (mediana: 59,45). Em todos os grupos foi visto predomínio do sexo feminino (Gráfico 4).

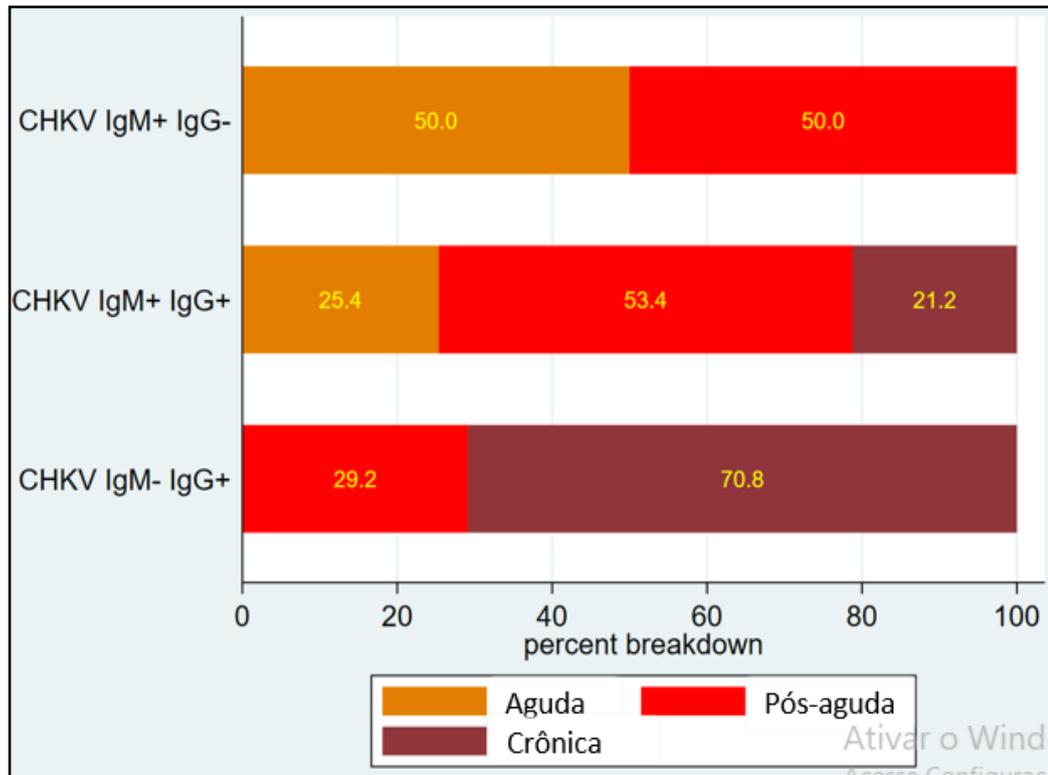
Gráfico 4 – Relação dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV com a idade em anos de 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. (+) reagente, (-) não-reagente.

Das pessoas que apresentaram IgM+ IgG- anti-CHIKV, 50,00% (29/58) estavam na fase aguda e as outras 50,00% (29/58) pessoas estavam na fase pós-aguda; das pessoas que tiveram IgM+ IgG+ anti-CHIKV, 53,41% (141/264) estavam na fase pós-aguda, 25,38% (64/264) estavam na fase aguda e 21,21% (56/264) estavam na fase crônica; das pessoas com IgM- IgG+ anti-CHIKV, 70,83% (17/24) estavam na fase crônica e as 29,17% (7/24) restantes estavam na fase pós-aguda (Gráfico 5).

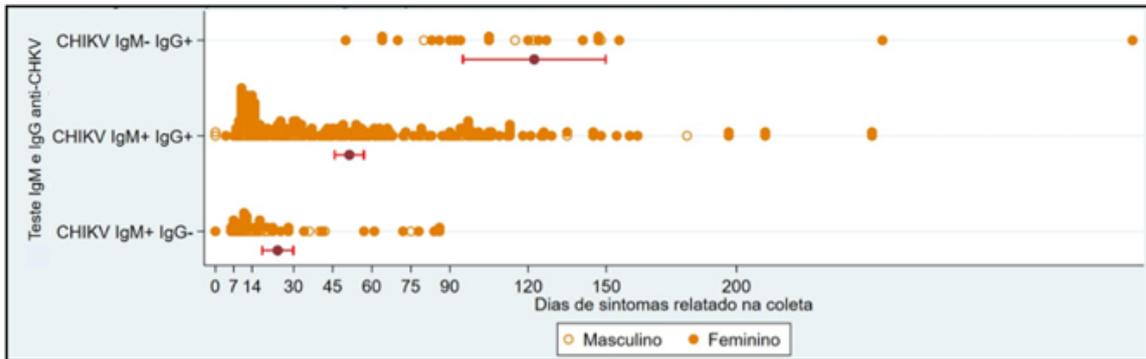
Gráfico 5 – Relação dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV com as fases da doença em 346 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. (+) reagente, (-) não-reagente.

Foram obtidas as seguintes medianas de dias de sintomas relatados por grupo: IgM+ IgG- (mediana: 14,50), IgM+ IgG+ (mediana: 33,00) e IgM- IgG+ (mediana: 110). Foi identificada a presença de IgM em participantes com mais de 90 dias do início dos sintomas (56/73) (Gráfico 6).

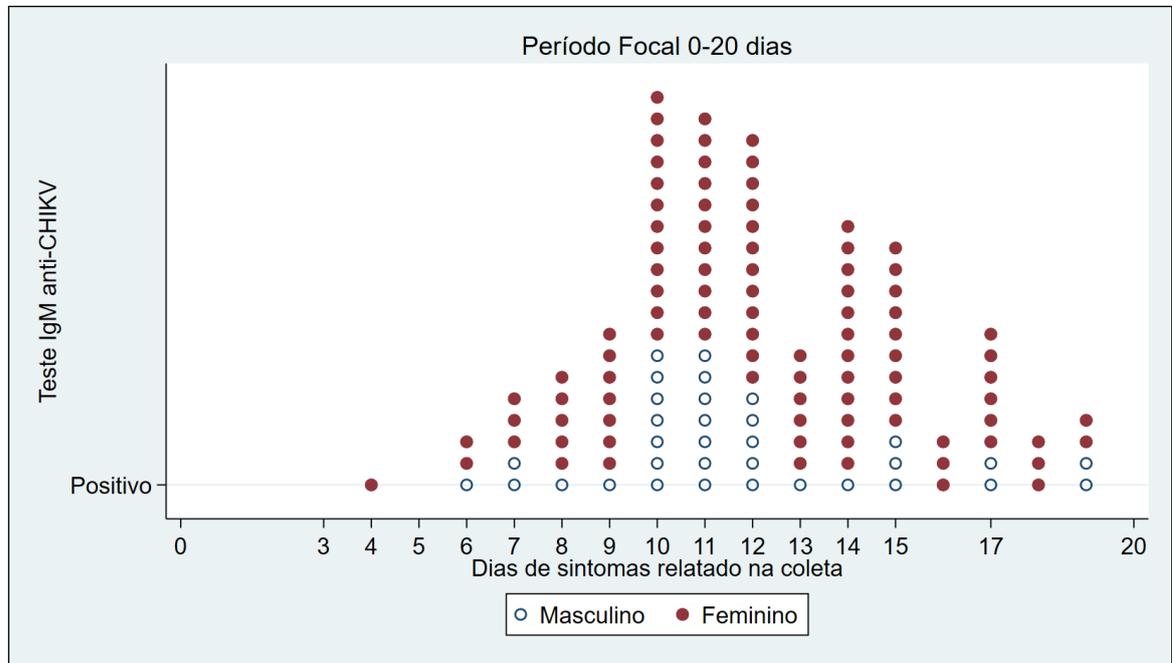
Gráfico 6 – Relação dos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV com os dias de sintomas relatados em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. (+) reagente, (-) não-reagente e (IND) indeterminado.

Dentre os participantes reagentes para IgM anti-CHIKV, o registro de quatro dias de sintomas relatados foi o mínimo e em relação a este resultado também foi visto que a maior proporção de detecção foi observada em pacientes com dez a 12 dias de sintomas (Gráfico 7).

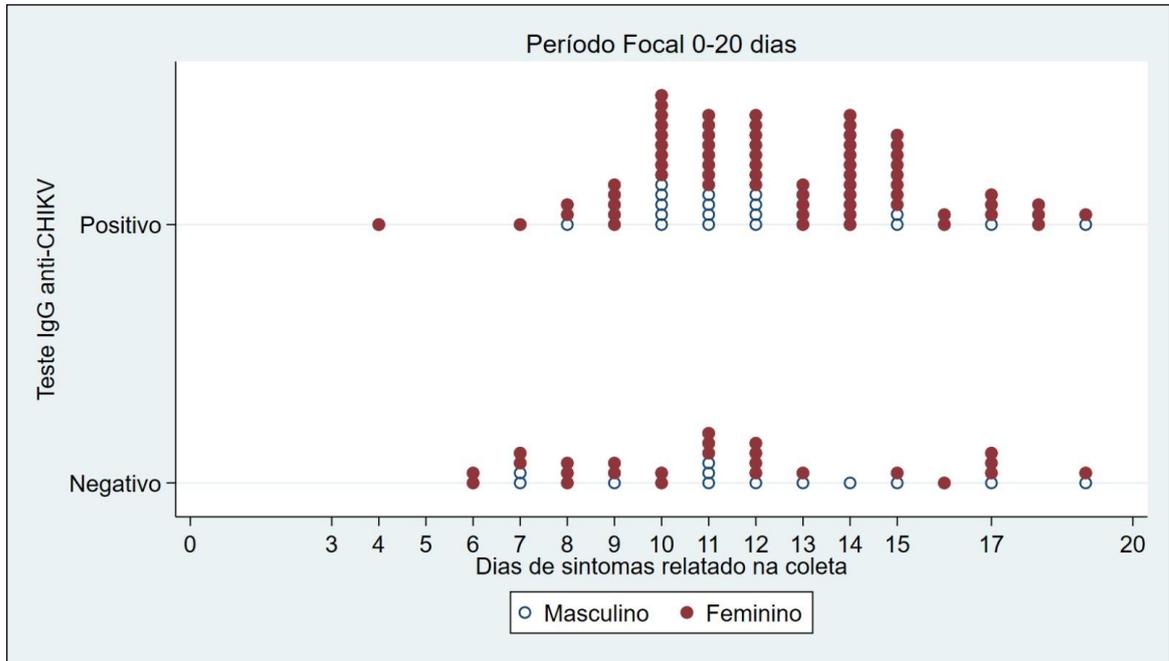
Gráfico 7 - Detecção de IgM anti-CHIKV pelos dias de sintomas relatados em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Mann-Whitney*: IgM+ anti-CHIKV pelos dias de sintomas relatados, $p < 0,0001$, $z = 6.286$.

