



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

WILKER JOSE PEREZ GOTAY

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
TLR3, IFR5, TLR7 E *TLR8* COM A PROTEÇÃO CONTRA FEBRE
CHIKUNGUNYA, DOR CRÔNICA E INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA**

FORTALEZA, CE

2024

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
TLR3, IFR5, TLR7 E TLR8 COM A PROTEÇÃO CONTRA FEBRE
CHIKUNGUNYA, DOR CRÔNICA E INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia humana e animal

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Juliana Navarro Ueda Yaochite.

Área de concentração: Ciências biológicasIII

Linha de pesquisa: Imunologia e Microbiologia Básica das Infecções Microbianas.

FORTALEZA, CE

2024

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)

G699i Gotay, Wilker Jose Perez.
Investigação da associação de polimorfismos nos genes TLR3, IFR5, TLR7 e TLR8 com a proteção contra febre Chikungunya, dor crônica e infecção assintomática / Wilker Jose Perez Gotay. – 2024.
110 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Juliana Navarro Ueda Yaochite .

1. Chikungunya. 2. Polimorfismos de nucleotídeo único. 3. Receptores Toll- like (TLRs). 4. Fator regulador de interferon 5 (IRF5). 5. Resposta imune. I. Título.

CDD 616.9

WILKER JOSE PEREZ GOTAY

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES
TLR3, IFR5, TLR7 E TLR8 COM A PROTEÇÃO CONTRA FEBRE
CHIKUNGUNYA, DOR CRÔNICA E INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia humana e animal

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Juliana Navarro Ueda Yaochite. Área de concentração: Ciências biológicas III

Linha de pesquisa: Imunologia e Microbiologia Básica das Infecções Microbianas.

Aprovada em: / /2024

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira
Universidade Federal de Piauí (UFPI)

Profa. Dra. Manuela Sales Lima Nascimento
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Profa. Dra. Cynthia Chester Cardoso
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois creio que Ele é o arquiteto e mentor por trás das obras-primas que são a vida e todo o universo e que, por esse simples e maravilhoso motivo, merece minha gratidão. Mesmo quando eu mesmo duvidava de mim, o senhor era um farol que irradiava conhecimento e conseguia dissipar a névoa que encobria meu pensar, me mostrando que eu era capaz. A minha mãe, Marcely Gotay, e meu Padrasto, Luís Nunes, que nunca mediram esforços. A Lixsy Celeste Bernardez pelo apoio e o carinho quero expressar minha sincera gratidão por todo o incentivo que você tem me dado. A Universidade Federal do Ceará. Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Juliana Navarro Ueda Yaochite, que me auxiliou na elaboração dessa pesquisa, além de ter sido fundamental para minha formação acadêmica pela dedicação e imenso carinho dispensado a mim em todos esses anos.

A Raphael de Oliveira Rodrigues e a Prof.^a Cynthia Chester Cardoso pelos ensinamentos para a realização desse trabalho. Obrigado por me auxiliar quando precisei e por acreditar no meu potencial. Mesmo quando eu mesmo duvidava de mim, o senhor era um farol que irradiava conhecimento e conseguia dissipar a névoa que encobria meu pensar, me mostrando que eu era capaz.

A meus amigos de trabalhos Caroline Nobre Oliveira, Artur Fontenelle Lima Montenegro, Alan Gleison Moreira dos Santos e a Mariella Sousa Coêlho Maciel. pelo fundamental apoio em todas as atividades do doutorado desde os experimentos. Pela convivência diária no laboratório, pela grandiosa ajuda e incentivo na realização desse sonho. Minha gratidão a tudo que fizeram por mim, esse trabalho é nosso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e FUNCAP pelo financiamento dessa pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho!

*O êxito é composto de cinco por
cento de inspiração e noventa e
cinco por cento de suor.*

Ralph Waldo Emerson.

RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV), após ser inoculado no organismo por meio da picadura de mosquitos do gênero *Aedes* sp., causa uma infecção que leva à ativação resposta imune inata antiviral. Esta se inicia por meio da ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como por exemplo os *Toll-like* receptors (TLRs) e consequente ativação do fator de transcrição regulador de interferon (IRF), que culmina na produção de moléculas antivirais, como os interferons do tipo I. Vários fatores, incluindo variações genéticas do hospedeiro e resposta imune contra o CHIKV, resultam em diferentes manifestações clínicas da doença. A infecção pode variar de subclínica a artralgia debilitante e reumatismo inflamatório crônico. O presente estudo teve como objetivo investigar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes que codificam os receptores TLRs, sendo eles *TLR3* (rs3775291), *TLR7* (rs3853839) e *TLR8* (rs3764879) e no gene codificador do fator de transcrição *IRF5* (rs2004640) na suscetibilidade à infecção por CHIKV e desenvolvimento de dor persistente. A escolha dessas variantes genéticas nos genes *TLR3/7/8* neste estudo foi realizada por meio de uma revisão bibliográfica bastante minuciosa que mostrou associação desses SNPs com risco de infecção por CHIKV. Entretanto a variante do gene *IRF5* (rs2004640) já tenha sido associada a vários tipos de artrite, sua escolhida foi porque estudos mostram que o 1% dos pacientes com CHIKV podem desenvolver artrite reumatóide. Para tanto, um estudo caso-controle foi realizado na cidade de Fortaleza/CE, Brasil, com coleta de amostras de dados e amostras durante os anos de 2019, 2020 e 2021. O estudo incluiu 121 casos com sorologia IgG anti-CHIKV positiva, 29 casos assintomáticos (IgG anti-CHIKV+) e 182 controles saudáveis (IgG anti-CHIKV-) pareados por idade e sexo. Os polimorfismos foram identificados por meio de ensaios de genotipagem TaqMan® SNP. O alelo polimórfico G da variante 3'UTR C/G do gene *TLR7* (rs3853839) e o alelo polimórfico G da variante 129 C/G do gene *TLR8* (rs3764879) apresentaram-se associados à proteção contra infecção por CHIKV (OR ajustado = 0.64; p = 0.02 e OR ajustado = 0.54; p = 0.001, respectivamente). Essas variantes também estiveram associadas à redução da dor em pacientes com Chikungunya crônica (OR ajustado = 0.54; p = 0.008 e OR ajustado = 0.42; p = 0.002, respectivamente). Além disso, indivíduos que apresentaram o alelo G na variante rs3764879 tiveram maior chance de desenvolver a infecção na forma assintomática (OR ajustado = 2.88; p = 0.004). As análises de desequilíbrio de ligação (LD) para os SNPs rs3764879 e rs3853839, evidenciaram forte desequilíbrio de ligação entre esses marcadores ($D' = 0,99$ e $r^2 = 0,98$). Nenhuma diferença significativa foi observada para as variantes 1234 C/T do gene *TLR3* (rs3775291) e 198 G/T do gene *IRF5* (rs2004640) em relação à associação com infecção e dor crônica. Assim, o presente

estudo identificou que os polimorfismos dos genes *TLR7* e *TLR8* podem atuar como fatores protetores para infecção por CHIKV e redução da dor, sugerindo que essas variantes podem desempenhar um papel na patogênese da Chikungunya.

Palavras-chave: Chikungunya; Polimorfismos de nucleotídeo único; Receptores *Toll-like* (TLRs); Fator regulador de interferon 5 (IRF5), Resposta imune.

SUMMARY

The Chikungunya virus (CHIKV), after being inoculated into the body through the bite of mosquitoes of the genus *Aedes* sp., causes an infection that leads to the activation of the innate antiviral immune response. This begins through the activation of pattern recognition receptors (PRRs), such as Toll-like receptors (TLRs) and consequent activation of the interferon regulatory transcription factor (IRF), which culminates in the production of antiviral molecules, such as type I interferons. Several factors, including host genetic variations and immune response against CHIKV, result in different clinical manifestations of the disease. Infection can range from subclinical to debilitating arthralgia and chronic inflammatory rheumatism. The present study aimed to investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding the receptors TLRs-3 (rs3775291), TLR-7 (rs3853839) and TLR-8 (rs3853839) and in the gene encoding the factor of IRF5 transcription in susceptibility to CHIKV infection and development of persistent pain. To this end, a case-control study was carried out in the city of Fortaleza/CE, Brazil, with collection of data samples and samples during the years 2019, 2020 and 2021. The study included 121 cases with positive anti-CHIKV IgG serology, 29 asymptomatic cases (IgG anti-CHIKV +) and 182 healthy controls (IgG anti-CHIKV-) matched by age and sex. Polymorphisms were identified using TaqMan® SNP genotyping assays. The G polymorphic allele of the 3'UTR C/G variant (rs3853839) of the *TLR7* gene and the G polymorphic allele of the 129 C/G variant (rs3764879) of the *TLR8* gene were associated with protection against CHIKV infection (adjusted OR = 0.64; $p = 0.02$ and adjusted OR = 0.54; $p = 0.001$, respectively). These variants were also associated with pain in patients with chronic Chikungunya (adjusted OR = 0.54; $p = 0.008$ and adjusted OR = 0.42; $p = 0.002$, respectively). Furthermore, individuals who presented the G allele in the rs3764879 variant had a greater chance of developing the infection in asymptomatic form (adjusted OR = 2.88; $p = 0.004$). Linkage disequilibrium (LD) analyzes for the SNPs rs3764879 and rs3853839 showed strong linkage disequilibrium between these markers ($D' = 0.99$ and $r^2 = 0.98$). No significant differences were observed for the 1234 C/T (rs3775291) variants of the *TLR3* gene and 198 G/T (rs2004640) of the *IRF5* gene in relation to the association with infection and chronic pain. Thus, the present study identified that polymorphisms in the *TLR7* and *TLR8* genes can act as protective factors for CHIKV infection and pain reduction, suggesting that these variants may play a role in the pathogenesis of Chikungunya.

Keywords: Chikungunya; Single nucleotide polymorphisms; Toll-like receptors (TLRs); Interferon regulatory factor 5 (IRF5), immune response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -Distribuição de casos notificados de Chikungunya, por ano, nas Américas no período de 2020-2023	22
Figura 2 - Casos de CHIKF segundo classificação e SE, Ceará, 2023	23
Figura 3 - Representação esquemática da partícula de CHIKV	24
Figura 4 -Organização estrutural do genoma do CHIKV	25
Figura 5 -Representação esquemática do ciclo de replicação do CHIKV em células de mamíferos (entrada, replicação intracelular e maturação do vírus).....	26
Figura 6 -Ciclo selvático/ urbano de transmissão do CHIKV	28
Figura 7 - Mecanismos de patogênese da infecção por CHIKV	29
Figura 8 - Via de sinalização dos receptores Toll-like (TLR).....	36
Figura 9 -Representação e localização das variantes genéticas rs3775291, rs3853839, rs3764879 e rs2004640 nos genes <i>TLR3/7/8</i> e <i>IRF5</i>	42
Figura 10 -Organograma das principais etapas experimentais do estudo.....	45
Figura 11 -Representação esquemática da população do estudo	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Manifestações típicas e atípicas da doença por CHIKV	32
Tabela 2 -Identificação e caracterização dos SNPs genotipados em grupos de pacientes e controles. Gene, identificação do SNP, localização cromossômica e região gênica, tipo da troca de base e ensaio das sondas TaqMan® utilizados neste estudo.....	50
Tabela 3 -- Caracterização dos participantes do estudo quanto sexo, idade, comorbidades, sorologia IgG anti-CHIKV	53
Tabela 4 - Características clínicas de indivíduos sintomáticos para CHIKF.....	54
Tabela 5 - Associação genotípica dos SNPs TLR3/7/8 e IRF5 com o risco de infecção por CHIKV	57
Tabela 6 - Associação genotípica dos SNPs TLR3/7/8 e IRF5 com dor a persistente....	62
Tabela 7 - Infecção assintomática vs. Infecção sintomática	67
Tabela 8 - Desequilíbrio de ligação entre os SNPs rs3764879 e rs3853839 no cromossomo X.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR- Artrite Reumatoide

ASS – Grupo de pacientes com infecção assintomática

CHIKF – Febre chikungunya

CHIKV – Chikungunya vírus

CN – Grupo de pacientes sem infecção por CHIKV – controle negativo

DENV - Dengue vírus

DACT - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas DACT/UFC

DF – Doença febril

ECSA – Do inglês *Eastern/Central/South African genotype*, traduz-se Genótipo do Centro-Leste-Sul Africano

EEEV– Vírus da encefalite equina oriente

ELISA – Do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, traduz-se Ensaio de Imunoabsorbância Ligado à Enzima

FHL1– Do inglês *Four and a half LIM domains protein* , traduz-se Proteína 1 de quatro domínios e meio LIM

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IOL – Do inglês *Indian Ocean Lineage genotype*, traduz-se genótipo Asiático e Oceano Índico

IRF– Do inglês *Interferon-regulatory factor*, traduz-se Fator de transcrição regulador de interferon

LACT – Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas do Departamento de Análises clínicas e toxicológicas

LD– Desequilíbrio de ligação

LIMCEMO – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular

MAYV– Mayaro Vírus

MTX– Metotrexato

NK – Células Natural Killer

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF - *Do inglês open reading frame*, traduz-se Sequência de Leitura Aberta

PAMPs: *Do inglês Pathogen- associated molecular patterns*, traduz-se Padrões moleculares associados á patógenos

PRRs– *Do inglês Pattern recognition receptors* , traduz-se Receptores de reconhecimento de padrões

REM– *Do inglês Rapid Eye Movements*, traduz-se Movimentos oculares rápidos

RNA: *Do inglês Ribonucleic Acid*

RRV– Ross River Vírus

RT-PCR – *Do inglês Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, traduz-se Reação em Cadeia da Polimerase de Transcrição Reversa

SE - Semana Epidemiológica

SH – Síndrome hemorrágica

SINV – Sindbis Vírus

SN – Síndrome neurológica

SNPs – *Do inglês, Single Nucleotide Polymorphism*, traduz-se Polimorfismos de Nucleotídeo Único

ssRNA– *Do inglês Single-stranded RNA traduz-se, RNA de fita simples*

TLRs– *Do inglês Toll-like receptors*, traduz-se Receptores do tipo Toll

VEEV– Vírus da encefalite equina venezuelana

ZIKV– Zika vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Características Gerais das Arboviroses	18
2.2 Gênero <i>Alphavirus</i>	19
2.3 Breve contexto histórico e aspectos epidemiológicos da Chikungunya.....	19
2.3.1 Epidemiologia dos casos de CHIKF no Brasil e no Ceará.....	22
2.4 Características gerais do Chikungunya vírus (CHIKV).....	23
2.4.1 Estrutura e Genoma Viral	23
2.4.2 Ciclo de Replicação do CHIKV	25
2.5 Vetor e transmissão do CHIKV.....	27
2.5.1 Mosquitos <i>Aedes aegypti</i>	27
2.6 Patogênese da infecção por CHIKV.....	28
2.7 Manifestações da Febre Chikungunya.....	29
2.7.1 Fase Aguda da CHIKF	30
2.7.2 Fase crônica da CHIKF.....	30
2.7.3 Formas atípicas e graves da CHIKF.....	31
Tabela 1– Manifestações típicas e atípicas da doença por CHIKV	32
2.7.4 Diagnóstico e Tratamento da CHIKF	32
2.8 Resposta imune na infecção por CHIKV.....	33
2.8.1 Resposta Imune Inata ao CHIKV	34
2.8.1.1 Receptores TLRs Endossomais: TLR-3, TLR-7 e TLR-8.....	34
2.8.1.2 Resposta Imune Adaptativa ao CHIKV	37
2.8.3 O papel das citocinas e quimiocinas como biomarcadores na infecção pelo CHIKV	37
2.9 Papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na resposta imune.....	39
2.9.1 SNP 1234 C/T do gene do <i>TLR3</i> (rs3775291).....	39
2.9.2 SNP <i>TLR7</i> 3' UTR C/G (rs3853839) e <i>TLR8</i> 129 C/G (rs3764879).....	40
2.9.3 SNP 198 G/T do gene <i>IRF5</i> (rs2004640).....	41
3. HIPÓTESES	43
4. OBJETIVO	44
4.1 Objetivos Específicos	44
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1 Desenho experimental do estudo	45

5.2 Local de realização do estudo	46
5.3 População do estudo e critérios de inclusão.....	46
5.4 Coleta de informações clínico-epidemiológicas	47
5.4.1 Processamento primário e armazenamento das amostras	48
5.5 Aspectos éticos da pesquisa	48
5.6 Detecção de anticorpos IgG anti-Chikungunya	48
5.7 Extração de DNA	49
5.7.1 Quantificação do gDNA	49
5.8 Experimentos de genotipagem TaqMan® SNP	49
5.9 Análises estatísticas dos dados	51
5.9.1 Análise dos dados das manifestações clínicas	51
6. RESULTADOS.....	52
6.1 Caracterização dos participantes do estudo quanto ao gênero, idade, comorbidades e perfil sorológico	52
6.2 Características clínicas dos casos de CHIKF	54
6.3 Associação dos polimorfismos nos genes <i>TLR3</i> , <i>IRF5</i> , <i>TLR7</i> e <i>TLR8</i> como fator protetor contra infecção por CHIKV.....	57
6.4 Associação dos polimorfismos nos genes <i>TLR3</i> , <i>IRF5</i> , <i>TLR7</i> e <i>TLR8</i> como fator protetor na redução da dor persistente.....	62
6.5 A variante rs3764879 no gene <i>TLR8</i> está associada à infecção assintomática por CHIKV	67
6.6 Análises de desequilíbrio de ligação	72
7. DISCUSSÃO.....	73
8. CONCLUSÕES	79
9. REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A – FICHA PARA COLETA DE DADOS.....	100
ANEXO A– PARECER DO COMITE DE ÉTICA	101
ANEXO B – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	106

1. INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um membro do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*, cujo material genético é constituído por uma única fita de RNA de aproximadamente 12 kb com polaridade positiva (WEAVER; CHEN; DIALLO, 2020). Este vírus é o agente etiológico da febre Chikungunya (CHIKF) e foi isolado pela primeira vez em 1952-1953 durante uma epidemia na África Oriental (Planalto Makonde-Tanzânia) (NARESH KUMAR; SAI GOPAL, 2010; GIMÉNEZ-RICHARTE *et al.*, 2022).

Entre 1960 e 1990, surtos de CHIKF ocorreram esporadicamente na África e na Ásia, aparecendo com mais frequência a partir de 2000 e se espalhando para outros países. Em 2014, o CHIKV foi responsável por causar uma grande epidemia no Brasil, afetando principalmente a região Nordeste. Só nas Américas, cerca de 11.693.489 casos suspeitos e 37.480 casos confirmados de CHIKF foram notificados em 2015 (GIMÉNEZ-RICHARTE *et al.*, 2022). Até o período de 23 de novembro de 2022, foram notificados 362.021 casos e 77 mortes, sendo a maioria dos casos (247.537) relatada no Brasil (ECDC, 2022). Até 31 de dezembro de 2023, aproximadamente 500.000 casos de CHIKF e mais de 400 mortes foram notificados em todo o mundo (ECDC, 2023).

Depois da picada de um mosquito fêmea infectado do gênero *Aedes* sp., o CHIKV é inoculado nos capilares sanguíneos e na derme, onde infecta células residentes da pele, como queratinócitos e fibroblastos dérmicos, iniciando o primeiro ciclo de replicação viral (TENG *et al.*, 2015). Os principais locais de infecção secundária são os músculos e articulações. O período de incubação do CHIKV é de dois a sete dias na maioria dos casos (WEAVER; CHEN; DIALLO, 2020), e a infecção pode resultar em diferentes apresentações clínicas. A fase aguda da CHIKF é associada a vários sintomas e é caracterizada pelo aparecimento de febre alta e poliartrite. A fase crônica é marcada por artritogenicidade com manifestações artrogênicas com duração superior a meses e início de sintomas reumáticos (RIBÉRA *et al.*, 2012; SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012).

A resposta imune antiviral inata inicia principalmente com o reconhecimento de RNA viral por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os *Toll-like* receptors (TLRs) (DUNLEVY; MCELVANEY; GREENE, 2010). Estes receptores têm capacidade de desencadear uma resposta imune contra agentes infecciosos, uma vez que

reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*: PAMPs) (HER *et al.*, 2015) e padrões associados ao dano (DAMPs). A estimulação/ativação dos TLRs é dada pelo reconhecimento de PAMPs ou DAMPs. Em seguida, há ativação das cascatas de sinalização intracelulares e recrutamento de moléculas adaptadoras. O fator de transcrição regulador de interferon (IRF) é ubiquitinado e fosforilado por IKK β , resultando na translocação do IRF para o núcleo, levando à produção de interferons do tipo I, e citocinas como IL-6, e TNF (REYKANDE *et al.*, 2018; AGHAI *et al.*, 2007).

Numerosos fatores de risco para o desenvolvimento de CHIKF grave em pacientes adultos foram relatados, incluindo idade, e sexo e variações genéticas do hospedeiro (BUCARDO *et al.*, 2021; DUTTA; TRIPATHI, 2017; MICKIENÉ *et al.*, 2014). O conhecimento dos perfis genéticos do hospedeiro que influenciam a suscetibilidade da infecção por CHIKV é uma ferramenta essencial para elucidar a fisiopatologia dessa arbovirose e sua progressão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar uma possível relação entre as variações genéticas dos receptores *Toll-Like* 3/7/8 e do fator de transcrição regulador de interferon-5 (IRF5) com a infecção por CHIKV e desenvolvimento de dor persistente.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características Gerais das Arboviroses

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes (*Arthropod-borne virus*) e são assim designados não somente pela sua veiculação por meio de artrópodes, mas, principalmente, pelo fato de parte de seu ciclo replicativo ocorrer nos insetos. Os arbovírus são transmitidos aos seres humanos e outros animais pela picada de artrópodes hematófagos (ESPOSITO; FONSECA, 2017).

Os arbovírus que causam doenças em humanos e outros animais de sangue quente são membros de cinco famílias virais: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. As arboviroses têm se tornado importantes e constantes ameaças em regiões tropicais devido às rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas, precariedade das condições sanitárias que favorecem a amplificação e transmissão viral (BAXTER; HEISE, 2018). Predominantemente, os arbovírus possuem genoma constituído por RNA de fita simples ou dupla, com exceção daqueles pertencentes à família *Asfaviridae*, cujo material genético é composto por DNA (LEVI; VIGNUZZI, 2019; RUST, 2012).

Dentre as arboviroses mais comuns em ambientes urbanos estão a Dengue (DEN), a Chikungunya (CHIK) e a Zika (ZIK). As manifestações clínicas das arboviroses em seres humanos podem variar desde doença febril (DF) indiferenciada, moderada ou grave, erupções cutâneas e artralgia (AR), a síndrome neurológica (SN) e síndrome hemorrágica (SH) (ZANOTTO; LEITE, 2018). A DF geralmente se apresenta com sintomas de gripe, como febre, cefaléia, dor retro-orbital e mialgia. A SN pode manifestar-se como mielite, meningite e/ou encefalite, com mudanças de comportamento, paralisia, parestesia, convulsões e problemas de coordenação. A AR manifesta-se como exantema ou rash maculopapular, poliartralgia e poliartrite, enquanto que a SH é evidenciada pelas petéquias, hemorragia e choque combinado com uma redução intensa de plaquetas (GIRARD *et al.*, 2020 ZANOTTO; LEITE, 2018; RUST, 2012).

2.2 Gênero *Alphavirus*

Os alfavírus são vírus de RNA de cadeia simples, envelopados e de sentido positivo pertencentes à família *Togaviridae*. Eles são transmitidos por artrópodes e responsáveis por doenças emergentes e reemergentes em humanos. Alguns alfavírus, como por exemplo, CHIKV, Ross River (RRV), Mayaro (MAYV), Semliki Forest (SFV), Sindbis (SINV) e O'nyong-nyong (ONNV) são responsáveis por causar síndromes, que podem se tornar crônicas (LEVI; VIGNUZZI, 2019; BAXTER; HEISE, 2018). Além disso, outros alfavírus, como o vírus da encefalite equina oriental (EEEV), ocidental (WEEV) e venezuelano (VEEV) causam infecção no cérebro e doença neurológica (SILVA; DERMODY, 2017).

Os arbovírus pertencentes ao Velho Mundo, como é o caso do CHIKV, são conhecidos por apresentar tropismo reumático, sendo também chamados de *Alphavirus* artritogênicos (SILVA; DERMODY, 2017; FROS; PIJLMAN, 2016). Dentre as linhagens de CHIKV destacam-se hoje três linhagens: Oeste Africano, Leste-Centro-Sul (ECSA), Asiático e Oceano Índico (IOL). No Brasil, até o momento foram detectadas as linhagens asiática e ECSA (SILVA; DERMODY, 2017; FROS; PIJLMAN, 2016).