Nos participantes reagentes para IgG anti-CHIKV o registro de quatro dias de sintomas relatados foi o mínimo e em relação a este resultado também foi visto que a maior proporção de detecção foi vista em pacientes com dez a 15 dias de sintomas (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Detecção de IgG anti-CHIKV e os dias de sintomas relatados em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Mann-Whitney*: IgG (+) anti-CHIKV, IgG (-) anti-CHIKV pelos dias de sintomas relatados, $p = 0,0000$, $z = -5,574$.

A codetecção de IgM anti-CHIKV/IgM anti-DENV foi encontrada em 28/351 (7,98%) das amostras analisadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Codetecção de IgM anti-CHIKV/IgM anti-DENV.

DETECÇÃO	FREQUÊNCIA	%
IgM ANTI-CHIKV/IgM ANTI-DENV	28/351	7,98

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6.4 Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1

As concentrações de IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 foram determinadas nas amostras de soro. Os resultados foram categorizados de acordo com a mediana obtida para cada molécula: IL-1 β (< ou \geq 4,15 pg/ml), IL-2 (< ou \geq 10,78 pg/ml), IL-17A (< ou \geq 2,15 pg/ml), MCP-1 (< ou \geq 210,64 pg/ml) e TGF- β 1 (< ou \geq 845,10) (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentrações mínimas, máximas e medianas em pg/ml das moléculas IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 em 351 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

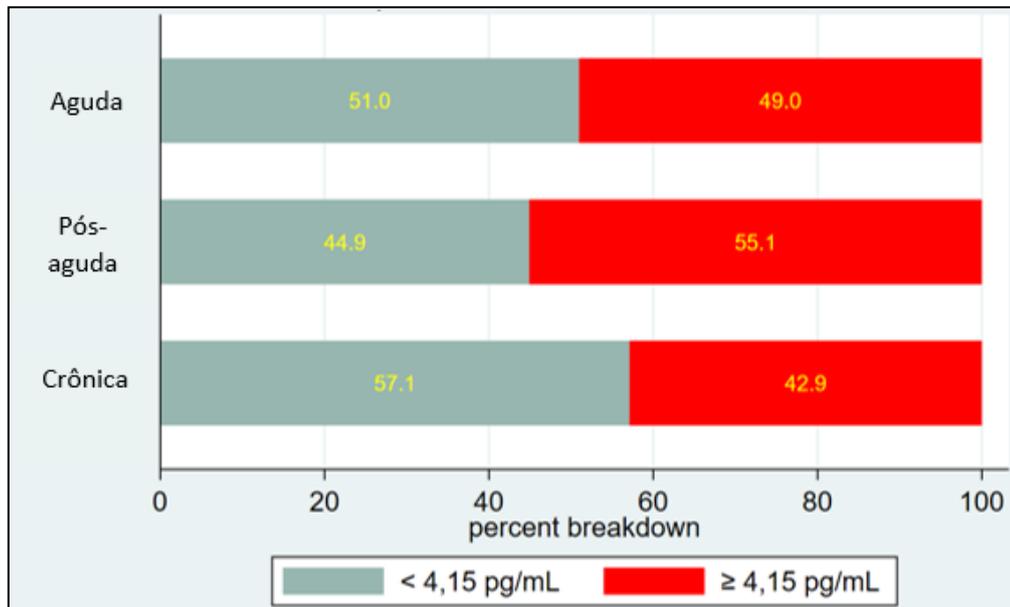
MOLÉCULA	MEDIANA (pg/ml)	MÍNIMO (pg/ml)	MÁXIMO (pg/ml)
IL-1β	4,15	0	630,53
IL-2	10,78	0	284,83
IL-17A	2,35	0	520,66
MCP-1	210,64	0	1.496,60
TGF-β1	845,10	0	6.000,00

Fonte: Elaborado pelo autor

6.4.1 Quantificação dos níveis de IL-1 β

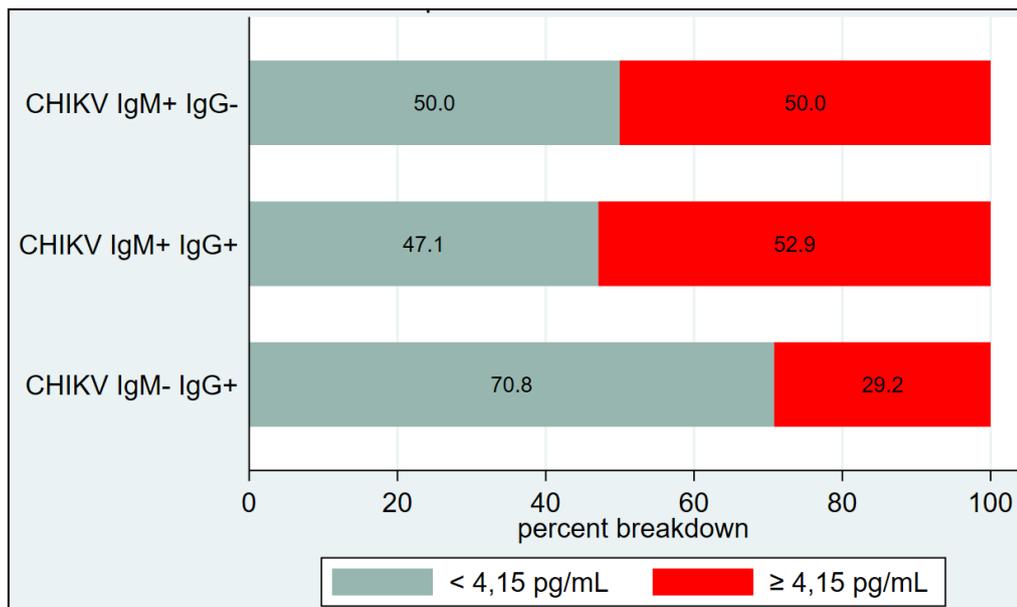
Não foi verificada diferença significativa nas concentrações da IL-1 β nas diferentes fases da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,1739$) (Gráfico 9). Não houve diferença significativa nas concentrações de IL-1 β nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,1895$) (Gráfico 10).

Gráfico 9 – Comparação das concentrações de IL-1 β nas fases da doença em 348 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de IL-1 β nas fases da doença, $p = 0,1739$.

Gráfico 10 – Comparação das concentrações de IL-1 β nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 343 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

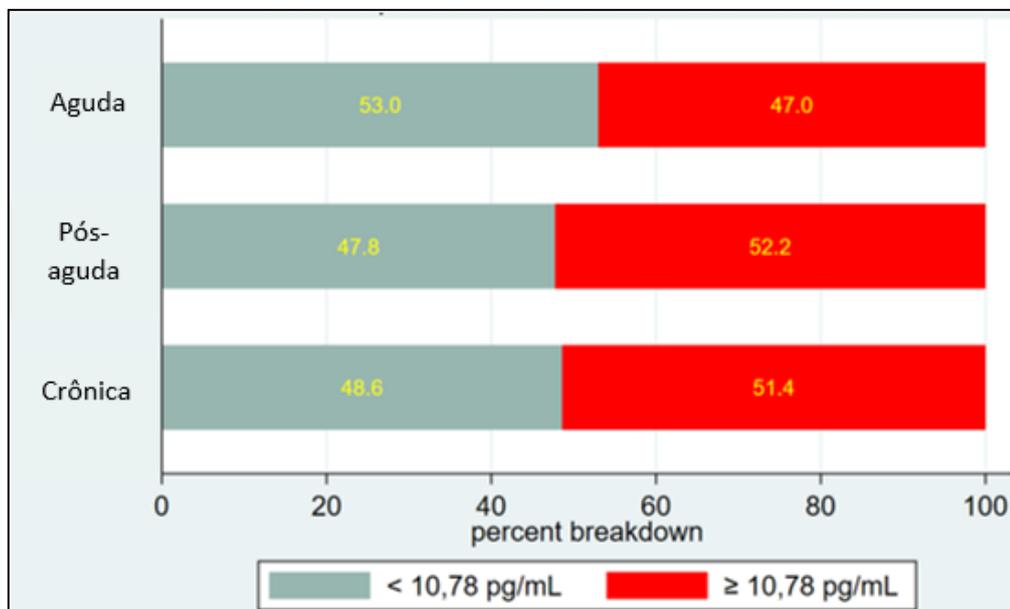


Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de IL-1 β nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,1895$.

6.4.2 Quantificação dos níveis de IL-2

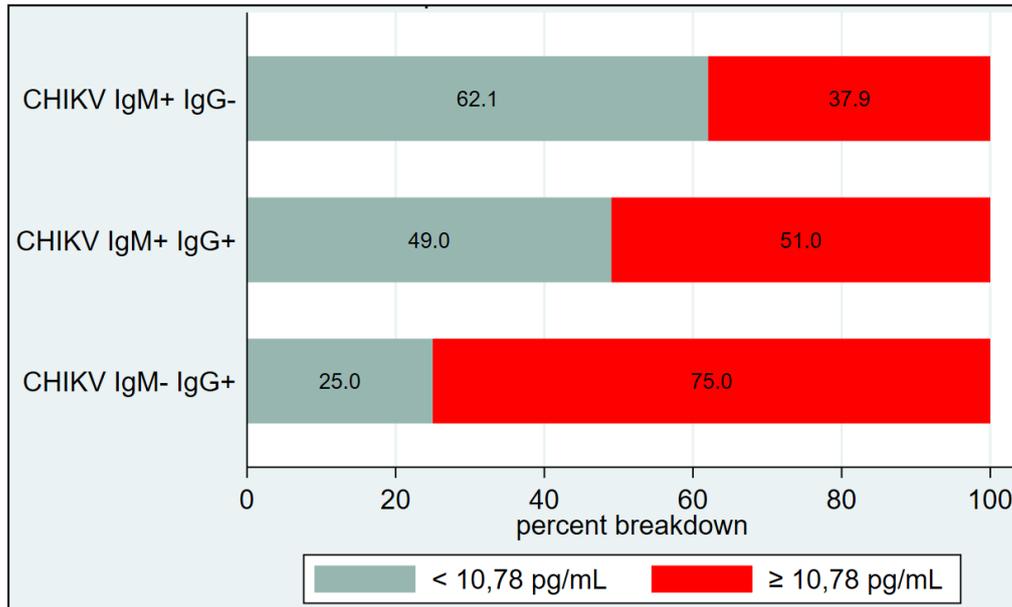
Não foi verificada diferença significativa nas concentrações de IL-2 nas fases da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,6589$) (Gráfico 11). Os sujeitos com IgM- IgG+ anti-CHIKV possuíam níveis mais altos desta citocina quando comparados a sujeitos nos demais grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,0317$) (Gráfico 12).

Gráfico 11 – Comparação das concentrações de IL-2 nas fases da doença em 350 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal - Wallis*: concentrações de IL-2 nas fases da doença, $p = 0,6589$.