2.3 Breve contexto histórico e aspectos epidemiológicos da Chikungunya

O CHIKV foi descrito em 1952-1953 em uma epidemia na África Oriental, especificamente na Tanzânia (FERNANDES; MONTE; BEZERRA, 2023). Chikungunya é uma palavra maconde que significa "aquele que se dobra" referindo-se à postura adquirida pelo indivíduo infectado como resultado de fortes dores nas articulações (BURT *et al.*, 2012). O primeiro surto foi reconhecido durante a era científica moderna, em julho de 1958, quando uma epidemia ocorreu ao longo dos planaltos costeiros de Mawia, Makonde e Rondo, na Tanzânia (HAMMON; RUNDNICK; SATHER, 1960). Após sua descoberta na África Oriental, infecções humanas foram detectadas em Uganda (WEINBREN, 1958). Em 1964, anticorpos foram detectados em primatas não humanos (NHPs) capturados no Zimbábue, e macacos-vervet demonstraram ser hospedeiros de amplificação competentes para CHIKV (PATERSON; MCINTOSH, 1964).

A segunda emergência do CHIKV ocorreu no Quênia, em 2004, que se estendeu pelos anos seguintes por diversas ilhas do Oceano Índico, atingindo a Índia e Sudeste Asiático (HONÓRIO; CÂMARA; CALVET, 2015). Em 2006, nas Ilhas da Reunião, uma epidemia foi resultado de mutações virais, levando a uma transmissibilidade mais eficaz pelo mosquito *Aedes*. (TSETSARKIN; WEAVER, 2011). Leparc-Gofart *et al.* (2014) demonstraram o primeiro caso de transmissão autóctone do vírus nas Américas, na Ilha Sant Martin, uma ilha do nordeste das Antilhas, localizada 250 km ao norte do arquipélago de Guadalupe e 240 km a leste de Porto Rico (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014).

Em 2004, um surto envolvendo a linhagem ECSA começou na costa do Quênia. Em 2005, um grande surto de CHIKV ocorreu em ilhas do Oceano Índico, atingindo vários países da Ásia e causando a infecção de mais de 1,9 milhão de pessoas (TAUIL, 2014). Entre 2006 e 2007, outra grande epidemia pelo CHIKV atingiu a Índia, registrando mais de 1,25 milhão de casos suspeitos. A rápida dispersão geográfica do CHIKV, as condições ambientais favoráveis e o grande número de *Aedes* na região contribuíram para essa ocorrência (GHILDIYAL; GABRANI, 2020; WILL *et al.*, 2021).

Em 2011, o CHIKV foi detectado pela primeira vez na região das ilhas do Pacífico da Nova Caledônia (CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014). A partir de 2012, as ilhas da Oceania foram relatados surtos de CHIKV, mas também com epidemias de vírus da Dengue e Zika vírus (GUBLER, 2015; CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014; MUSSO). Em dezembro de 2013, foi relatada a primeira transmissão local de CHIKV no Hemisfério Ocidental, com casos autóctones identificados na ilha caribenha St.Martin. Em outubro do ano 2013, os primeiros casos autóctones foram diagnosticados na ilha de Saint Martin, no Caribe francês (LEPARC-GOFFART *et al.*, 2014). Desde então, começou uma enorme epidemia que se espalhou para mais de 43 países americanos, onde 1.184.045 casos foram notificados, sendo destes 191 óbitos em 2014 (WEAVER; LECUIT, 2015). A partir daí, o CHIKV se espalhou para a América Central do Sul, e os casos ainda estavam sendo relatados em 2018/2019 (SUHRBIER, 2019). Dados mostram que o genótipo Centro-Leste-Sul-Africano (ECSA), foi o genótipo responsável pela epidemia de Chikungunya no Brasil desde 2014 (SOUZA *et al.*, 2019).

Historicamente, a transmissão urbana do CHIKV era vetorizada principalmente por mosquitos *Aedes* sp. No entanto, muitos dos surtos na bacia do Oceano Índico e no Sudeste Asiático foram atribuídos a cepas circulantes da linhagem do Oceano Índico

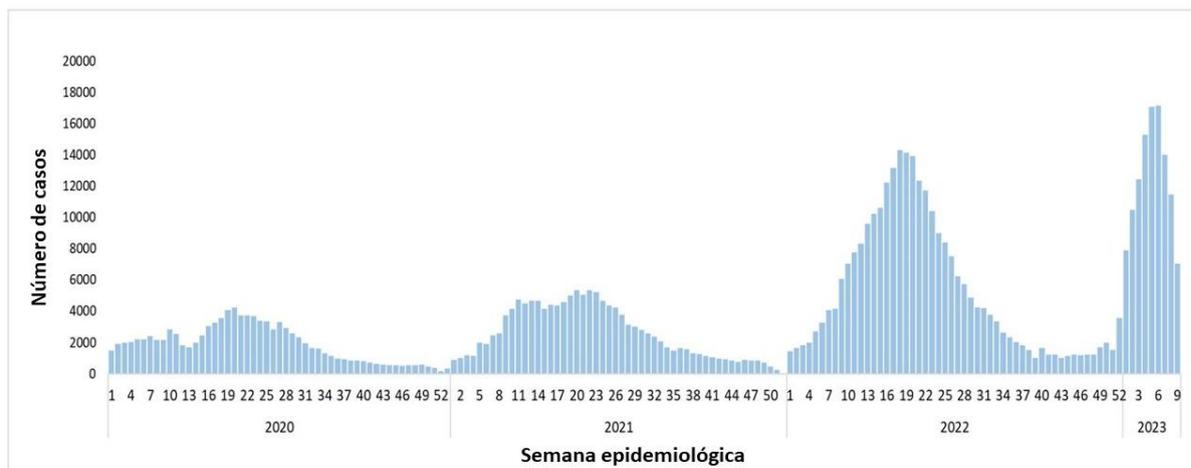
(IOL), um subgrupo recém-emergido dentro do clado ECSA (FERREIRA *et al.*, 2021a; VOLK *et al.*, 2010). Algumas cepas deste subgrupo contêm uma mutação adaptativa (E1-A226V) que aumenta a aptidão viral em mosquitos *Aedes albopictus* (BERRY *et al.*, 2019).

Entre semana epidemiológica (SE) 1 e SE 52 de 2022, um total de 273,685 casos de CHIK foram notificados em 15 dos 52 países e territórios da Região das Américas, dos quais 138,438 foram confirmados. A incidência cumulativa regional para Chikungunya em 2022 foi de 27,56 casos por 100.000 habitantes. O número de óbitos no ano 2022 por CHIK foi de 87 mortes nas Américas (Figura 1). A taxa de crescimento da curva para 2020 foi de 181% da SE 1 até o pico da SE 20, enquanto a taxa de crescimento da curva em 2021 foi de 482%, da SE 1 até o pico da SE 22 (PAHO/OMS, 2022).

A partir da SE 52 de 2022, o Brasil registrou o maior número de casos de CHIK na Região, com 265,289 casos, o que representa (96,8%) do total de casos regionais. A Guatemala segue na contagem de casos com 2,086 casos (1,6%), seguida por Belize com 2,509 casos (0,5%), o Peru com 595 casos (0,3%) e a Bolívia com 249 casos (0,3%). Durante o mesmo período, 87 mortes atribuídas à infecção por Chikungunya foram relatadas no Brasil (PAHO/OMS, 2022).

Em 2022, entre SE 1 e SE 52, a taxa de incidência cumulativa no cone sul foi de 92,40 casos por 100.000 habitantes. Os países com maiores taxas de incidência foram América Central e México com 2,65 casos por 100.000 habitantes, Paraguai com 1,339 casos notificados por 100.000 habitantes e Guatemala com 2,086 casos por 100.000 habitantes (OPS/OMS, 2022). Em 2023 e até 01 de junho, foram relatados 210,371 casos e 251 óbitos. A maioria dos casos foi relatada no cone sul (208,448), Brasil (124,270), Argentina (1,336), Paraguai (82,838). Foram relatadas no Brasil (25) óbitos (PAHO/OMS, 2023). A **Figura 1** mostra o número de casos de CHIK nas Américas por ano, no período de 2008 a 2022.

Figura 1-Distribuição de casos notificados de Chikungunya, por ano, nas Américas, no período de 2020-2023.



Fonte: Dados obtidos da Plataforma de Informação em Saúde para as Américas (PLISA, PAHO/OMS) pelos Ministérios e Institutos de Saúde dos países e territórios da Região. Disponível em: <https://www.paho.org/plisa>. Acessados em 04/02/24.

2.3.1 Epidemiologia dos casos de CHIKF no Brasil e no Ceará

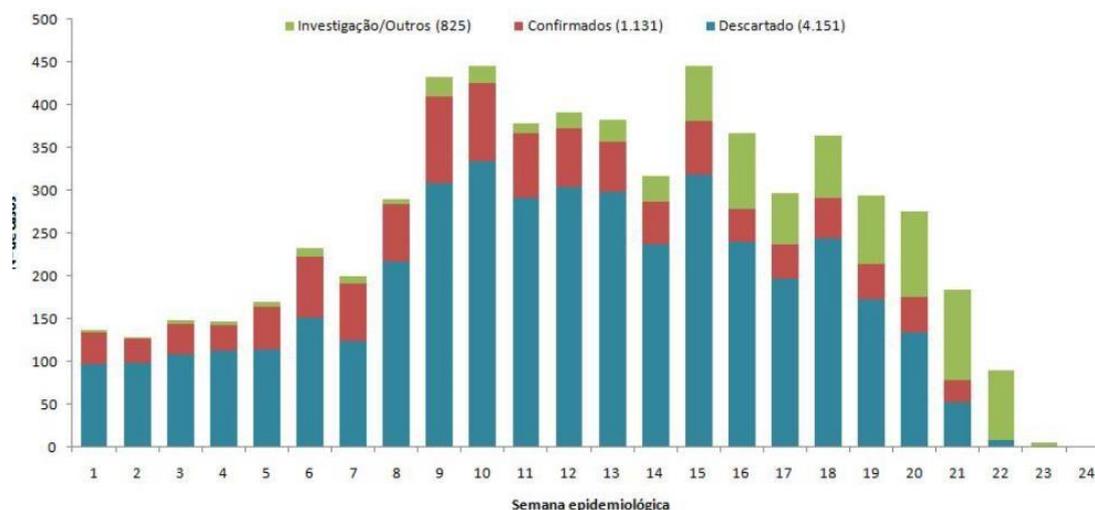
Em setembro de 2014 foi registrada transmissão autóctone no Amapá e na Bahia e, a partir de então todos os estados reportaram casos autóctones da febre Chikungunya (DONALISIO; FREITAS, 2015). Segundo dados obtidos do boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, no ano de 2015, foram registrados 38.332 casos prováveis de CHIKF no Brasil, número que subiu consideravelmente para 277.882 no ano de 2016 (Brasil, 2016). Em 2017, foram registrados 185.854 casos prováveis da doença no país, sendo que para ambas as datas descritas, o maior número de casos se concentrou na região nordeste em relação ao total do país (Brasil, 2018).

Entre dezembro de 2019 e junho de 2020, mais de 48.000 casos de Chikungunya foram notificados e 11 mortes foram confirmadas em decorrência da doença (WILL *et al.*, 2021). Foram notificados em junho de 2021, aproximadamente 41.673 casos prováveis de doença pelo vírus Chikungunya no Brasil. Destes, 21.127 ocorreram na região nordeste, 18.663 na região Sudeste, 605 na região Norte, 655 na região Sul e 623 na região Centro-Oeste (BRASIL, 2021).

O Ceará foi um dos estados brasileiros mais acometidos por CHIKF, apresentando grande taxa de incidência da doença no ano de 2016, caracterizando epidemia, com 49.516 casos suspeitos, 63,6% destes (31.482 casos) foram confirmados (BRASIL, 2021). Em 2017, foram notificados 137.424 casos de CHIKF no Ceará, indicando aumento exorbitante quando comparado ao ano anterior; 75% destes (104.880 casos) foram confirmados, havendo também o registro de 192 óbitos ocasionados pela doença (BRASIL, 2018).

Em 2023 até a SE 24 foram registrados no Sinan 6.107 casos suspeitos de Chikungunya: 18,5% (1.131/6.107) confirmados e 68,0% (4.151/6.107) descartados (**Figura 2**). Dos confirmados, 53,1% (601/1.131) foram por critério laboratorial e 46,9% (530/1.131) por critério clínico-epidemiológico (BRASIL,2023).

Figura 2– Casos de CHIKF segundo classificação e SE, Ceará/2023.



Fonte: SESA/COVEP/CEVEP/Sinan. *Dados exportados em 12/06/2023. A figura representa o número de casos por CHIKV.

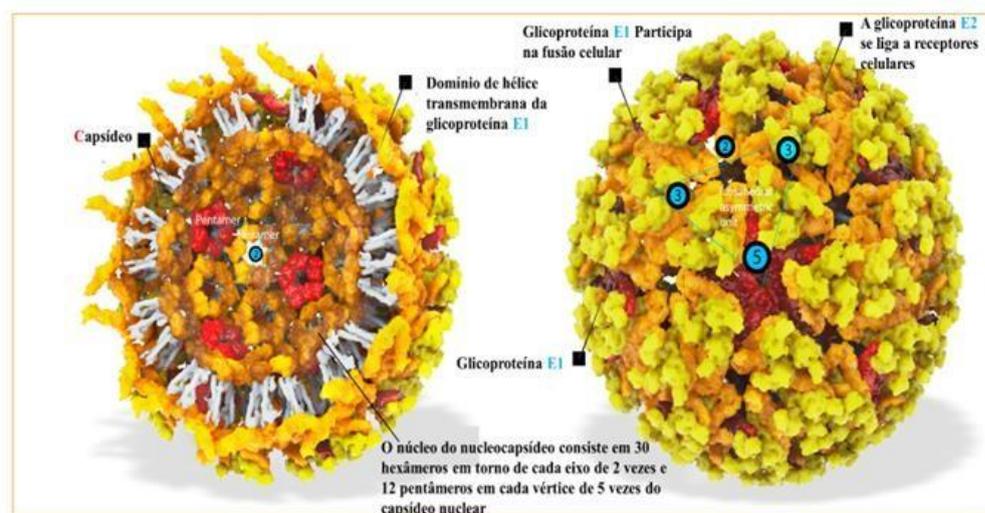
2.4 Características gerais do Chikungunya vírus (CHIKV)

2.4.1 Estrutura e Genoma Viral

O CHIKV é um alfavírus envelopado de 60 a 70 nm de diâmetro, possui um RNA de sentido positivo e com 11,8 kb de comprimento (METZ; PIJLMAN, 2016). O

genoma do CHIKV contém dois quadros de leitura (Open reading frame, ORF): o ORF 5', traduzido do RNA genômico (49S) e codificador de quatro proteínas não estruturais, nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4); e a ORF 3', traduzida a partir de um RNA subgenômico (26S) que codifica uma poliproteína posteriormente clivada na proteína do capsídeo, duas proteínas do envelope (E1 e E2) e dois pequenos peptídeos E3 e 6K (MANZOOR *et al.*, 2022; METZ; PIJLMAN, 2016; THIBERVILLE *et al.*, 2013). O vírus possui um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica constituído pela proteína do capsídeo (Proteína C), que envolve e protege o genoma (METZ; PIJLMAN, 2016; RUPP *et al.*, 2015). As representações esquemáticas da estrutura do CHIKV e organização genômica podem ser observadas nas **Figuras 3 e 4**.

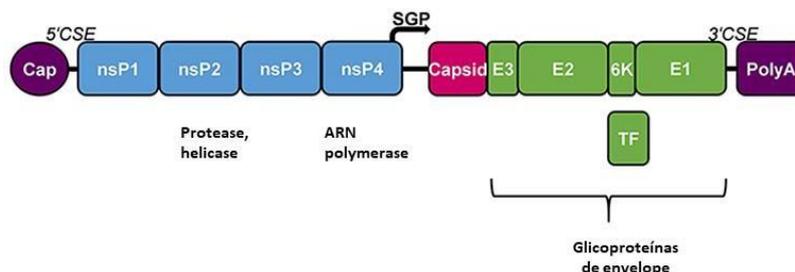
Figura 3– Representação esquemática da partícula de CHIKV



FONTE: adaptada de (SANTOS *et al.*, 2018).

Estrutura do Chikungunya virus. A glicoproteína E1 participa da fusão celular (laranja vermelha), enquanto a glicoproteína E2 se liga aos receptores celulares (amarelo).

Figura 4—Organização estrutural do genoma do CHIKV



FONTE: Adaptada de (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). A figura mostra os diferentes genes que codificam para as proteínas estruturais e não estruturais de CHIKV, bem como as regiões não traduzíveis em 5' e 3'.

2.4.2 Ciclo de Replicação do CHIKV

Após picada do mosquito infectado, o CHIKV é inoculado na pele, dando início ao processo de infecção das células dérmicas (principalmente fibroblastos e macrófagos), caracterizando a primeira fase de replicação do vírus (SILVA; DERMODY, 2017; MUDHAKIR; HARASHIMA, 2009).

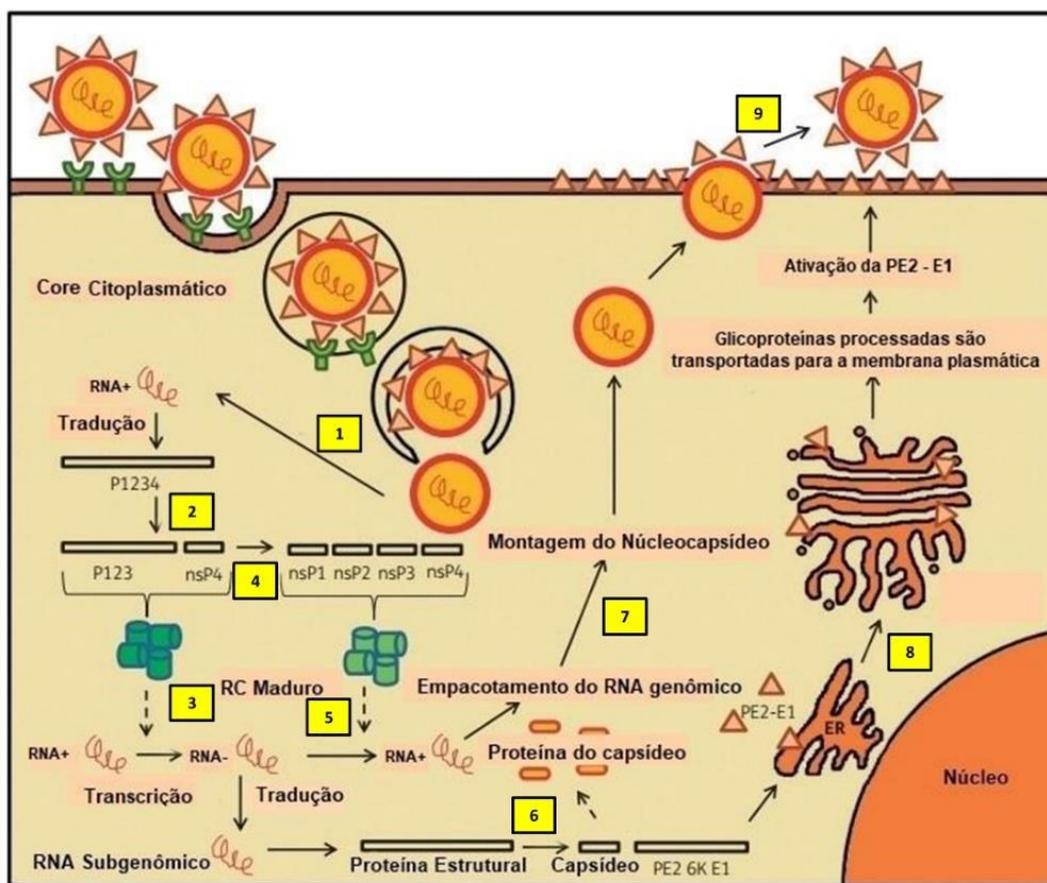
Vários fatores de ligação e receptores putativos para CHIKV e outros alfavírus foram documentados. Os receptores de células de mamíferos para o CHIKV já conhecidos incluem proibitina (PHB) (WINTACHAI *et al.*, 2012), o receptor de fosfatidilserina TIM-1 (MOLLER-TANK *et al.*, 2013), o complexo proteico CD147 (DE CALUWÉ *et al.*, 2021), e a DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*) (PRADO ACOSTA *et al.*, 2019). Mais recentemente, a proteína 1 FHL1 (*Four and a half LIM domains protein 1*) foi descrita como receptor para CHIKV (MEERTENS *et al.*, 2019).

Após a ligação mediada por E2 às células, as partículas virais ligadas ao receptor são internalizadas, principalmente por endocitose mediada por clatrina (ESTOFOLETE *et al.*, 2019). A acidificação endossomal provoca alterações conformacionais nas glicoproteínas virais promovendo a dissociação de E1 e consequente ativação da fusão do envelope viral à membrana endossomal, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma celular o qual se desnuda dando início à replicação (MANZOOR *et al.*, 2022). Após a

liberação no citoplasma, o nucleocapsídeo se desmonta para entregar o RNA viral genômico (vRNA) no citosol para iniciar a tradução (VAN DUIJL-RICHTER *et al.*, 2015; BERNARD *et al.*, 2010).

O RNA antigênômico serve como molde para a síntese de RNA genômico, bem como a transcrição de mRNA subgenômico 26S que codificará poliproteínas estruturais (C-E3-E2-6K-E1) associadas ao retículo endoplasmático e complexo de Golgi (**Figura 5**) (SILVA; DERMODY, 2017; SPUUL *et al.*, 2010).

Figura 5–Representação esquemática do ciclo de replicação do CHIKV em células de mamíferos (entrada, replicação intracelular e maturação do vírus).



FONTE: Adaptada de (CHING; FP NG; CHAI, 2017). Ciclo de replicação viral: (1) O vírus entra na célula por endocitose mediada por receptor. (2,3) A uma vez que a internalização ocorre, as condições ácidas do endossoma produzem uma mudança na conformação do envelope do vírus que permite a fusão das membranas e a liberação do nucleocapsídeo. (4,5) O genoma viral é liberado no citoplasma, as proteínas não estruturais são traduzidas, o vírus é montado. (6) Complexo de replicação e um RNA antisense é sintetizado, o qual é usado como molde para a síntese de RNA genômico e RNA subgenômico, a partir dos quais são sintetizadas as proteínas estruturais (7, 8 e 9). Essas proteínas são processadas e direcionadas para a membrana onde a partícula viral é montada e liberada por brotamento.

2.5 Vetor e transmissão do CHIKV

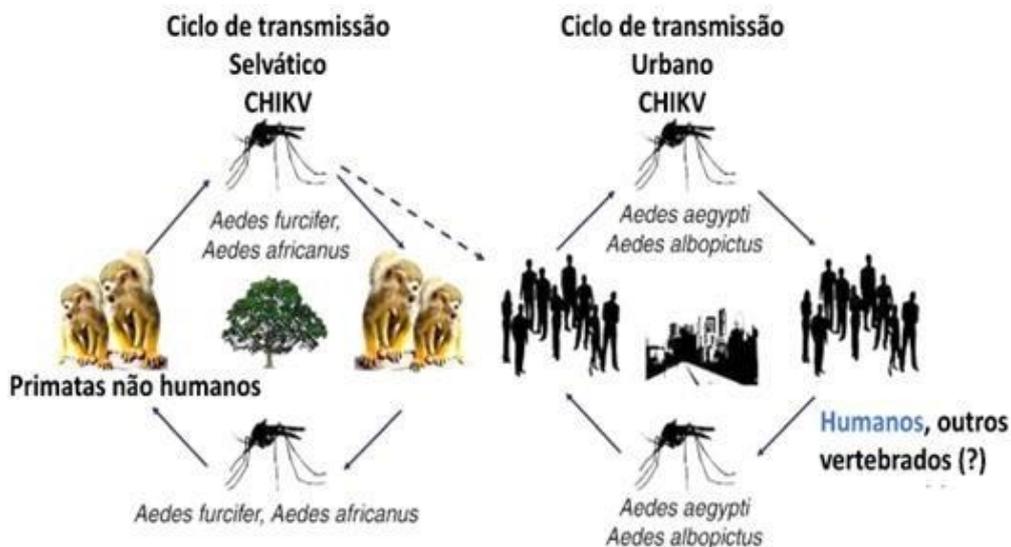
O termo –arbovírus‖ tem origem da expressão inglesa “*arthropod-borne virus*”, sendo utilizado para designar os vírus que são transmitidos e mantidos na natureza em ciclos silvestres e ou urbanos, relacionados a vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados suscetíveis (MANIERO *et al.*, 2016). O CHIKV é mantido na natureza por meio de dois ciclos de transmissão, o enzoótico (selvagem) e o epidêmico (urbano) (WEAVER; CHEN; DIALLO, 2020).