Gráfico 12 – Comparação das concentrações de IL-2 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 345 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

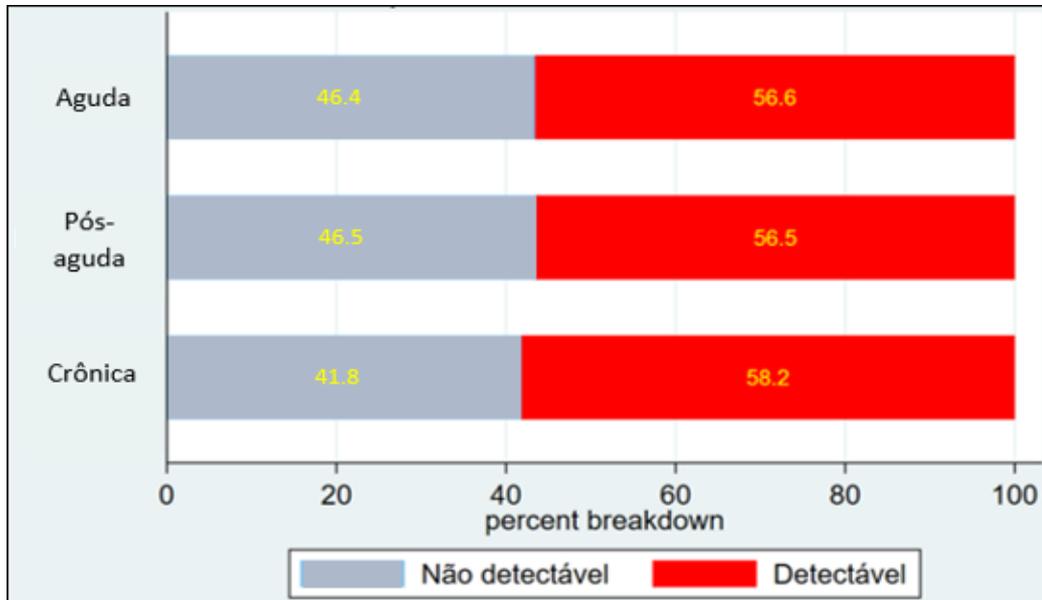


Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal - Wallis*: concentrações de IL-2 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,0317$.

6.4.3 Quantificação dos níveis de IL-17A

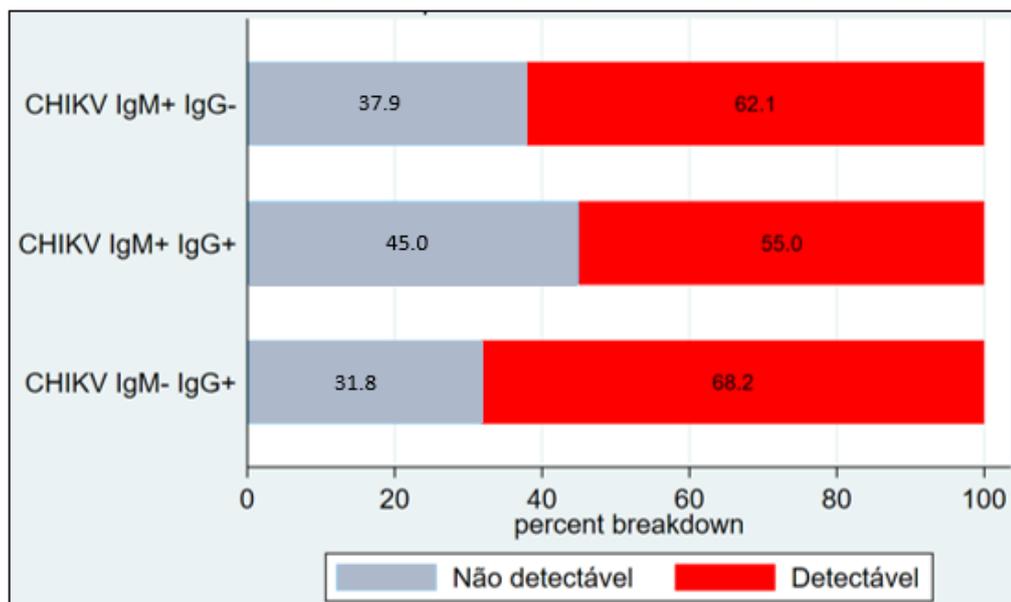
Não foi verificada diferença significativa nas concentrações da IL-17A nas fases da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,8933$) (Gráfico 13). Os sujeitos com IgM+ IgG- e com IgM- IgG+ anti-CHIKV possuíam níveis mais elevados desta citocina quando comparados aqueles com IgM+ IgG+, mas sem diferença significativa (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,1257$) (Gráfico 14).

Gráfico 13 – Comparação das concentrações de IL-17A nas fases da doença em 336 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de IL-17A nas fases da doença, $p = 0,8933$.

Gráfico 14 – Comparação das concentrações de IL-17A nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 331 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

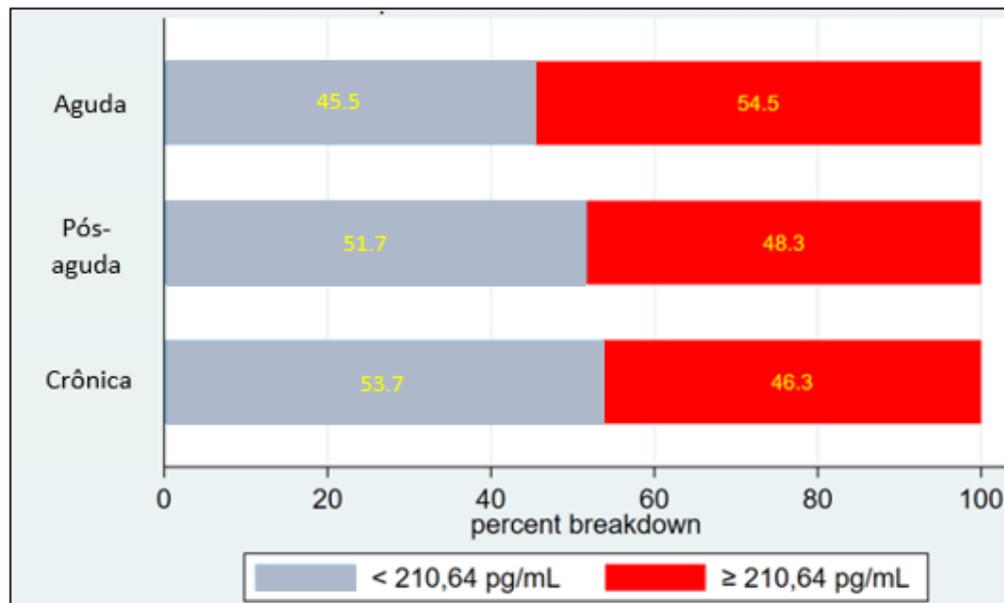


Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de IL-17A nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,1257$.

6.4.4 Quantificação dos níveis de MCP-1

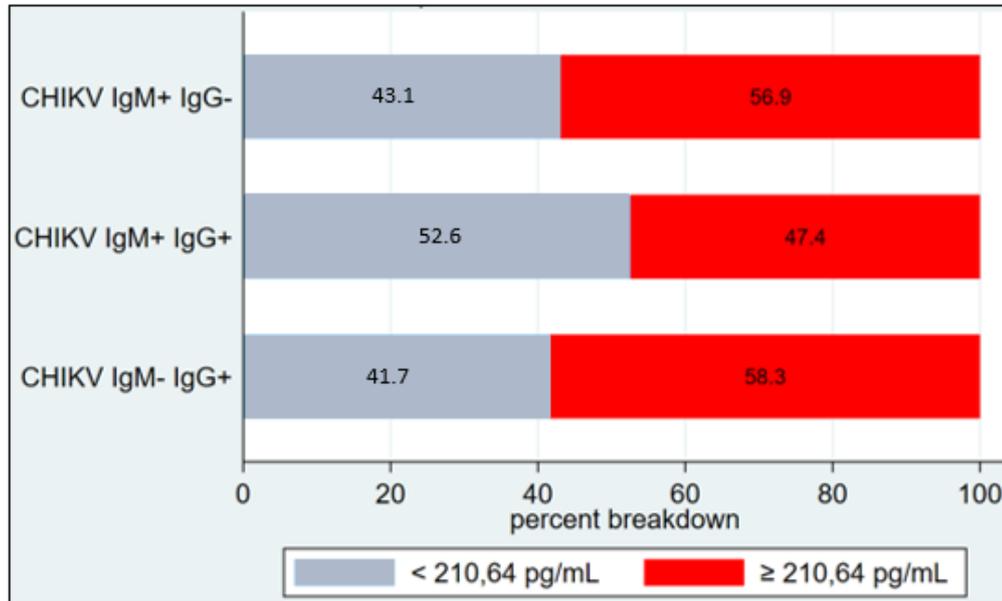
Não foi verificada diferença significativa nas concentrações de MCP-1 nas fases da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,2597$) (Gráfico 15). Os sujeitos com IgM+ IgG- e com IgM- IgG+ anti-CHIKV possuíam níveis mais elevados desta quimiocina quando comparados aqueles com IgM+ IgG+, mas sem diferença significativa (Teste de *Kruskal-Wallis*, $p = 0,0611$) (Gráfico 16).

Gráfico 15 – Comparação das concentrações de MCP-1 nas fases da doença em 338 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de MCP-1 nas fases da doença, $p = 0,2597$.

Gráfico 16 - Comparação das concentrações de MCP-1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 333 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

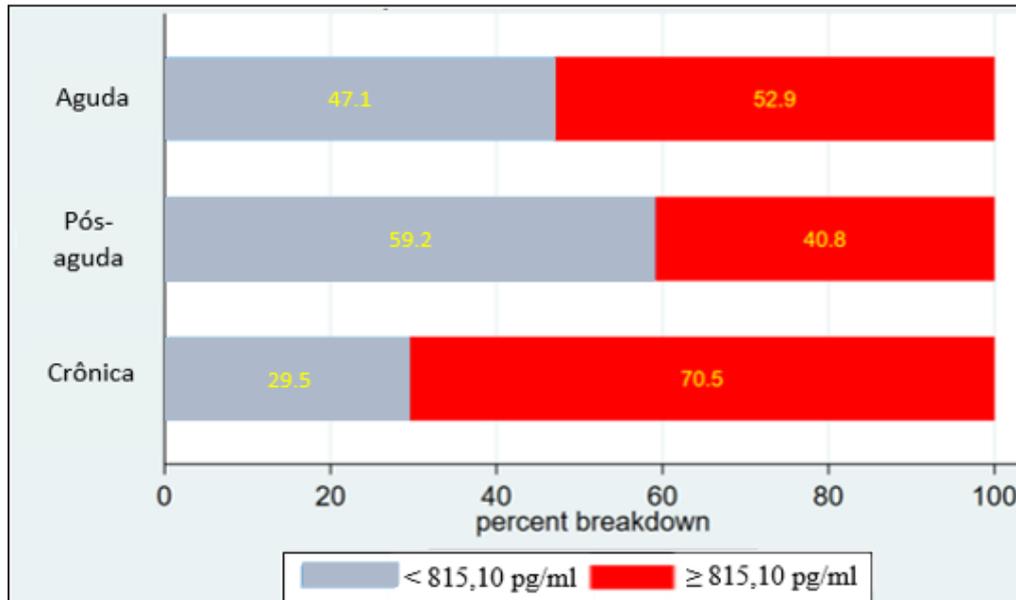


Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de MCP-1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,0611$.