O ciclo enzoótico, tem sido descrito em ambientes de florestas africanas, principalmente infectando primatas não humanos, sendo as espécies de mosquitos do gênero *Aedes* característicos destes ambientes, tais como *A. furcifer*, *A. taylori* e *A. africanus* (WEAVER; CHEN; DIALLO, 2020). No ciclo de transmissão urbano, a transmissão ocorre entre o homem e o mosquito e tem como principais vetores mosquito *A. aegypti* e *A. albopictus* (MANZOOOR *et al.*, 2022; THIBOUTOT *et al.*, 2010). A **Figura 6** ilustra o ciclo silvestre que afeta primatas e mosquitos e o ciclo urbano que afeta os seres humanos.

2.5.1 Mosquitos *Aedes aegypti*

A palavra *Aedes aegypti* deriva do grego aēdēs, –odioso‖, e do latim *aegypt* –do Egitol (GADELHA; TODA, 1985). O *A. aegypti* teve origem no continente africano e está amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais. Por ser um mosquito fortemente adaptado ao ambiente urbano, seus locais de reprodução mais comuns são os recipientes artificiais que acumulam água, como garrafas, pneus, latas e potes (LIMA-CAMARA, 2016). Os ovos de *A. aegypti* resistem à desidratação e temperatura elevada, mantendo-se viáveis por longos períodos, de sete meses a um ano. Esta propriedade constitui uma vantagem evolutiva que dificulta notavelmente a erradicação do vetor (HONÓRIO *et al.*, 2015; MONTERO, 2015).

Figura 6–Ciclo selvático/ urbano de transmissão do CHIKV.



FONTE: Adaptada de (MADARIAGA; TICONA; RESURRECCION, 2016). Primatas não humanos servem como reservatório do vírus. Mosquitos *Aedes* infectados picam e infectam humanos, que por sua vez infectam o *Aedes aegypti* peridoméstico, sustentando o ciclo urbano de transmissão do CHIKV.

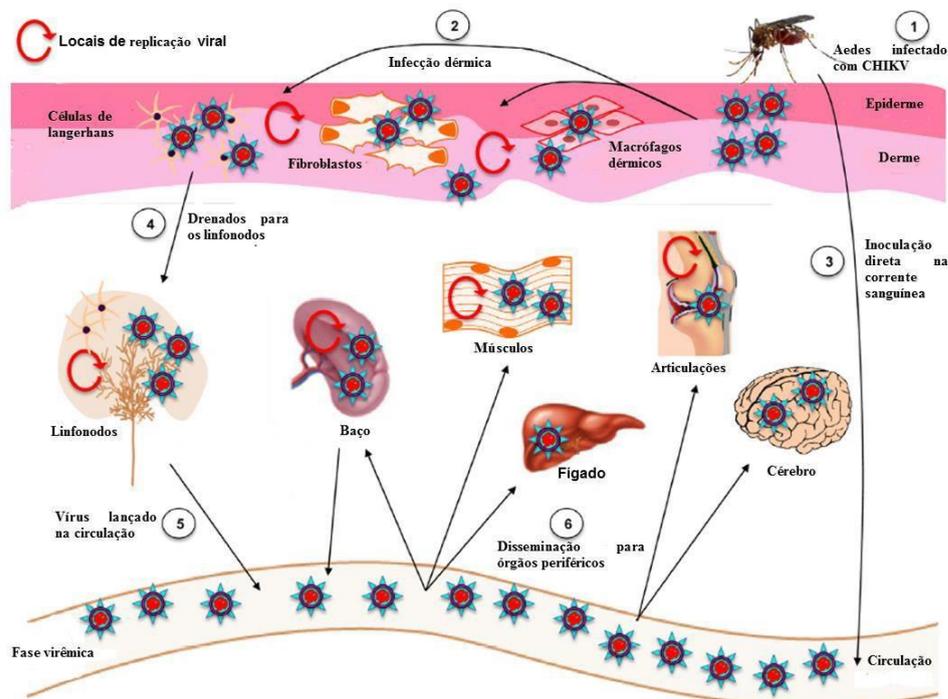
2.6 Patogênese da infecção por CHIKV

A transmissão do CHIKV ocorre pela picada de *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus* infectados. As partículas virais são capturadas por células dendríticas, as quais migram para os gânglios linfáticos, com o objetivo de apresentar os antígenos aos linfócitos T, mas também transferem os vírus para os monócitos e macrófagos presentes nos linfonodos (SILVA; DERMODY, 2017; LUM; NG, 2015).

Os vírus se replicam no interior de monócitos e macrófagos, e essas células infectadas entram na corrente sanguínea causando viremia e levando os vírus para órgãos-alvo específicos, principalmente as articulações, bem como baço, fígado, rins, músculos, cérebro, dentre outros (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014; SILVA; DERMODY, 2017). Durante a fase de viremia, o vírus pode ser facilmente transmitido aos mosquitos durante a hematofagia. A viremia é normalmente eliminada dentro de dois a dez dias após a infecção (LI *et al.*, 2023; DONALISIO; FREITAS, 2015). O período de incubação é de dois a sete dias e é seguido por um início súbito de doença clínica sem fase prodrômica (AMARAL *et al.*, 2022; GOTAY; RODRIGUES;

YAOCHITE, 2023). A **Figura 7** ilustra a fisiopatologia da infecção por CHIKV.

Figura 7- Mecanismos de patogênese da infecção por CHIKV



FONTE: Adaptada de (LUM; NG, 2015). Representação da disseminação viral e ativação da resposta imune do hospedeiro. (1) A infecção pelo CHIKV ocorre através da picada de um mosquito infectado (2) caracterizando a fase de infecção dérmica. As células residentes na pele são infectadas, permitindo as rodadas iniciais de replicação viral. (3) O vírus se dissemina para os linfonodos de drenagem. (4) O vírus é liberado na circulação (5,6) Em seguida, ele se dissemina para órgãos periféricos, como articulações, baço e músculos, onde ocorre a replicação adicional.

2.7 Manifestações da Febre Chikungunya

Nos achados clínicos da CHIKF, a maioria dos indivíduos infectados apresenta sintomatologia, sendo raros os pacientes assintomáticos. Alguns estudos mostram que a estimativa para taxas de infecção assintomática por CHIKV pode chegar a 13% (BUSTOS CARRILLO; GORDON; HARRIS, 2019). A classificação da CHIKF inclui três fases, sendo elas a fase aguda, subaguda e crônica, estando estas associadas a uma gama de sintomas diferentes (SIMON *et al.*, 2015) (**Tabela 1**).

2.7.1 Fase Aguda da CHIKF

As características distintivas do início da CHIKF são geralmente febre, poliartralgia, dores e edemas nas articulações. Queixas clínicas de cefaléia, dores nas costas, mialgia, náuseas/vômitos, diarreia, fotofobia, dor retro orbital muitas vezes acompanhadas de poliartrite podem ocorrer. A febre é frequentemente de início rápido e de alto grau sendo que a temperatura corporal é média de 39,8°C e duração da febre de 4,88 dias (HOSSAIN *et al.*, 2018). A CHIK aguda comumente também envolve uma erupção cutânea, geralmente maculopapular e localizada predominantemente no tronco e extremidades, mas também ocorre com menos frequência na face, palmas das mãos ou plantas dos pés (PAIXÃO *et al.*, 2018).

2.7.2 Fase crônica da CHIKF e mecanismos relacionados à ocorrência de dor nos pacientes com CHIKF

A fase crônica caracteriza-se pela dor articular persistente similar a uma artrite reumatoide, e pela dor musculoesquelética e neuropática de padrão contínuo, após três meses dos sintomas iniciais. Geralmente, os pacientes com doença crônica acabam se recuperando no período 3 a 24 meses após infecção. No entanto, uma porcentagem de pacientes persiste com a dor por muitos anos (SUHRBIER, 2019). Além da dor com ou sem edema, limitação de movimento e rigidez articular matinal, pode levar à deformidade nos ossos ao longo dos anos (BRITO *et al.*, 2016). Cerca de 1% dos pacientes com CHIKF em fase crônica poderão evoluir com artropatia destrutiva semelhante à artrite psoriática ou reumatoide, incluindo fator reumatoide positivo (ABELLA *et al.*, 2019; SILVA; DE LIMA; WANDENKOLK, [s.d.]).

Resultados de ressonância nuclear magnética evidenciam derrame articular, erosões ósseas, edema ósseo, espessamento sinovial, tendinite e tenossinovite. Essa observação contribui para a classificação da artrite por Chikungunya como uma artrite crônica inflamatória erosiva. Queixas neurológicas podem estar presentes em 40% dos pacientes. Destes, 10% irão evoluir com manifestações persistentes (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016).

Uma das consequências dos impactos da cronicidade mais comuns em decorrência das limitações físicas é a redução do nível de relações sociais do indivíduo, que associada a várias complicações neurológicas, devido à natureza neurotrópica do

vírus, refletida em repercussões psicológicas, como depressão e ansiedade. A CHIKF causou um impacto financeiro de R\$ 2,3 bilhões, representando cerca de 2% do orçamento de saúde esperado para o Brasil em 2016, causado pelo afastamento de pacientes infectados das suas respectivas atividades laborais (SIMÕES *et al.*, 2022; SOUSA; SILVA; CASTRO, 2018; LIRA, 2017; CHANDAK *et al.*, 2009).

Os mecanismos fisiopatológicos da dor musculoesquelética e da artrite crônica após a infecção pelo vírus Chikungunya são parcialmente compreendidos. A neuropatia periférica com predominância do componente sensorial é a apresentação mais comum. A neuropatia motora é rara. Pensa-se que a dor e a parestesia podem estar associadas à neuropatia compressiva (Saxena *et al.* 2008).

Saxena *et al.* (2008) demonstraram por meio de exame eletroneuromiográfico e avaliação física neurológica que pacientes com chikungunya apresentam frequentemente dor neuropática periférica. Sabe-se que a dor neuropática, geralmente é descrita como uma sensação de choque elétrico ou queimação, é está associada a uma maior dificuldade no seu manejo. No mesmo estudo foi demonstrado que a dor durante a CHIKF pode ter origem mista, com participação de mecanismos nociceptivos e neuropáticos.

2.7.3 Formas atípicas e graves da CHIKF

A infecção pelo CHIKV pode resultar em manifestações graves, sendo as mais prevalentes a falência cardíaca (BRITO, 2017). A CHIKF também pode resultar em complicações neurológicas, com mortalidade frequentemente associada a doenças do sistema nervoso central (SNC), incluindo encefalite e encefalopatia (MEHTA *et al.*, 2018). Neuropatia periférica com predomínio de componente sensitivo é a apresentação mais comum sendo que, neuropatia motora é rara. Acredita-se que dor e parestesia podem estar associadas à neuropatia compressiva (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016). A insuficiência renal também pode ocorrer com frequência em casos graves de CHIKF e é uma causa de morte relatada (MERCADO *et al.*, 2018; ECONOMOPOULOU *et al.*, 2009). A **Tabela 1** mostra as diferentes complicações causadas pela infecção pelo CHIKV.

Tabela 1– Manifestações típicas e atípicas da doença por CHIKV

<i>Órgão/Sistema</i>	<i>Manifestações Típicas</i>	<i>Manifestações Atípicas</i>
Músculoesquelético	Artralgia; artrite; mialgia; edema articular; tenossinovite; dor lombar; poliartralgias persistentes ou recidivantes	Reumatismo inflamatório crônico; destruição articular
Dermatológico	Exantema; eritema	Dermatose bolhosa; hiperpigmentação; estomatite
Neurológico	Dor de cabeça	Meningoencefalite; encefalopatia; convulsões; anormalidades neurossensoriais; Síndrome de Guillain- Barré; paresia; paralisias; neuropatia
Gastrointestinal		Náusea; vômito; dor abdominal. anorexia; diarreia

Fonte: (SILVA; DERMODY, 2017).

2.7 .4 Diagnóstico e Tratamento da CHIKF

Existem diferentes testes laboratoriais disponíveis para constatar a infecção por CHIKV, sendo estes realizados a partir da obtenção de amostras de sangue, soro ou

plasma do paciente. Contudo, nos casos de acometimento neurológico, amostras de líquido cefalorraquidiano também podem ser coletadas. Três tipos principais de métodos são utilizados para conceder o diagnóstico de CHIKF sendo eles: sorologia, isolamento viral e as técnicas moleculares de reação em cadeia da polimerase, o RT-PCR (do inglês, *Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) e RT-qPCR (do inglês, *Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time*). A escolha do exame laboratorial mais adequado para cada caso baseia-se principalmente na data de início das manifestações clínicas, bem como na especificidade do teste (FINNERUP *et al.*, 2015).

Até o momento, não há tratamento antiviral específico para CHIKF. A terapia utilizada é de suporte sintomático, hidratação e repouso. Na dor de leve intensidade, tanto a dipirona como o paracetamol são bons analgésicos quando utilizados nas doses e intervalos corretos (ALVES, 2022). O metotrexato (MTX), na dose média de 15mg por semana, parece ser benéfico nas poliartrites reumáticas inflamatórias desenvolvidas após a Chikungunya. O MTX tem sua utilização justificada pela observação da presença de monócitos e macrófagos no tecido sinovial de pacientes crônicos, possivelmente pela persistência do vírus nessa localidade. Os casos com artralgia prolongada e rigidez articular podem se beneficiar de um programa progressivo de fisioterapia. O movimento e o exercício moderado tendem a melhorar a rigidez matinal e a dor, porém o exercício intenso pode exacerbar os sintomas álgicos (ABELLA *et al.*, 2019).

2.8 Resposta imune na infecção por CHIKV

Estudos têm demonstrado a ativação de diversos mecanismos de resposta imunológica desencadeada pelo hospedeiro durante o processo de infecção por CHIKV. Contudo, é importante salientar que tais mecanismos podem apresentar-se de modo distinto em decorrência da influência de diversos fatores inerentes ao próprio hospedeiro e, por tanto, precisam de uma melhor compreensão. Sabe-se que uma vez inoculado em indivíduo suscetível, o vírus possui a capacidade de infectar uma variedade de células humanas (SILVA JR *et al.*, 2018; LEUNG; NG; CHU, 2011).

De maneira pragmática, evidenciou-se que CHIKV tem como principal alvo os fibroblastos musculares, articulares e dérmicos, possuindo também a capacidade de

infectar células satélites musculares humanas, as quais podem funcionar como pequenos reservatórios do vírus durante um período prolongado, o que pode implicar na persistência da infecção e evolução de CHIKV para o estágio crônico, com uma possível continuidade da resposta imunológica (CHEN *et al.*, 2016; THIBERVILLE *et al.*, 2013).

No entanto, é importante destacar que a eficácia da resposta imunológica pode sofrer impactos em decorrência da idade, sendo os indivíduos idosos são comumente afetados pela permanência dos sintomas articulares provenientes da infecção por CHIKV (AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017).

2.8.1 Resposta Imune Inata ao CHIKV

O mecanismo pelo qual o CHIKV inicia a resposta imune é semelhante ao observado para outros vírus de RNA. A resposta imune inata começa com o reconhecimento do RNA viral por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (BUCARDO *et al.*, 2021; HE *et al.*, 2013; THOMPSON; MATTA; BARNES, 2018). No caso do CHIKV, o RNA ativa os receptores *Toll-like* (TLR-3 e TLR-7/8) e os receptores *RIG-like* (RIG-I e MDA5) (SENGUPTA *et al.*, 2021; DUTTA; TRIPATHI, 2017; HE *et al.*, 2013).

2.8.1.1 Receptores TLRs Endossomais: TLR-3, TLR-7 e TLR-8

O reconhecimento de componentes microbianos por receptores *Toll-like* (TLRs) é um evento crucial nas respostas do hospedeiro ao patógeno. Os TLRs pertencem a uma família de proteínas que detectam patógenos invasores ou endógenos, desencadeando sinais que iniciam a resposta imune inata (DUAN *et al.*, 2022; BALKA; DE NARDO, 2019). A **Figura 8** mostra como se dá a ativação de receptores *Toll-like* e o recrutamento de moléculas adaptadoras.

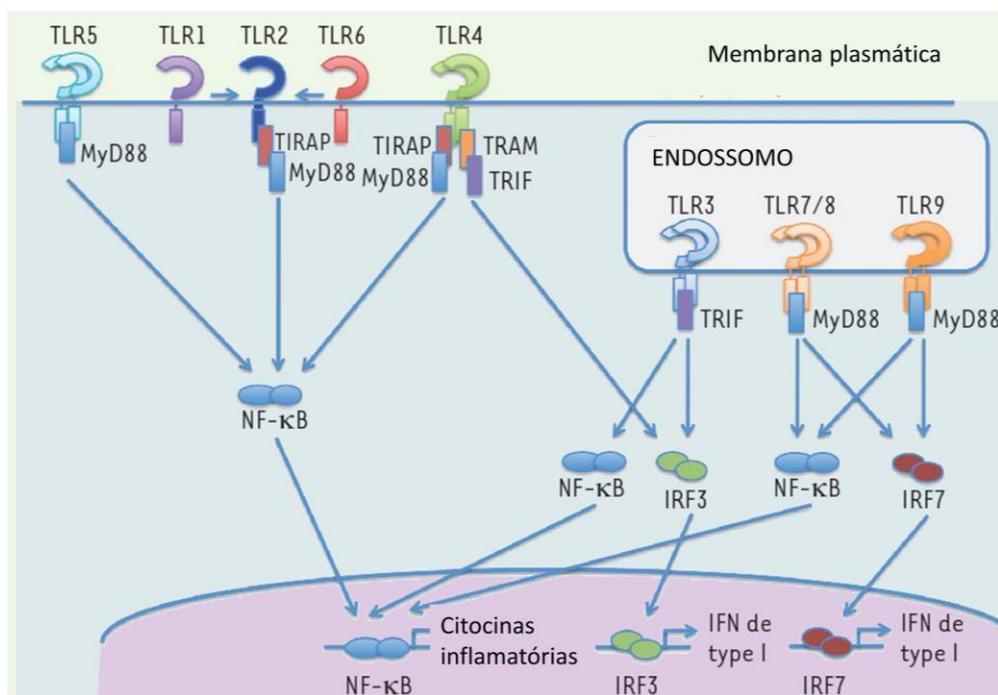
Os TLRs também detectam ácidos nucleicos e desempenham um papel fundamental no reconhecimento de vírus. Os TLRs que fazem esse reconhecimento são: TLRs- 3, 7, 8 e 9. O TLR-3 reconhece moléculas RNA de cadeia dupla presentes na maioria dos vírus de RNA e de DNA; o TLR-7 e o TLR-8 reconhecem moléculas de

RNA de cadeia simples ssRNA (*single-stranded* RNA: ssRNA); e o TLR-9 reconhece o DNA de sequências CpG não metiladas (AVENDAÑO-TAMAYO *et al.*, 2019; HER *et al.*, 2015; SIRONI *et al.*, 2012).

O gene *TLR3* localiza-se no cromossomo 4 e codifica para o receptor TLR-3, que é expresso no interior de muitos tipos de células, incluindo células da microglia, mastócitos, eosinófilos, macrófagos, células natural killer (NK), e células dendríticas, contudo apresenta menor expressão em linfócitos B e T (MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019; YOKOTA; OKABAYASHI; FUJII, 2010). O TLR-7 é predominantemente expresso em células plasmocitóides e está envolvido na forte indução de IFN- α , e o TLR-8 tende a ser detectado em monócitos (WANG *et al.*, 2019).

Após a ativação dos TLRs, duas vias intracelulares podem seguir. A via dependente de MyD88 desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-12p40. Em seguida, MyD88 recruta várias moléculas sinalizadoras, como IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*), IRAK1 e TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*), o que leva à ativação e translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B que induz a transcrição genes de citocinas pró-inflamatórias (DUAN *et al.*, 2022). Uma vez que TRIF é ativado (via sinalização de TLR-3 ou TLR-4) ele se liga a TRAF3 e TBK1, ativando finalmente IRF-3, IRF5 e IRF-7 para enfim estimular a produção de interferons do tipo I (LI *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2013;) (**Figura 8**).

Figura 8– Via de sinalização dos receptores *Toll-like* (TLRs)



FONTE: Adaptado por GOTAY, 2021 baseado em HE *et al.*, (2013). A Detecção de PAMPs por TLRs induz uma mudança conformacional permitindo a interação e o recrutamento de moléculas adaptadoras que levam a liberação de citocinas inflamatórias e moléculas antivirais (interferons tipo I).

Em uma segunda via de ativação, o sinal emitido pelo ectodomínio desses receptores permite o recrutamento de fatores reguladores de interferon (IRFs), induzindo a transcrição de interferons antivirais (interferons do tipo I: IFN- α e IFN- β) e citocinas pró-inflamatórias (ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, 2021). A liberação de IFNs tipo I controla a replicação viral nas células e a progressão viral durante a infecção aguda. Estudos mostram que a sinalização ineficiente de IFNs tipo I é um fator de risco para desenvolver formas graves de doença associada ao CHIKV (WEBB *et al.*, 2020; NARENDRA *et al.*, 2014).

Em humanos, o IFN- α é liberado precocemente e é detectado no primeiro dia de infecção por CHIKV. Além disso, sua concentração correlaciona-se com a carga viral plasmática (RUIZ *et al.*, 2023; WEBB *et al.*, 2020). Modelos experimentais mostram uma indução precoce de IFN- α , MCP-1/CCL-2 e IL-6, seguido pela detecção de MIP-1 α /CCL-3 e MIP-1 β /CCL-4, IFN- γ e TNF (COOK *et al.*, 2019; POO *et al.*, 2014).

2.8.2 Resposta Imune Adaptativa ao CHIKV

Os sintomas de CHIKF aguda são causados por dano celular direto e inflamação local. No entanto, as contribuições específicas da replicação viral e da imunidade adaptativa do hospedeiro à infecção por CHIKV ainda precisa ser totalmente elucidada (BEZERRA *et al.*, 2023).

As células T e B desempenham um papel essencial na resposta imune contra o CHIKV e a patogênese da doença articular associada ao CHIKV (LEE *et al.*, 2015). Um estudo realizado na fase crônica da doença, usando modelo de camundongos Rag1^{-/-} (desprovidos de células T e B maduras) infectados por CHIKV, demonstrou que o RNA viral persistiu em tecidos associados à articulações. Por outro lado, em camundongos imunocompetentes o RNA viral foi removido dos tecidos, sugerindo que o sistema imunológico adquirido é necessário para a eliminação do CHIKV (HAWMAN *et al.*, 2013). O desenvolvimento de anticorpos neutralizantes anti-CHIKV é essencial para o controle da viremia. Em humanos e camundongos, a resposta imune mediada por anticorpos parece ter como alvo a glicoproteína E2 do envelope do CHIKV (CHUA *et al.*, 2017; WEBER; BÜCHNER; SCHNIERLE, 2015).

2.8.3 O papel das citocinas e quimiocinas como biomarcadores na infecção pelo CHIKV

As citocinas desempenham importante papel na imunidade, sendo responsáveis por coordenar o desenvolvimento e a atividade do sistema imunológico (FERREIRA *et al.*, 2021b; ROSE-JOHN, 2018). Sabe-se que estas moléculas estão envolvidas na exacerbação e inibição dos sintomas clínicos decorrentes de diferentes processos infecciosos, contribuindo para a resolução ou progressão de uma determinada doença (CAO; DIAMOND; MYSOREKAR, 2017). Durante uma infecção viral, ocorre uma reação aguda da célula infectada, esta característica envolve uma série de processos, tais como a ativação de um mecanismo de defesa antiviral preexistente e a produção de citocinas específicas com o intuito de limitar a disseminação viral (CHIRATHAWORN; CHANSAENROJ; POOVORAWAN, 2020).

Em 2015, um estudo de revisão sistemática analisou pela primeira vez os perfis de mediadores imunes em pacientes com CHIKF de 14 coortes realizadas entre 2007 e

2010 em diferentes localidades. A comparação dos níveis de mediadores imunológicos em pacientes infectados com CHIKV comparados com controles saudáveis demonstrou níveis significativamente elevados de diversas citocinas (IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-1Ra, IL-4 e IL-10), quimiocinas (CXCL10, CCL2, CCL9, CCL3) e do fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF- β) (RESTREPO *et al.*, 2022; TENG *et al.*, 2015).