6.4.5 Quantificação dos níveis de $TGF-\beta 1$

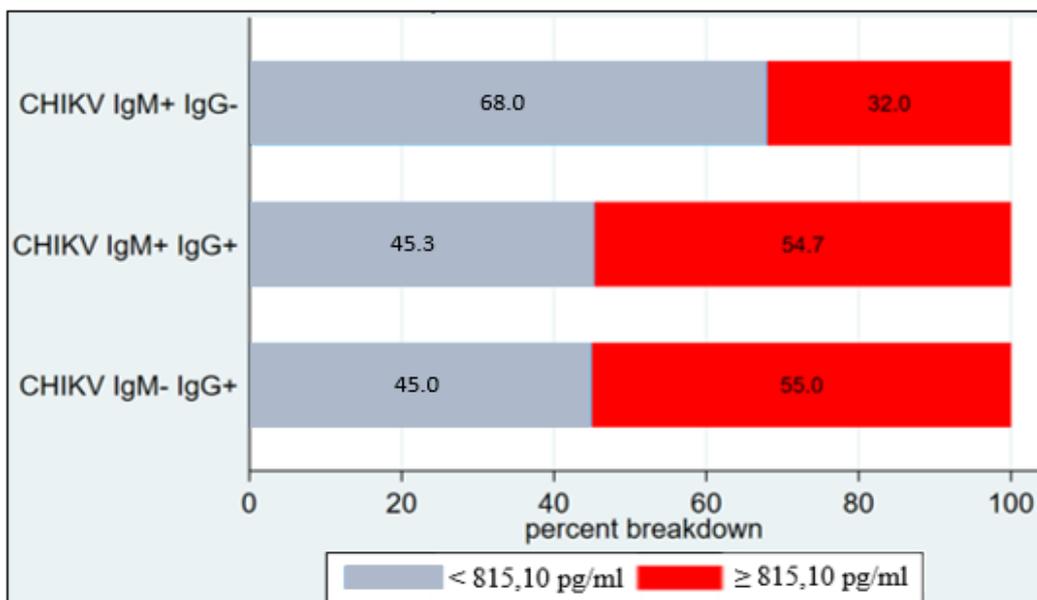
Os sujeitos na fase crônica possuíam níveis mais elevados desta citocina quando comparados aqueles nas outras fases da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,0046$) (Gráfico 17). Os sujeitos com IgM+ IgG+ e com IgM- IgG+ anti-CHIKV possuíam níveis mais elevados desta citocina quando comparados aqueles com IgM+ IgG- (Teste de *Kruskal-Wallis*, $p = 0,0121$) (Gráfico 18).

Gráfico 17 – Comparação das concentrações de TGF- β 1 nas fases da doença em 232 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de TGF- β 1 nas fases da doença, $p = 0,0046$.

Gráfico 18 – Comparação das concentrações de TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV de 231 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: concentrações de TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,0121$.

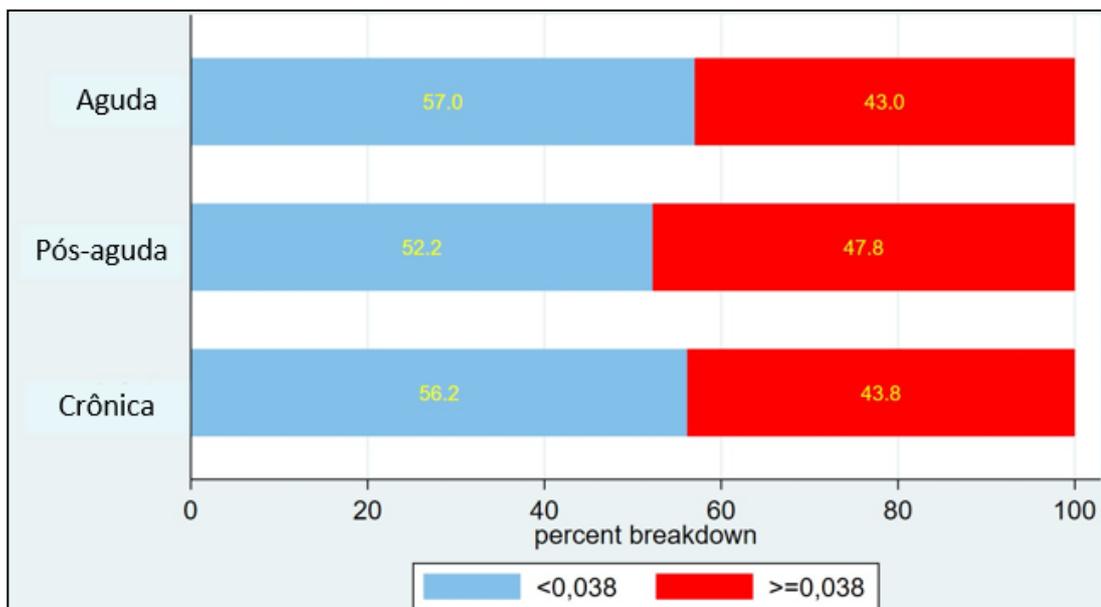
6.5 Razões entre as citocinas IL-1 β , IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1

Foram determinadas as razões entre as citocinas proinflamatórias e a citocina anti-inflamatória investigada. Estas razões foram relacionadas as fases da doença e aos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV. Os resultados foram inseridos em categorias de acordo com a mediana das razões: IL-1 β /TGF- β 1 (< ou \geq 0,038), IL-17A/TGF- β 1 (< ou \geq 0,005) e MCP-1/TGF- β 1 (< ou \geq 0,264).

6.5.1 Razões entre as citocinas IL-1 β e TGF- β 1

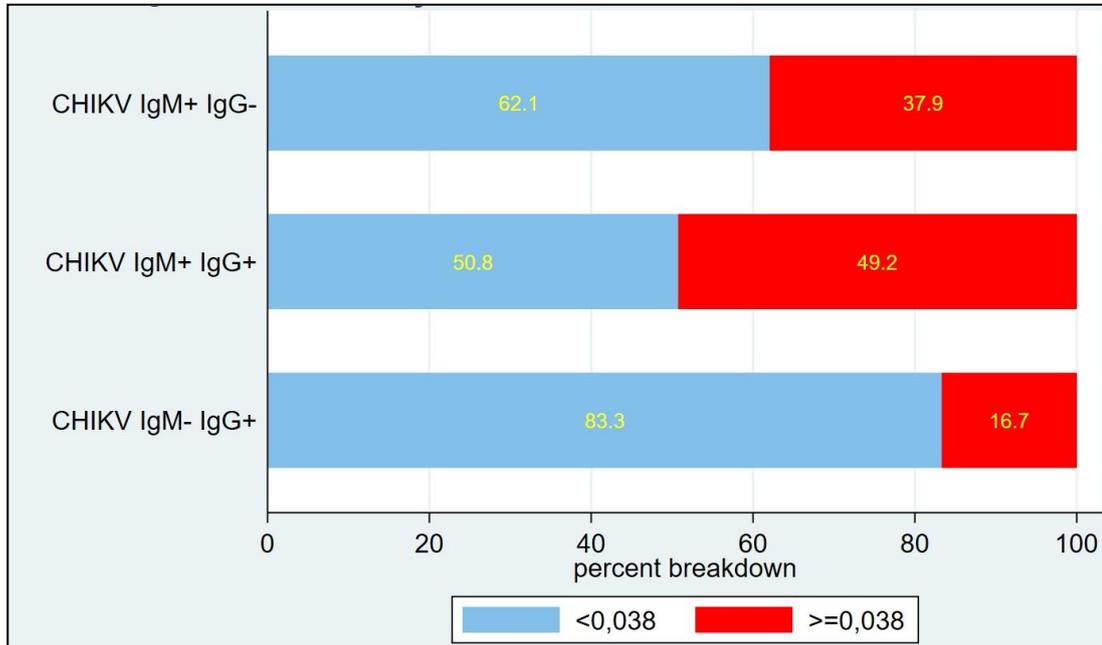
Não foi verificada diferença significativa nas proporções das concentrações de IL-1 β e TGF- β 1 nas fases da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,0688$) (Gráfico 19). Não houve diferença significativa nas proporções das concentrações de IL-1 β e TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,1026$) (Gráfico 20).

Gráfico 19 – Razões IL-1 β /TGF- β 1 nas fases da doença em 228 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal - Wallis*: razões IL-1 β /TGF- β 1 nas fases da doença, $p = 0,0688$.

Gráfico 20 – Razões IL-1 β /TGF- β 1 nos grupos de soropositividade em 227 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

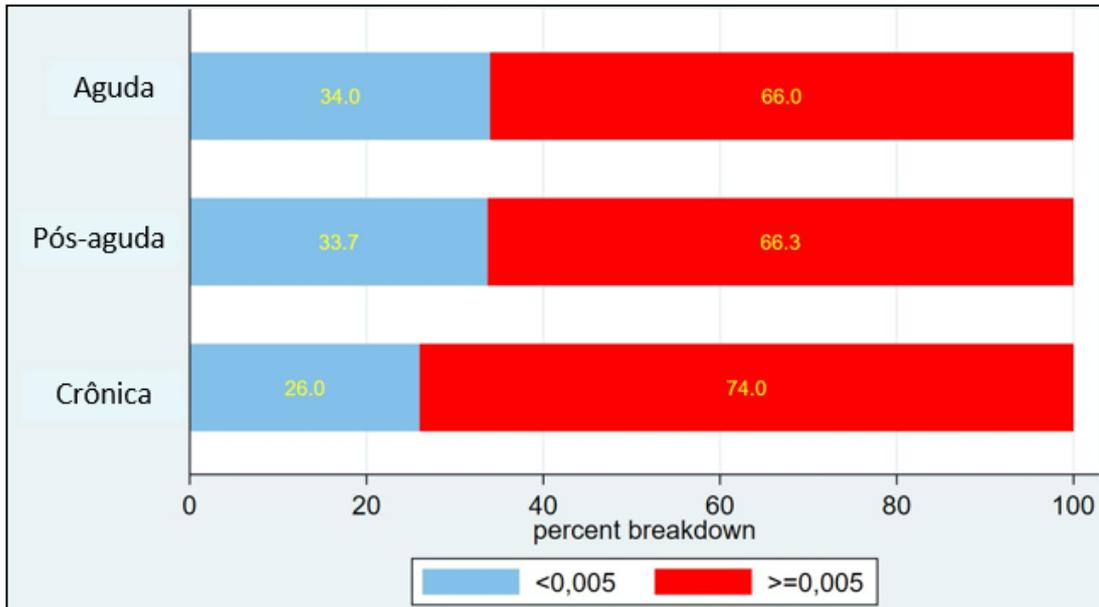


Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: razões IL-1 β /TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,1026$.