Análises demonstraram que o perfil de citocinas na infecção por CHIKV é semelhante aos encontrado durante a artrite (FERREIRA *et al.*, 2021b; MORI *et al.*, 2011). IL-1beta e IL-6 são responsáveis pela febre de alto grau (NG *et al.*, 2009). Além disso, a alta expressão de IL-6 também foi implicada na perda óssea em outros distúrbios ósseos, como na artrite reumatoide (CASTANEDA; GARCÉS-PUENTES; BERNAD PINEDA, 2021). Níveis elevados de IL-1 β e IL-6 podem mediar o desenvolvimento de artralgia abrupta e persistente, uma vez que estão envolvidas na imunopatogênese de artropatias, como a artrite reumatoide (FERIA DÍAZ *et al.*, 2020). Além disso, níveis da quimiocina CCL5 foram significativamente mais elevados em pacientes com CHIKF grave (JACOB-NASCIMENTO *et al.*, 2021). Níveis aumentados de CCL-2, IL-6 e IL-8 foram quantificados no líquido sinovial de pacientes infectados com CHIKV (ASSUNÇÃO-MIRANDA; BOZZA; DA POIAN, 2010).

Os IFNs são proteínas capazes de limitar a replicação/disseminação do CHIKV, podem induzir uma resposta imune potente do hospedeiro regulando citocinas pró-inflamatórias (RESTREPO *et al.*, 2022). Estudos *in vitro* demonstraram que as células não hematopoiéticas infectadas com CHIKV são capazes de controlar a infecção produzindo IFNs do tipo I (SCHILTE *et al.*, 2010). Pesquisas conduzidas por Locke *et al.*, (2022) mostraram que os níveis séricos de IFN- α apresentaram-se elevados em pacientes com carga viral mais alta por CHIKV, quando comparados com aqueles com carga viral mais baixa, sugerindo que a carga viral mais elevada induz produção de IFN- α (LOCKE *et al.*, 2022). O IFN- α é um importante biomarcador, que é regulado positivamente durante a infecção por CHIKV (LOCKE *et al.*, 2022).

2.9 Papel dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na resposta imune

Pouco se conhece a respeito os fatores do hospedeiro que regulam a susceptibilidade à infecção por CHIKV. Acredita-se que as infecções por CHIKV e o desenvolvimento das formas mais graves da doença sejam influenciados pelas características genéticas do hospedeiro (BUCARDO *et al.*, 2021; DUTTA; TRIPATHI, 2017). Dentre dos fatores genéticos, os SNPs são variações no DNA caracterizadas por uma mutação simples na sequência genômica de determinada população. Estes sítios no genoma, onde variantes de um nucleotídeo são comuns na população, representam a maior fonte de variabilidade genética interindividual, podem não ter consequências patológicas diretas, embora diversos estudos tenham mostrado associações entre SNPs com a progressão da doença (DUTTA; TRIPATHI, 2017; SINGH *et al.*, 2021).

Variações nos genes que codificam os TLRs podem conferir suscetibilidade para determinadas infecções, contribuindo assim para um risco aumentado (BUCARDO *et al.*, 2021; KINDBERG *et al.*, 2011). Os SNPs dependendo da sua localização podem influenciar a função dos TLRs. Assim, caso a variação se encontre na região que codifica o ectodomínio do receptor, esta pode afetar a ligação deste com o ligante (GAO *et al.*, 2015). A presença do SNP na região que codifica o domínio transmembranar ou no domínio citoplasmático pode alterar a capacidade de transmitir o sinal para o interior da célula e alterar a interação com as moléculas adaptadoras intracelulares, respetivamente (MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019).

Os fatores genéticos do hospedeiro, portanto, possuem relevante importância para o melhor entendimento das múltiplas variações interindividuais comumente encontradas em portadores de doenças infecciosas e, com isso, não podem ser negligenciados, uma vez que a hereditariedade parece exercer uma influência central no desfecho clínico de diversas enfermidades (SINHABABU, 2019; CASANOVA; ABEL, 2013; MUKHERJEE; HUDA; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

2.9.1 SNP 1234 C/T do gene do *TLR3* (rs3775291)

O gene do receptor TLR-3 (*TLR3*) está localizado na região 35 do braço longo do cromossomo 4 (4q35) e codifica a glicoproteína integral de membrana de mesmo nome. O receptor TLR-3 é expresso dentro do compartimento endossomal de células

dendríticas convencionais, macrófagos e linfócitos T (THOMAS *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2020). O SNP rs3775291 leva a uma alteração *missense* funcional caracterizada pela variação 1234 C>T que resulta na mudança do resíduo de aminoácido leucina para fenilalanina na posição 412 (L412F) (SÁ *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2011).

O polimorfismo L412F tem uma frequência alélica geral de cerca de 20%, variando de 30% nas populações europeias a 0,88% nas populações africanas (principalmente subsaarianas) (CROCI *et al.*, 2022). Experimentos *in vitro* mostram que a proteína variante da fenilalanina não é eficientemente secretada no meio de cultura e tem uma capacidade reduzida de ativar a expressão (CROCI *et al.*, 2022). Outros estudos demonstraram que esse polimorfismo gera uma alteração na estrutura do domínio de ligação do receptor ao ligante (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011).

Este SNP tem sido associado à algumas doenças virais, como na Dengue, Zika (SÁ *et al.*, 2015; FANG *et al.*, 2012). O alelo T da variante *TLR3* 1234 C/T rs3775291 em mulheres infectadas com ZIKV durante a gravidez foi associado à microcefalia grave (RIBEIRO *et al.*, 2019). Além disso, essa mesma variante já foi associada ao aumento do risco de infecção por CHIKV (DUTTA; TRIPATHI, 2017).

É possível que o Leu412Phe possa afetar a glicosilação da asparagina 413 ou impedir a interação de sua porção glicana com o dsRNA, explicando assim a atividade de sinalização reduzida (BIYANI *et al.*, 2015; MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019). Ensaio baseado em luciferase dupla mostraram que o TLR-3 contendo a fenilalanina reduz a ativação de NFκB em 50% em comparação com o TLR-3 contendo leucina (ZHOU *et al.*, 2011). Estudos conduzidos por Bucardo *et al.* (2021) mostram que o polimorfismo rs3775291 promove maior suscetibilidade à infecção por CHIKV (BUCARDO *et al.* 2021). Outros estudos realizados por Singh *et al.* (2021) demonstram que SNPs no gene *TLR3* foi associado a risco de infecção por DENV (SINGH *et al.*, 2021).

2.9.2 SNP *TLR7* 3' UTR C/G (rs3853839) e *TLR8* 129 C/G (rs3764879)

O cromossomo Xp22 abriga os genes *TLR7* e *TLR8* que codificam a proteínas de mesmo nome (MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019). Estudos que caracterizaram o gene *TLR7*, identificaram que o polimorfismo rs3853839 consiste

numa substituição de C /G, na posição 32 de cDNA, sendo responsável por glutamina à leucina na posição 11 na sequência de aminoácidos (BORTOLOTTI *et al.*, 2021; DUTTA; TRIPATHI, 2017). Esse SNP (rs3853839) afeta a função do receptor levando a uma menor produção de IFNs e de citocina próinflamatórias (WANG *et al.*, 2019). Por outro lado, esse mesmo SNP foi associado ao aumento da expressão de mRNA de *TLR7* e da proteína TLR-7 (SOUYRIS *et al.*, 2019; SHEN *et al.*, 2010).

Estudos realizados por Shen *et al.* (2010) demonstraram que indivíduos com o alelo G apresentavam níveis de expressão da proteína TLR-7 mais elevados do que os dois portadores do alelo C (SHEN *et al.*, 2010).

Estudos mostraram que o SNP rs3764879 apresentou as seguintes frequências alélicas na população Chinesa: o alelo C 16% e G em 83%. O mesmo estudo mostrou que este SNP alterou a expressão do receptor TLR-8 (CHENG *et al.*, 2007).

Estudos conduzidos por Dutta e Tripathi (2017) demonstraram que os polimorfismos de TLR-7 3' UTR C/G (rs3853839) e TLR8 129 C/G (rs3764879) foram significativamente associados à infecção por CHIKV. No mesmo estudo, a variante rs3853839 foi associada com a febre, dor articular e erupção cutânea, respectivamente. Outros estudos do tipo caso/controle demonstraram que a presença do polimorfismo genético rs3764879 pode influenciar na suscetibilidade para o desenvolvimento da CHIKF (DUTTA; TRIPATHI, 2017) (**Figura 9**).

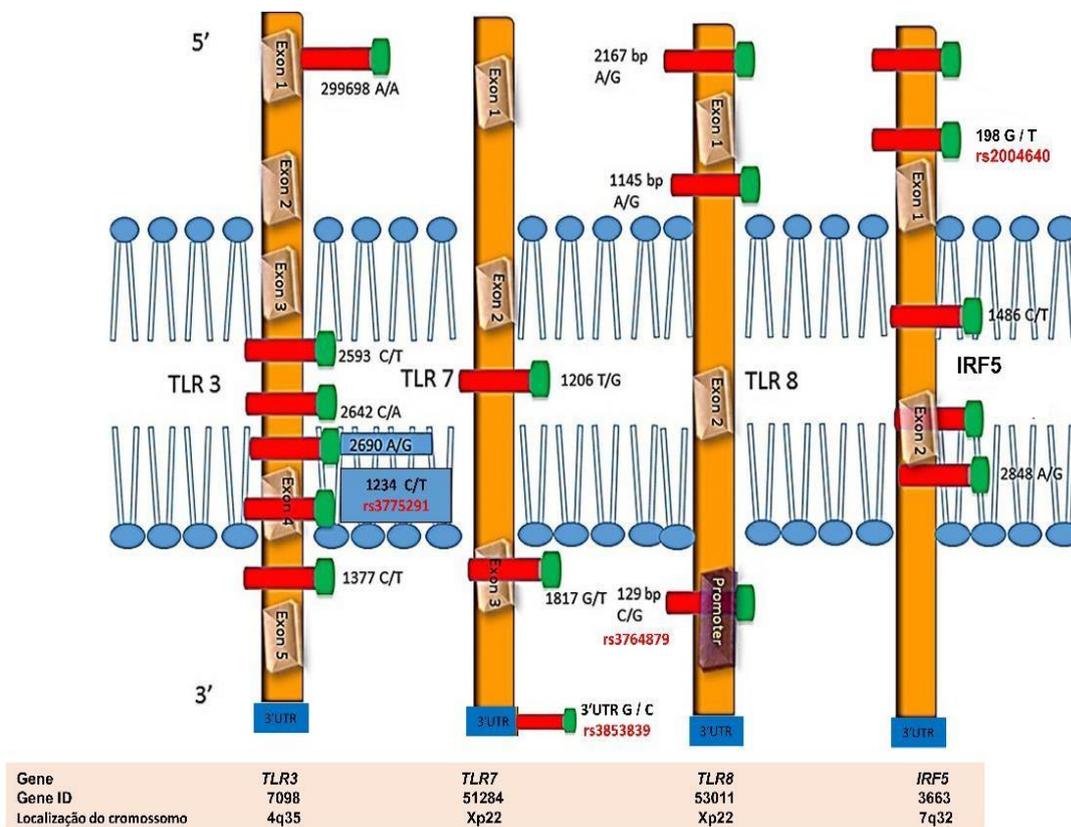
2.9.3 SNP 198 G/T do gene *IRF5* (rs2004640)

O fator de transcrição regulador de interferon (IRF) está localizado no citoplasma da célula não estimulada, onde existem em sua forma monomérica inativa. Após ativação, induz a cascata de sinalização para o recrutamento de moléculas adaptadoras que, por sua vez, regulam uma cascata de sinal para promover a ativação de IRF e a translocação nuclear (WANG *et al.*, 2018; COLONNA, 2007).

O IRF5 foi identificado como um mediador crítico da sinalização TLR dependente de MyD88, levando à expressão/produção de múltiplas citocinas pró- inflamatórias, incluindo IFNs tipo I, IL-6, TNF, IL-12 e IL-23 (CHAM; KO; NIEWOLD, 2012).

Um estudo conduzido por Lee *et al.* (2013), na população asiática, avaliou a relação entre o polimorfismo rs2004640 e AR, onde foi possível observar uma associação desse polimorfismo com a doença (LEE *et al.*, 2013). Sigurdsson *et al.* (2007) analisaram esse mesmo o SNPs (rs2004640) em pacientes suecos com artrite reumatóide e descobriram que essa variante estava associada à doença (SIGURDSSON *et al.*, 2007). Reykande *et al.* (2018) também avaliaram a associação desse SNP com a susceptibilidade à artrite e constataram que a presença do alelo T pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento de artrite (REYKANDE *et al.*, 2018) (**Figura 9**).

Figura 9-Representação e localização das variantes genéticas rs3775291, rs3853839, rs3764879 e rs2004640 nos genes *TLR3/7/8* e *IRF5*.



FONTE: Adaptado de (MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019).