6.5.1 Razões entre as citocinas IL-17A e TGF- β 1

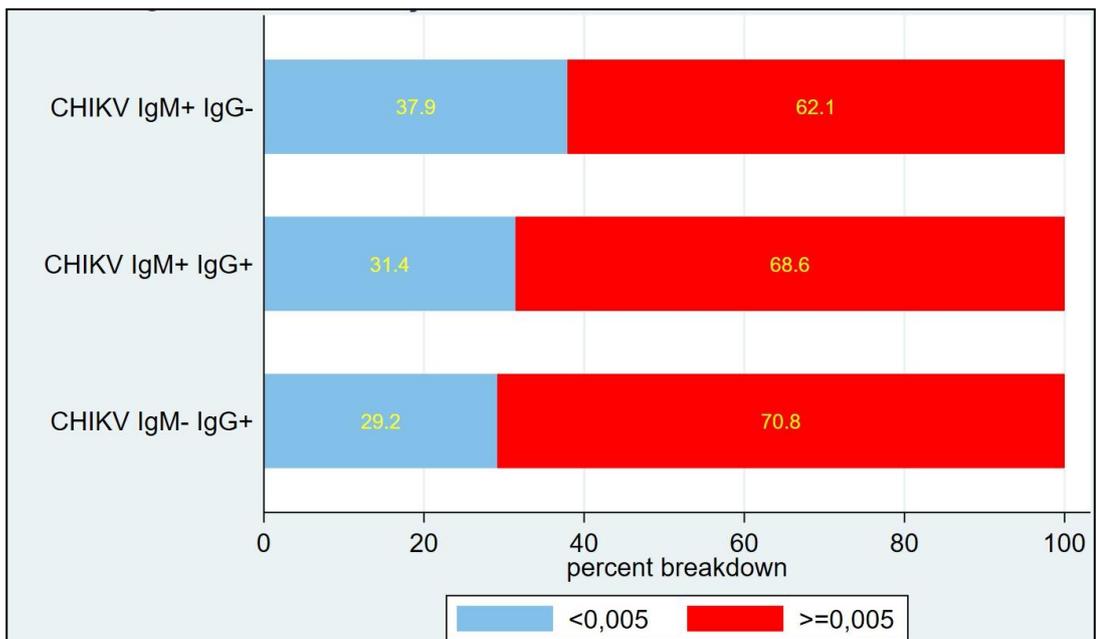
Não foi verificada diferença significativa nas proporções das concentrações de IL-17A e TGF- β 1 nas fases da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,8821$) (Gráfico 21). Não houve diferença significativa nas proporções das concentrações de IL-17A e TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,1945$) (Gráfico 22).

Gráfico 21 – Razões IL-17A/TGF- β 1 nas fases da doença em 227 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: razões IL-1 β /TGF- β 1 nas fases da doença, $p = 0,8821$.

Gráfico 22 – Razões IL-17A/TGF- β 1 nos grupos de soropositividade em 226 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.

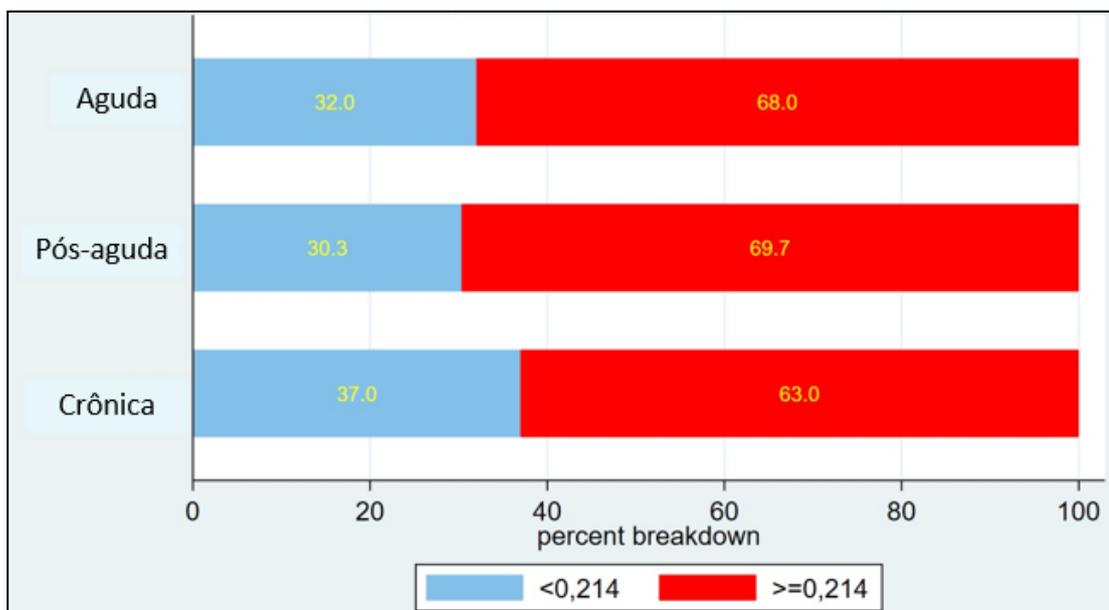


Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: razões IL-1 β /TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,1945$.

6.5.1 Razões entre as citocinas MCP-1 e TGF- β 1

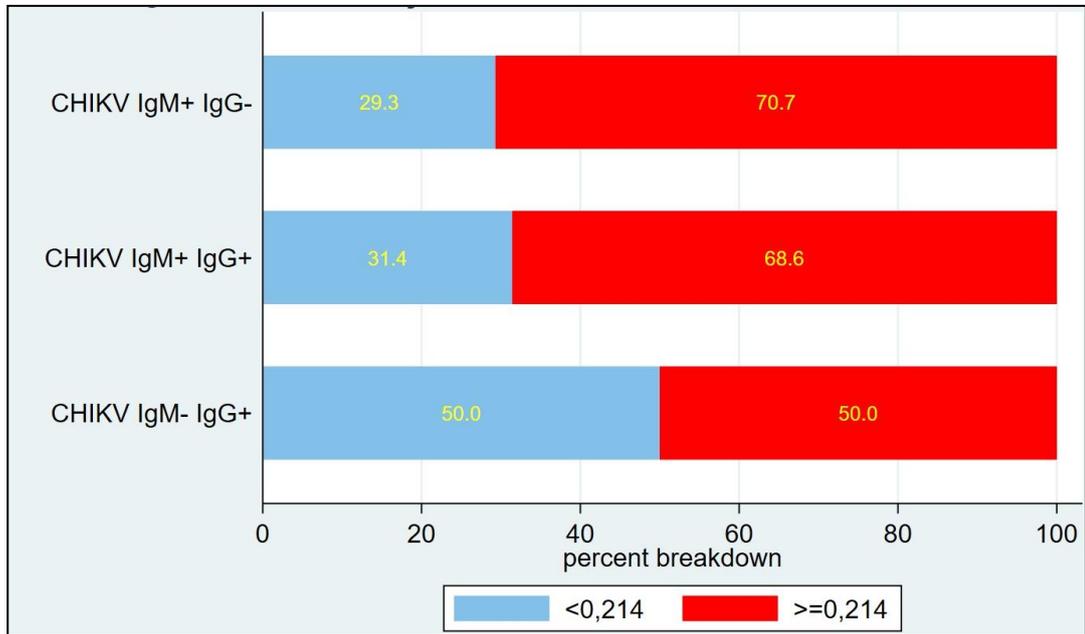
Foi observada uma diminuição das proporções das concentrações de MCP-1 e TGF- β 1 com a progressão para a fase crônica da doença (Teste de *Kruskal - Wallis*, $p = 0,0203$) (Gráfico 23). Os sujeitos com IgM- IgG+ anti-CHIKV possuíam níveis menores de MCP-1 em relação ao TGF- β 1 quando comparados aos demais grupos de soropositividade (Teste de *Kruskal-Wallis*, $p = 0,0038$) (Gráfico 24).

Gráfico 23 – Razões MCP-1/TGF- β 1 nas fases da doença em 227 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal - Wallis*: razões MCP-1/TGF- β 1 nas fases da doença, $p = 0,0203$.

Gráfico 24 - Razões MCP-1/TGF- β 1 nos grupos de soropositividade em 226 casos de CHIKF em 2017 no Ceará.



Fonte: Elaborado pelo autor. Teste de *Kruskal – Wallis*: razões IL-1 β /TGF- β 1 nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV, $p = 0,0038$.

7 DISCUSSÃO

De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), em 2017 o Ceará teve, de casos suspeitos de CHIKF, 68.924 notificações acumuladas em Fortaleza e 2.554 registros dos outros municípios juntos, indicando, da mesma maneira que este estudo, que a capital foi a cidade do Ceará que mais teve casos da doença (FORTALEZA, 2017). Dos casos confirmados da CHIKF naquele ano no estado, até a semana epidemiológica 39, 66,30% (61.293/91.752) se concentravam na faixa de 20 a 59 anos e o sexo feminino foi o predominante nas faixas etárias acima de 14 anos, ratificando o que foi obtido neste estudo (CEARÁ, 2017).

As pessoas do sexo feminino foram as mais acometidas pela doença de acordo com esta pesquisa (78,92%) e estas apresentaram maior tempo de duração dos sintomas ($p < 0,05$). Alguns estudos de grupos brasileiros corroboram com estes resultados: um estudo de base populacional, conduzido por meio de entrevistas e inquéritos sorológicos da CHIKF entre outubro e dezembro de 2015 em duas cidades baianas um ano após a emergência da doença no país, mostrou predomínio do sexo feminino e de pessoas com mais de 60 anos entre os casos sintomáticos e também predomínio do sexo feminino entre participantes sintomáticos na fase crônica (DIAS *et al.*, 2018); outro estudo, de Silva Júnior *et al.* (2018), do tipo transversal, onde foram analisados todos os casos registrados da doença em 2016-2017 no Ceará (182.731) por meio de dados de relatórios de notificação, mostrou maioria de mulheres (62%).

Brasil (2014) cita entre os fatores de risco para a não recuperação da doença a idade avançada (maior que 65 anos), tendência que foi demonstrada nesta pesquisa pela constatação de que as pessoas com mais de 65 anos tiveram maior tempo de duração dos sintomas do que as pessoas com menos de 65 anos, mas sem diferença significativa ($p > 0,05$). Entretanto, foi observado que sujeitos acima da mediana de idade (51,73) estavam mais frequentes nas fases pós-aguda (51,15%) e crônica (25,29%) do que na fase aguda (23,56%) ($p < 0,05$), indicando a propensão de pessoas com idade maior que a da mediana para a cronificação da doença.

Sobre o fato de a CHIKF ser mais observada no sexo feminino, van Genderen *et al.*, (2016), que realizaram um estudo prospectivo com casos clinicamente suspeitos da doença entre 2014 e 2015 no Suriname, trouxeram que houve um comportamento de busca por cuidados de saúde maior entre as mulheres (81,80%) do que entre os homens (71,40%) estudados ($p < 0,05$).

Vidal *et al.* (2020), através de um estudo transversal com pessoas diagnosticadas clinicamente com CHIKV em 2015 na Colômbia, observaram padrões de resposta fenotípica nas mulheres diferentes dos presentes nos homens. As mulheres têm uma resposta imunológica à infecção viral mais forte do que os homens, o que pode ajudar no desenvolvimento de doenças autoimunes neste grupo. Uma forte resposta imune ao CHIKV pode estar relacionada a produção de sintomas mais complexa. Acredita-se que a disseminação do vírus para outras regiões do corpo pode levar a uma resposta antigênica anômala no sexo feminino, o que pode gerar padrões de sintomas piores.

As medianas das idades por grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV se mostraram aumentadas nos grupos de soropositividade com IgG reagente (48,02 para IgM+ IgG-; 53,44 para IgM+ IgG+ e 59,45 para IgM- IgG+), sugerindo que pessoas mais velhas tinham maior tempo de duração dos sintomas. No grupo com IgM+ IgG-, 50,00% dos sujeitos estavam na fase aguda e os outros 50,00% na fase pós-aguda; nos grupos com IgM+ IgG+ e com IgM- IgG+ predominaram, respectivamente, 53,41% dos pacientes na fase pós-aguda e 70,83% dos pacientes na fase crônica, mostrando que o perfil com maior representatividade para uma fase foi o de IgM não reagente e IgG reagente, com quase 1/3 dos pacientes na fase crônica e salientando as diferenças entre as fases da doença e o período de soroconversão.

Neste trabalho, IgM e IgG foram detectadas em pessoas com no mínimo quatro dias de sintomas relatados, a maior proporção de soropositividade para IgM foi vista em pacientes com dez a 12 dias de sintomas relatados e a maior proporção de soropositividade para IgG foi vista em pacientes com dez a 15 dias de sintomas relatados, confirmando o que já foi trazido pela literatura (AMDEKAR, PARASHAR, ALAGARASU, 2017; CHUA *et al.*, 2017). Pelo fato de se utilizar um bioarquivo de conveniência, a maioria das amostras incluídas na pesquisa (344/351) são de pacientes com mais de sete dias de sintomas relatados, tornando limitadas as conclusões sobre início da soropositividade para IgM anti-CHIKV.

Foi notada a presença de IgM anti-CHIKV em participantes com mais de 90 dias de sintomas 76,71% (56/73). A presença da IgM específica para CHIKV por mais de 90 dias da infecção e até por mais de 12 meses (IgM de longa duração) já foi observada por outros pesquisadores e parece ter relação com a persistência do vírus oculto, podendo estar associada a quadros de artralgia crônica e artrite destrutiva (MALVY *et al.*, 2009; CHUA *et al.*, 2017). A persistência da IgM específica foi descrita também para outros alfavírus, como o vírus do Rio Ross (RRV), e até para flavivírus (vírus da dengue) (FARMER; SUHRBIER, 2019).

Foram encontradas 28 codeteções de IgM anti-CHIKV e IgM anti-DENV. Vale ressaltar que estes achados não permitem afirmar se os casos são de infecção recente ou de coinfeção, o que só seria possível através da realização de testes moleculares. Entretanto, as coinfeções não são eventos raros durante períodos de transmissão arboviral intensa e em áreas de cocirculação de CHIKV e DENV. Outra hipótese é que o indivíduo pode 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 um alfavírus e um flavivírus.

O DENV circula desde 1986 no Ceará. 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 estado confirmou quase um milhão de casos da doença e registrou pelo menos 14 epidemias (CAVALCANTI *et al.*, 2017; BRASIL, 2019a); o que explica o achado deste estudo de 90,67% (311/343) de IgG anti-DENV entre as amostras analisadas.

O desequilíbrio entre os mecanismos de eliminação viral e os sistemas de proteção do hospedeiro aparenta ter papel destacado na CHIKF e no desenvolvimento dos seus sintomas persistentes. Elucidar até que ponto as vias imunológicas patogênicas e protetoras estão presentes na doença e contribuem para a artrite crônica é condição fundamental para se ter entendimento da patologia e das possíveis rotas terapêuticas que se dirigem aos prováveis santuários virais e a inflamação crônica. Em vista disso, um caminho para investigação da patogênese da infecção por CHIKV é o esclarecimento das respostas específicas em condições agudas e de longa duração (HOARAU *et al.*, 2010).

Neste estudo, as concentrações de IL-1 β , IL-2, IL-17A, MCP-1 e TGF- β 1 foram quantificadas no soro dos participantes a fim de verificar seu comportamento nos grupos de fases da doença e nos grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKV. Obtivemos resultados com diferença significativa nas duas situações.

A IL-1 β é a principal forma biologicamente ativa da IL-1 secretada. Ela age no hipotálamo induzindo a elevação da temperatura corpórea e a expressão de proteínas de fase aguda, as quais podem ter funções protetoras, homeostáticas e de reparo tecidual (ABBAS *et al.*, 2012). Um trabalho semelhante a este no que se refere ao período da doença, realizado por intermédio de determinação do perfil de algumas moléculas em pacientes com CHIKF dentro de um mês do início da doença, revelou que a IL-1 β apresentou resposta intensa na fase aguda (0-5 dias do início da febre) (VENUGOPALAN, GHORPADE, CHOPRA; 2014). No

trabalho citado, a elevação desta citocina foi observada em pacientes com infecção muito recente (com febre), o que pode não ter sido possível de observar neste trabalho, pois apenas 7,00 % (7/100) dos indivíduos na fase aguda relataram menos de 7 dias de sintomas.

Kelvin *et al.* (2011) e Chaaithanya *et al.* (2011) seguiram pacientes que tiveram apenas sintomas agudos de CHIKV e aqueles que evoluíram para a doença crônica meses depois da infecção, estimando os níveis de várias citocinas, dentre elas a IL-1 β que, nas duas pesquisas, se mostrou aumentada na fase aguda precoce. Alguns trabalhos não mostraram aumento da IL-1 β na fase aguda precoce (HOARAU *et al.*, 2010; WAUQUIER *et al.*, 2010; REDDY *et al.*, 2014) e um trabalho não mostrou aumento desta citocina na fase aguda muito precoce (1-3 dias depois da doença começar) (TANABE *et al.*, 2019).

Segundo Ng *et al.* (2009), níveis altos da IL-1 β estão associados a gravidade dos sintomas da CHIKF. Além de ser a causadora de febre alta, esta molécula pode mediar a artralgia, uma vez que ela está implicada na origem de doenças artríticas como a AR.

A IL-2 é uma citocina produzida pelos linfócitos T após sua ativação pelo antígeno; ela promove o crescimento de linfócitos TCD4⁺, a atividade citolítica de linfócitos TCD8⁺ e NK e modula programas de diferenciação de linfócitos TCD4⁺, além de ser essencial para o desenvolvimento e a manutenção de linfócitos Treg (LIAO, LIN, LEONARD; 2013). Apesar de não ter sido notado aumento dos seus níveis em nenhuma das fases da CHIKF de acordo com a classificação utilizada neste trabalho, a IL-2 estava mais presente no grupo com IgM-IgG+ entre os grupos de soropositividade para anticorpos anti-CHIKF ($p < 0,05$). A maioria dos indivíduos deste grupo (70,8%) estava na fase crônica da doença (com três a quatro meses do início da infecção), quando os títulos da IgM em geral caem e então somente a IgG pode ser detectada pelo exame (VAIRO *et al.*, 2019). Sabendo-se que a IL-2 é essencial para a proliferação celular, especialmente na resposta imune adaptativa, é justificável encontrar sua concentração elevada no grupo ligado à fase crônica da doença. Hoarau *et al.* (2010) e também Kelvin *et al.* (2011) não encontraram relação da IL-2 com a progressão da CHIKF.

Chang *et al.* (2018) em um estudo de caso-controle com pacientes sintomáticos para CHIKV, observaram que citocinas relacionadas a tolerância imunológica, dentre elas a IL-2, baixas durante a fase inicial da CHIKF, são preditivas para dor articular persistente, sugerindo que a presença destas na fase aguda é importante para o desenvolvimento de uma tolerância imunológica que evite a cronificação da doença. Este comportamento não pode ser avaliado neste trabalho porque os participantes não foram seguidos.

A IL-17 é uma citocina que induz inflamação neutrofílica, ajudando no combate a patógenos bacterianos e fúngicos extracelulares; também existem evidências de que ela pode induzir resposta a infecções virais (ABBAS, 2012). Neste trabalho não foi vista diferença significativa nos níveis de IL-17 dos pacientes nem entre as fases da CHIKF nem entre os perfis de resultados de sorologia para CHIKF. De todas as amostras para IL-17, 43,45% (146/336) se mostraram abaixo do limite de detecção do kit, o que pode ter contribuído para a não observação de resultados semelhantes aos trazidos pelos trabalhos citados anteriormente. Wauquier *et al.* (2010) observaram um aumento da IL-17 na fase aguda muito precoce. Chow *et al.* (2011) e Cavalcanti *et al.* (2019) observaram aumento da IL-17 em pacientes com artrite crônica por CHIKV em comparação a pacientes nas outras fases da doença. Chaaithanya *et al.* (2011) não viram diferença significativa entre as concentrações de IL-17 dos pacientes nas diferentes fases da CHIKF.

A expressão de receptores para IL-17 foi verificada em diversas células parenquimatosas de pacientes com artrite persistente; esta molécula estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases de matriz, as últimas destroem a matriz extracelular e causam reabsorção óssea, o que condiz com a erosão óssea encontrada em pacientes com CHIKF crônica (AMARAL *et al.*, 2019).

A MCP-1 é uma molécula que participa destacadamente do recrutamento de monócitos e macrófagos e está bastante ligada a infecção aguda por CHIKV em modelos humanos e animais (AMARAL *et al.*, 2019). Ainda que a elevação da MCP-1 não tenha sido observada em nenhuma das fases da CHIKF de acordo com a classificação utilizada nesta pesquisa, os grupos que apresentaram IgM+ IgG-, composto por pacientes nas fases aguda e pós-aguda na mesma proporção, e IgM- IgG+, composto predominantemente por pacientes na fase crônica, tenderam a um aumento, mas sem diferença significativa. Reddy *et al.* (2014) observaram altos níveis de MCP-1 na fase aguda e também na fase crônica, sugerindo que esta quimiocina pode contribuir para a permanência dos sintomas. Alguns pesquisadores mostraram que a MCP-1 está mais presente em pacientes com CHIKF crônica quando comparados aos controles saudáveis (CHAAITHANYA *et al.*, 2011; NINLA-AESONG, MITARNUN, NOIPHA; 2019).

Hoarau *et al.* (2010) conseguiram demonstrar que altas concentrações de MCP-1 no líquido sinovial de um paciente com CHIKF crônica estavam correlacionados a alterações citopáticas no tecido de origem e a persistência antigênica do CHIKV. Um estudo de Chen *et al.* (2014) utilizando modelo murino obteve que animais infectados pelo CHIKV tratados com

um inibidor de MCP (Bindarit) tiveram significativamente menor aumento de MCPs, menor aumento de celularidade dentro da tíbia e das articulações do tornozelo e menor perda óssea do que animais não tratados. A MCP-1 parece agir como a quimiocina que mais contribui para a osteoclastogênese, pois ela promove o aumento de células monocíticas-macrofágicas, as quais podem servir como provimento de precursores de osteoclastos.

Cavalcanti *et al.* (2019) trazem que citocinas, dentre elas o TGF- β , estão relacionadas a patogênese de doenças inflamatórias articulares como AR, artrite psoriática e espondilite anquilosante, cujos sintomas são semelhantes às manifestações crônicas da CHIKF. À partir desta afirmação, eles investigaram os níveis de citocinas e obtiveram que o TGF- β estava em concentrações elevadas nas amostras de indivíduos nas fases pós-aguda e crônica da doença, o que condiz com o que foi encontrado neste trabalho, uma vez que o grupo com IgM+ IgG+, com maioria de amostras de indivíduos nas fases pós-aguda e crônica (53,4% e 21,2%, respectivamente) e o grupo com IgM- IgG+ (com maioria dos indivíduos na fase crônica da doença) tiveram maiores níveis da citocina ($p < 0,05$). É importante ressaltar que 96 amostras não foram testadas para TGF- β 1 por falta de reagente no kit (anticorpo de captura).

Com exceção de TGF- β 1, as outras citocinas quantificadas não tiveram seus níveis associados a nenhuma fase da doença, o que pode estar relacionado a imprecisão do relato do número de dias de sintomas pelos pacientes. A observação de altos níveis de IL-2 e TGF- β 1 no grupo com IgM- IgG+ sugere um perfil regulatório para linfócitos T (CAVALCANTI *et al.*, 2019).

Foi observada uma diminuição na razão entre MCP-1 e TGF- β 1 nas amostras de indivíduos na fase crônica da doença e naqueles com IgM+ IgG+ e IgM- IgG+, o que corrobora com o fato de terem sido observadas evidências de um perfil regulatório com redução da resposta inflamatória.

Estes achados auxiliam na compreensão dos mecanismos de resposta imune da infecção por CHIKV, sendo relevantes para um melhor conhecimento da imunopatologia da doença, mesmo preliminar, traz subsídios para estudos posteriores. Devido à natureza deste trabalho, não foi possível realizar seguimento dos 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.

8 CONCLUSÃO

Foi possível concluir que sujeitos acometidos pela chikungunya do sexo feminino e com idade maior que 51,73 anos apresentaram duração maior dos sintomas e que níveis elevados de IL-2 e de TGF- β 1 foram relacionados ao grupo com IgM- IgG+ e à fase crônica da doença, sugerindo que as características imunológicas da cronificação da CHIKF estão associados à alteração nos mecanismos de imunotolerância.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. Técnicas de laboratório comumente utilizadas em imunologia. In. Imunologia celular e molecular. 7° ed. Saunders: Elsevier, 2012.

ABDELNABI, Rana; NEYTS, Johan; DELANG, Leen. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 121, p. 59-68, set. 2015.

AMARAL, J.; TAYLOR, Peter; TEIXEIRA, Mauro; MORRISON, Thomas; SCHOEN, Robert. The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. **Viruses**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 1-12, 22 mar. 2019.

AMDEKAR, Sarika; PARASHAR, Deepti; ALAGARASU, Kalichamy. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: role of host and viral factors in the pathogenesis. **Viral Immunology**, [S.L.], v. 30, n. 10, p. 691-702, dez. 2017.

ANDRADE, Gabriel Costa de; VENTURA, Camila V.; MELLO FILHO, Paulo Augusto de Arruda; MAIA, Maurício; VIANELLO, Silvana; RODRIGUES, Eduardo Büchele. Arboviruses and the eye. **International Journal Of Retina And Vitreous**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-7, 1 fev. 2017.

ARIAS-GOETA, Camilo; MOUTAILLER, Sara; MOUSSON, Laurence; ZOUACHE, Karima; THIBERGE, Jean-Michel; CARO, Valérie; ROUGEON, François; FAILLOUX, Anna-Bella. Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 24, p. 116-126, jun. 2014.

BASORE, Katherine; KIM, Arthur S.; NELSON, Christopher A.; ZHANG, Rong; SMITH, Brittany K.; URANGA, Carla; LOVANG,; CHENG, Ming; GROSS, Michael L.; SMITH, Jonathan. Cryo-EM Structure of Chikungunya Virus in Complex with the Mxra8 Receptor. **Cell**, [S.L.], v. 177, n. 7, p. 1725-1737, jun. 2019.

BASTOS, Maria Luiza Almeida; ABREU, Francileudo Santos de; SILVA JUNIOR, Geraldo Bezerra da. Inability to work due to Chikungunya virus infection: impact on public service during the first epidemic in the State of Ceará, northeastern Brazil. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 248-249, maio 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil – 1ª edição. Brasília. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Chikungunya: Manejo Clínico – 2ª edição. Brasília. 2017.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Volume 49 N° 1 – 2018 ISSN 2358-9450.

BURT, Felicity J.; ROLPH, Michael S.; RULLI, Nestor E.; MAHALINGAM, Suresh; HEISE, Mark T.. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, [S.L.], v. 379, p. 369-371, 18 fev. 2012.

BURT, Felicity J.; CHEN, Weiqiang; MINER, Jonathan J.; LENSCHOW, Deborah J., MERITS, Andres; SCHNETTLER, Esther; KOHL, Alain; RUDD, Penny A.; TAYLOR, Adam; HERRERO, Lara J.; ZAID, Ali; NG, Lisa F. P.; MAHALINGAM, Suresh. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, p. 107-117, abr. 2017.

CAVALCANTI, Luciano Pamplona de Góes; BARRETO, Francisca Kalline de Almeida; OLIVEIRA, Rhaquel de Moraes Alves Barbosa; CANUTO, Ilana Frota Pontes; LIMA, Antônio Afonso Bezerra; LIMA, José Wellington Oliveira; ESCÓSSIA, Kiliansa Nogueira Farias da; MARTINS, Victor Emanuel Pessoa; ALENCAR, Carlos Henrique; PERDIGÃO, Anne Caroline Bezerra. 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**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 65-82, 13 dez. 2017.

CAVALCANTI, Nara Gualberto; MELOVILAR, Kamila; DUARTE, Angela Luzia Branco Pinto; RÊGO, Moacyr Jesus Barreto de Melo; PEREIRA, Michelly Cristiny; PITTA, Ivan da

Rocha; MARQUES, Claudia Diniz Lopes; PITTA, Maíra Galdino da Rocha. IL-27 in patients with Chikungunya fever: a possible chronicity biomarker?. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 196, p. 48-51, ago. 2019.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico Dengue, Chikungunya e Zika SE 39. 2017; 1-13.

CEARÁ, Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, Núcleo de Vigilância Epidemiológica. Boletim Epidemiológico Dengue, Chikungunya e Zika SE 52. 2018; 1-17.

CHAAITHANYA, Itta Krishna; MURUGANANDAM, Nagarajan; SUNDARAM, Senthil G.; KAWALEKAR, Omkar; SUGUNAN, Attayur P.; MANIMUNDA, Sathya P.; GHOSAL, Sruti R.; MUTHUMANI, Karuppiah; VIJAYACHARI, Paluru. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. **Viral Immunology**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 265-271, ago. 2011.

CHANG, Aileen Y.; MARTINS, Karen A. O.; ENCINALES, Liliana; REID, St. Patrick; ACUÑA, Marlon; ENCINALES, Carlos; MATRANGA, Christian B.; PACHECO, Nelly; CURE, Carlos; SHUKLA, Bhavarth. Chikungunya Arthritis Mechanisms in the Americas. **Arthritis & Rheumatology**, [S.L.], v. 70, n. 4, p. 585-593, 7 mar. 2018.

CHANG, Aileen; TRITSCH, Sarah; REID, St.; MARTINS, Karen; ENCINALES, Liliana; PACHECO, Nelly; AMDUR, Richard; PORRAS-RAMIREZ, Alexandra; RICO-MENDOZA, Alejandro; LI, Guangzhao. The Cytokine Profile in Acute Chikungunya Infection is Predictive of Chronic Arthritis 20 Months Post Infection. **Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1-7, 20 out. 2018.

CHEN, Rubing; MUKHOPADHYAY, Suchetana; MERITS, Andres; BOLLING, Bethany; NASAR, Farooq; COFFEY, Lark L.; POWERS, Ann; WEAVER, Scott C.. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **Journal Of General Virology**, [S.L.], v. 99, n. 6, p. 761-762, 1 jun. 2018.

CHEN, Weiqiang; FOO, Suan-Sin; TAYLOR, Adam; LULLA, Aleksei; MERITS, Andres; HUESTON, Linda; FORWOOD, Mark R.; WALSH, Nicole C.; SIMS, Natalie A.;

HERRERO, Lara J.. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 89, n. 1, p. 581-593, 22 out. 2014.

CHOW, Angela; HER, Zhisheng; ONG, Edward K. S.; CHEN, Jin-Miao; DIMATATAC, Frederico; KWEK, Dyan J. C.; BARKHAM, Timothy; YANG, Henry; RÉNIA, Laurent; LEO, Yee-Sin. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 203, n. 2, p. 149-157, 15 jan. 2011.

CHUA, Chong-Long; SAM, I-Ching; CHIAM, Chun-Wei; CHAN, Yoke-Fun. The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 1-16, 9 fev. 2017.

CUNHA, Rivaldo V.; TRINTA, Karen S.. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 112, n. 8, p. 523-531, ago. 2017.

DIAS, Juarez P.; COSTA, Maria da Conceição N.; CAMPOS, Gubio Soares; PAIXÃO, Enny S.; NATIVIDADE, Marcio S.; BARRETO, Florisneide R.; ITAPARICA, Martha Suely C.; GOES, Cristina; OLIVEIRA, Francisca L.s.; SANTANA, Eloisa B.. Seroprevalence of Chikungunya Virus after Its Emergence in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 617-624, abr. 2018.

ECONOMOPOULOU, A.; DOMINGUEZ, M.; HELYNCK, B.; SISSOKO, D.; WICHMANN, O.; QUENEL, P.; GERMONNEAU, P.; QUATRESOUS, I.. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology And Infection**, [S.L.], v. 137, n. 4, p. 534-541, 11 ago. 2008.

FARMER, Jillan F.; Suhrbier, Andreas.. Interpreting paired serology for Ross River virus and Barmah Forest virus diseases. **The Australian Journal of General Practice**, v. 48, n. 9, p. 645-649, set. 2019.

FORTALEZA, Secretaria Municipal de Saúde de Fortaleza, Coordenadoria de Vigilância em Saúde. Boletim Semanal da Febre Chikungunya Zika 52ª Semana Epidemiológica. 2017; 1-18.

FOX, Julie M.; DIAMOND, Michael S.. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 197, n. 11, p. 4210-4218, 18 nov. 2016.

GASQUE, Philippe; COUDERC, Therese; LECUIT, Marc; ROQUES, Pierre; NG, Lisa F.P.. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 241-249, abr. 2015.

GÉRARDIN, Patrick; BARAU, Georges; MICHAULT, Alain; BINTNER, Marc; RANDRIANAIVO, Hanitra; CHOKER, Ghassan; LENGLET, Yann; TOURET, Yasmina; BOUVERET, Anne; GRIVARD, Philippe. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 413-423, 18 mar. 2008.

GIRY, Claude; ROQUEBERT, Bénédicte; LI-PAT-YUEN, Ghislaine; GASQUE, Philippe; JAFFAR-BANDJEE, Marie-Christine. Improved detection of genus-specific Alphavirus using a generic TaqMan® assay. **Bmc Microbiology**, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 1-9, 24 jul. 2017.

GOUPIL, Brad A.; MORES, Christopher N.. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: clinical manifestations, therapeutics, and pathogenesis. **The Open Rheumatology Journal**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 129-140, 30 nov. 2016.

HOARAU, Jean-Jacques; BANDJEE, Marie-Christine Jaffar; TROTOT, Pascale Krejbich; DAS, Trina; LI-PAT-YUEN, Ghislaine; DASSA, Bérengère; DENIZOT, Mélanie; GUICHARD, Elsa; RIBERA, Anne; HENNI, Tawfiq. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 19 abr. 2010.

JAVELLE, Emilie; RIBERA, Anne; DEGASNE, Isabelle; GAÛZÈRE, Bernard-Alex; MARIMOUTOU, Catherine; SIMON, Fabrice. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: a retrospective study of 159 cases in reunion island from 2006-2012. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 1-18, 11 mar. 2015.

KELVIN, Alyson A.; BANNER, David; SILVI, Giuliano; MORO, Maria Luisa; SPATARO, Nadir; GAIBANI, Paolo; CAVRINI, Francesca; PIERRO, Anna; ROSSINI, Giada; CAMERON, Mark J.. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 5, n. 8, p. 1-12, 16 ago. 2011.

LIAO, Wei; LIN, Jian-Xin; LEONARD, Warren J.. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. **Immunity**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 13-25, jan. 2013.

LUM, Fok-Moon; COUDERC, Thérèse; CHIA, Bing-Shao; ONG, Ruo-Yan; HER, Zhisheng; CHOW, Angela; LEO, Yee-Sin; KAM, Yiu-Wing; RÉNIA, Laurent; LECUIT, Marc. Antibody-mediated enhancement aggravates chikungunya virus infection and disease severity. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-14, 30 jan. 2018.

LUM, Fok-Moon; NG, Lisa F.P.. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 120, p. 165-174, ago. 2015.

MALVY, Denis; EZZEDINE, Khaled; MAMANI-MATSUDA, Maria; AUTRAN, Brigitte; TOLOU, Hugues; RECEVEUR, Marie-Catherine; PISTONE, Thierry; RAMBERT, Jérôme; MOYNET, Daniel; MOSSALAYI, Djavad. Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. **Bmc Infectious Diseases**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-7, dez. 2009.

MASCARENHAS, Mariola; GARASIA, Sophiya; BERTHIAUME, Philippe; CORRIN, Tricia, GREIG, Judy; NG, Victoria; YOUNG, Ian; WADELL, Lisa. A scoping review of published literature on chikungunya virus. **Plos One**, [S.L.], v. 13, n. 11, p. 1-40, 29 nov. 2018.

MORRISON, T. E.. Reemergence of Chikungunya Virus. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 88, n. 20, p. 11644-11647, 30 jul. 2014.

NAVECA, Felipe Gomes; CLARO, Ingra; GIOVANETTI, Marta; JESUS, Jaqueline Goes de; XAVIER, Joilson; IANI, Felipe Campos de Melo; NASCIMENTO, Valdinete Alves do; SOUZA, Victor Costa de; SILVEIRA, Paola Paz; LOURENÇO, José. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 1-21, 7 mar. 2019.

NINLA-AESONG, Putrada; MITARNUN, Winyou; NOIPHA, Kusumarn. Proinflammatory Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Persistent Arthralgia and Severe Disease After Chikungunya Virus Infection: a 5-year follow-up study in southern thailand. **Viral Immunology**, [S.L.], v. 32, n. 10, p. 442-452, 1 dez. 2019.

NG, Lisa F. P.; CHOW, Angela; SUN, Yong-Jiang; KWEK, Dyan J. C.; LIM, Poh-Lian; DIMATATAC, Frederico; NG, Lee-Ching; OOI, Eng-Eong; CHOO, Khar-Heng; HER, Zhisheng. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. **Plos One**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-8, 21 jan. 2009.

NORET, M.; HERRERO, L.; RULLI, N.; ROLPH, M.; SMITH, P. N.; LI, R. W.; ROQUES, P.; GRAS, G.; MAHALINGAM, S.. Interleukin 6, RANKL, and Osteoprotegerin Expression by Chikungunya Virus-Infected Human Osteoblasts. **Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 206, n. 3, p. 455-457, 25 maio 2012.

NUNES, Marcio Roberto Teixeira; FARIA, Nuno Rodrigues; VASCONCELOS, Janaina Mota de; GOLDING, Nick; KRAEMER, Moritz Ug; OLIVEIRA, Layanna Freitas de; AZEVEDO, Raimunda do Socorro da Silva; SILVA, Daisy Elaine Andrade da; SILVA, Eliana Vieira Pinto da; SILVA, Sandro Patroca da. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **Bmc Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-10, 30 abr. 2015.

REDDY, Vijayalakshmi; MANI, Reeta Subramaniam; DESAI, Anita; RAVI, Vasanthapuram. Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 86, n. 8, p. 1393-1401, 13 fev. 2014.

PEREIRA, Ana Paula Lombardi; SUZUKAWA, Helena Tiemi; NASCIMENTO, Aline Miquelin do; KAWASSAKI, Aedra Carla Bufalo; BASSO, Camila Regina; SANTOS, Dayane Priscila dos; DAMASCO, Kamila Falchetti; MACHADO, Laís Fernanda; AMARANTE, Marla Karine; WATANABE, Maria Angelica Ehara. An overview of the immune response and Arginase I on CHIKV immunopathogenesis. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 135, p. 1-4, out. 2019.

REZZA, Giovanni; WEAVER, Scott C.. Chikungunya as a paradigm for emerging viral diseases: evaluating disease impact and hurdles to vaccine development. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-12, 17 jan. 2019.

ROUGERON, Virginie; SAM, I-Ching; CARON, Mélanie; NKOGHE, Dieudonné; LEROY, Eric; ROQUES, Pierre. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **Journal Of Clinical Virology**, [S.L.], v. 64, p. 144-152, mar. 2015.

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S.. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms and prospective intervention strategies. **The Journal Of Clinical Investigation**, [S.L.], v. 127, n. 3, p. 737-749, mar. 2017.

SILVA, José V.J.; LUDWIG-BEGALL, Louisa F.; OLIVEIRA-FILHO, Edmilson F. de; OLIVEIRA, Renato A.s.; DURÃES-CARVALHO, Ricardo; LOPES, Thaísa R.R.; SILVA, Daisy E.A.; GIL, Laura H.V.G.. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 188, p. 213-224, dez. 2018.

SILVA JUNIOR, Geraldo Bezerra da; PINTO, José Reginaldo; MOTA, Rosa Maria Salani; PIRES NETO, Roberto da Justa; DAHER, Elizabeth de Francesco. Risk factors for death

among patients with Chikungunya virus infection during the outbreak in northeast Brazil, 2016–2017. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 113, n. 4, p. 221-226, 14 dez. 2018.

SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew L.. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 7, p. 491-500, jul. 2010.

STAIKOWSKY, Frederik; TALARMIN, François; GRIVARD, Philippe; SOUAB, Abdel; SCHUFFENECKER, Isabelle; ROUX, Karin Le; LECUIT, Marc; MICHAULT, Alain. Prospective Study of Chikungunya Virus Acute Infection in the Island of La Réunion during the 2005–2006 Outbreak. **Plos One**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 1-9, 28 out. 2009.

TANABE, Ithallo s B; SANTOS, Elane C; TANABE, Eloiza L L; SOUZA, Stephannie J M; SANTOS, Fabio e F; TANIELE-SILVA, Jamile; FERRO, Jean F G; LIMA, Magliones C; A MOURA, Adriana; ANDERSON, Leticia. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [S.L.], v. 113, n. 11, p. 730-733, 31 jul. 2019.

TANAY, Amir. Chikungunya virus and autoimmunity. **Current Opinion In Rheumatology**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 389-393, jul. 2017.

THIBERVILLE, Simon-Djamel; MOYEN, Nanikaly; DUPUIS-MAGUIRAGA, Laurence; NOUGAIREDE, Antoine; GOULD, Ernest A.; ROQUES, Pierre; LAMBALLERIE, Xavier de. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 99, n. 3, p. 345-370, set. 2013.

TSETSARKIN, Konstantin A.; VANLANDINGHAM, Dana L.; MCGEE, Charles E.; HIGGS, Stephen. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 3, n. 12, p. 1895-1906, 7 dez. 2007.

VAIRO, Francesco; HAIDER, Najmul; KOCK, Richard; NTOUMI, Francine; IPPOLITO, Giuseppe; ZUMLA, Alimuddin. Chikungunya Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features,

Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 1003-1025, dez. 2019.

VAN GENDEREN, Farah T.; KRISHNADATH, Ingrid; SNO, Rachel; GRUNBERG, Meritha G.; ZIJLMANS, Wilco; ADHIN, Malti R.. First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-18, 15 abr. 2016.

VENUGOPALAN, Anuradha; GHORPADE, Ravi P.; CHOPRA, Arvind. Cytokines in Acute Chikungunya. **Plos One**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 1-12, 24 out. 2014.

VIDAL, Oscar M.; ACOSTA-REYES, Jorge; PADILLA, Jesús; NAVARRO-LECHUGA, Edgar; BRAVO, Elsa; VIASUS, Diego; ARCOS-BURGOS, Mauricio; VÉLEZ, Jorge I. Chikungunya outbreak (2015) in the Colombian Caribbean: latent classes and gender differences in virus infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1-18, 3 jun. 2020.

VOLTARELLI, Julio C.. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2008. 1132 p.

VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD, Angelle Desiree. Chikungunya Virus. **Clinics In Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 371-382, jun. 2017.

WAUQUIER, Nadia; BECQUART, Pierre; NKOGHE, Dieudonné; PADILLA, Cindy; NDJOYI-MBIGUINO, Angélique; LEROY, Eric M.. 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**, [S.L.], v. 204, n. 1, p. 115-123, 14 dez. 2010.

WEAVER, Scott C.; FORRESTER, Naomi L.. Chikungunya: evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, [S.L.], v. 120, p. 32-39, ago. 2015.

WEAVER, Scott C.; LECUIT, Marc. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 372, n. 13, p. 1231-1239, 26 mar. 2015.

YAP, Moh Lan; KLOSE, Thomas; URAKAMI, Akane; HASAN, S. Saif; AKAHATA, Wataru; ROSSMANN, Michael G.. Structural studies of Chikungunya virus maturation. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 114, n. 52, p. 13703-13707, 4 dez. 2017.

ZELLER, Herve; VAN BORTEL, Wim; SUDRE, Bertrand. Chikungunya: its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. **Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 214, n. 5, p. 436-440, 5 dez. 2016.