O conhecimento dos perfis genéticos do hospedeiro que influenciam a suscetibilidade da infecção por CHIKV, principalmente em moléculas envolvidas na resposta imune, é uma ferramenta essencial para elucidar a fisiopatologia desta arbovirose e sua progressão. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar uma possível relação entre as variações genéticas dos receptores *Toll- Like 3/7/8* e do fator de transcrição regulador de interferon-5 (IRF5) com a infecção por CHIKV e desenvolvimento de dor persistente.

3. HIPÓTESES

- A frequência genotípica dos polimorfismos nos genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* e no gene *IRF5* é diferente em pacientes com CHIKF sintomática, CHIKV assintomática e indivíduos saudáveis;
- Os polimorfismos nos genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR8* e no gene *IRF5* podem:
 - Afetar o desenvolvimento da resposta imune antiviral;
 - Estar associados a um aumento do risco de infecção por CHIKV;
 - Estar associados a uma diminuição do desenvolvimento de dor crônica.

4. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo investigar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes que codificam os receptores *TLRs*, sendo eles *TLR3* (rs3775291), *TLR7* (rs3853839) e *TLR8* (rs3764879) e no gene codificador do fator de transcrição *IRF5* (rs2004640) com a suscetibilidade à infecção por CHIKV e desenvolvimento de dor persistente.

4.1 Objetivos Específicos

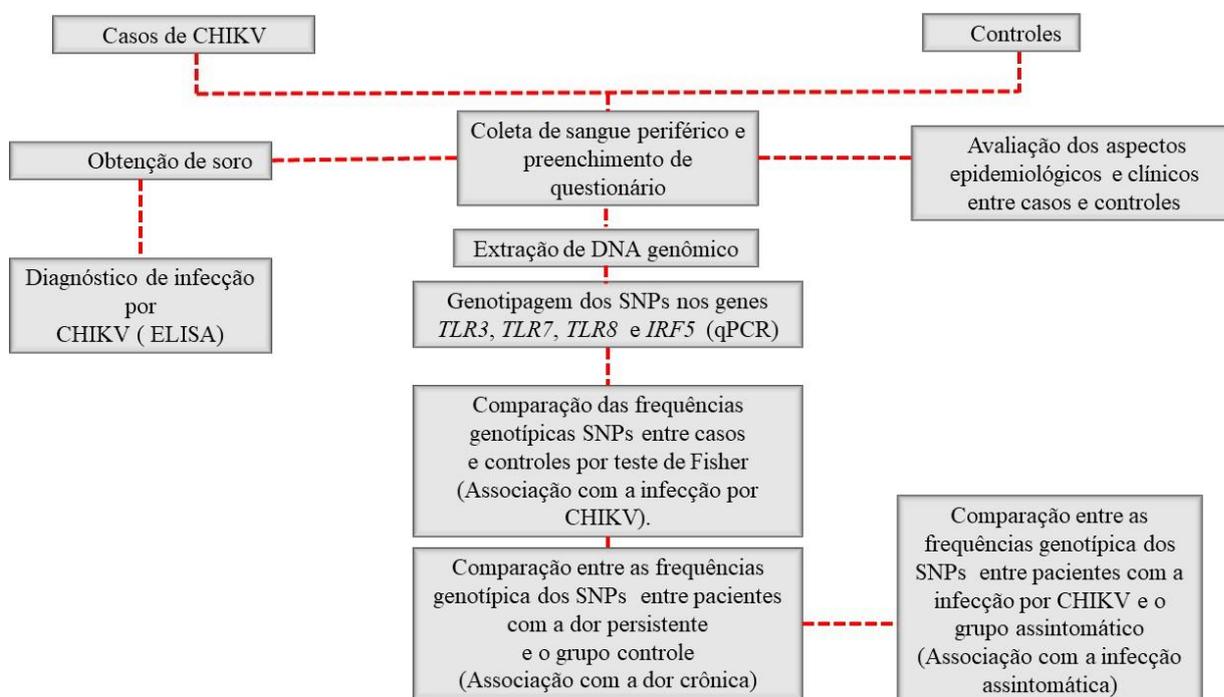
- Comparar a frequência dos genótipos e alelos para os polimorfismos estudados entre os grupos sintomáticos, assintomáticos e controles;
- Relacionar os polimorfismos com a ocorrência de infecção;
- Associar a frequência genotípica à sintomatologia dos pacientes infectados por CHIKV;
- Investigar a influência das variantes genéticas de *TLRs 3/7/8* e *IRF5* sobre o desenvolvimento de dor crônica;
- Avaliar a influência das variantes genéticas de *TLRs 3/7/8* e *IRF5* na infecção assintomática por CHIKV;
- Analisar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs do cromossomo X.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho experimental do estudo

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle. As metodologias utilizadas para a elucidação dos objetivos estão agrupadas de acordo com o desenho experimental (**Figura 10**).

Figura 10-Organograma das principais etapas experimentais do estudo



FONTE: Elaborada pelo autor (2023).

5.2 Local de realização do estudo

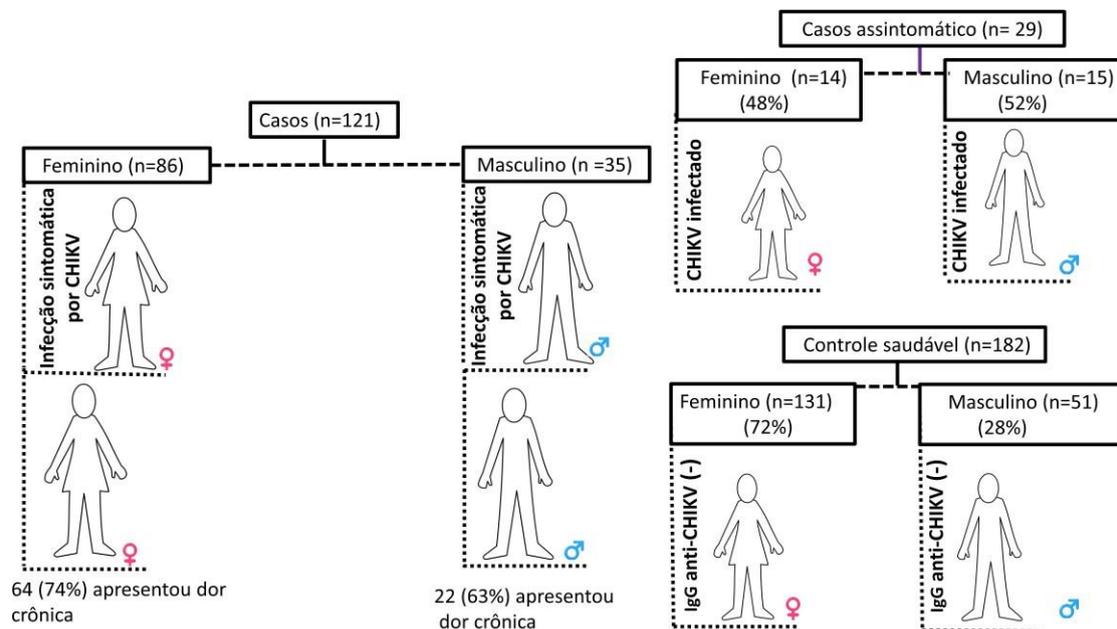
O recrutamento de indivíduos voluntários para participação no estudo, bem como aplicação de questionário e assinatura do TCLE, seguida da coleta de sangue total, foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT), vinculado a Universidade Federal do Ceará (UFC) durante os anos de 2019, 2020 e 2021.

5.3 População do estudo e critérios de inclusão

Para o grupo de casos, foram incluídos no estudo indivíduos (≥ 18 anos, $n=121$) que relataram ter apresentado pelo menos três sintomas clínicos de CHIKF, presença de IgG anti-CHIKV e que foram acometidos pela doença durante os anos de 2016, 2017 ou 2018. O grupo controle foi composto por indivíduos (≥ 18 anos, $n=182$), que nunca apresentaram sinais ou sintomas característicos de CHIKF e ausência de IgG anti-CHIKV. O grupo assintomático ($n=29$) foi composto por indivíduos que não relataram sintomas clínicos, mas que apresentaram presença de IgG anti-CHIKV. O grupo de pacientes com dor persistente ($n=86/121$) foram pacientes que apresentaram dor com duração ≥ 3 meses. Os indivíduos foram recrutados no LACT (Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas) da Universidade Federal do Ceará e foram coletados 10 mL de sangue periférico. Todos os sujeitos do estudo residem na mesma área geográfica (Cidade de Fortaleza, Estado do Ceará, Brasil). A **Figura 11** é uma representação esquemática dos grupos analisados no estudo.

Foram excluídos os indivíduos que apresentavam outras infecções (hepatite B, hepatite C, entre outras), gestantes, imunossuprimidos ou portadores de neoplasias.

Figura 11-Representação esquemática da população do estudo



FONTE: Elaborada pelo autor (2023).

5.4 Coleta de informações clínico-epidemiológicas

Após a autorização inicial dos diretores/responsáveis pelo laboratório de análises (LACT) para realização inicial do estudo, bem como após autorização dos indivíduos recrutados para compor os diferentes grupos da pesquisa mediante assinatura do TCLE, foi realizada uma punção venosa para coleta de sangue total (10 mL), utilizando 2 tubos de coleta a vácuo, um contendo EDTA e, o outro, gel separador.

A obtenção dos dados clínicos dos pacientes ocorreu tanto por meio da análise de suas fichas médicas, como também através de entrevista direta e aplicação de questionário semiestruturado (**Apêndice A**), que abrangeu informações sobre variáveis sociodemográficas e clínicas do paciente, como por exemplo: sexo, idade, data do atendimento, início dos sintomas, sinais e sintomas presentes, comorbidades/doenças crônicas coexistentes, histórico familiar de artrite, dentre outras questões.

5.4.1 Processamento primário e armazenamento das amostras

Uma vez realizada a coleta, as amostras foram transportadas para o LIMCEMO e devidamente processadas. O tubo contendo gel separador foi encaminhado para centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos para obtenção final do soro. Em seguida, este foi aliquotado em tubos eppendorfs de 1,5 ml e armazenado em freezer a -20° C. O sangue contido do tubo EDTA, por sua vez, foi levemente homogeneizado e, em seguida, aliquotado em tubos eppendorfs de 1,5 ml, também sendo armazenado em freezer a -20° C até o momento de realização dos ensaios.

5.5 Aspectos éticos da pesquisa

A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFC-PROPESQ e aprovada sob o parecer nº 3.212.740 (**ANEXO A**). Todos os participantes do estudo receberam as devidas orientações a respeito dos procedimentos e riscos inerentes à participação na pesquisa, bem como foram verbalmente esclarecidos pelos pesquisadores sobre os objetivos do estudo, sendo assegurado o direito de voluntariedade com relação à inclusão na pesquisa.

Todas as informações pessoais e laboratoriais obtidas por meio de entrevista direta ou análise de ficha laboratorial/médica dos pacientes atendidos ficaram mantidas em sigilo absoluto e com garantia de anonimato de identidade. Tais informações foram utilizadas somente pelos pesquisadores e pela equipe participante do referido estudo. Uma vez concordando em se tornar voluntário, foi solicitado o consentimento de cada indivíduo para participação na pesquisa, o qual se deu mediante leitura e posterior assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

5.6 Detecção de anticorpos IgG anti-Chikungunya

A presença ou ausência de IgG específica para Chikungunya foi determinada em 100 µL de soro diluído 1:100 usando um kit de ELISA indireto comercial distribuído pela Euroimmun (EI 293a-9601 G; Euroimmun AG). O procedimento e os níveis de corte foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

5.7 Extração de DNA

O DNA genômico dos indivíduos participantes da pesquisa foi extraído de alíquotas de sangue total, utilizando-se o kit comercial Biopur Extraction Kit Mini Plus Spin – 250 (Biopur, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Um total de 200 µl de DNA foi obtido e armazenado a -20°C até o uso. Após a coleta, foi realizada a quantificação do DNA para verificação da concentração e pureza, sendo determinados por meio do espectrofotômetro ultravioleta.

5.7.1 Quantificação do gDNA

Após a extração realizada conforme o item 5.7 o gDNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, Wilmington, EUA,) utilizando absorvância de 260 nm. Além da quantificação do material genético, fornecida em ng/ µL, foi também verificada a pureza do gDNA através da razão da medida de absorção dos índices 260/280nm. Razões de aproximadamente 1,8 foram consideradas como indicativo de um gDNA com um bom grau de pureza. Após a quantificação, as amostras de gDNA foram coletadas com auxílio de pipetador e foram estocadas a - 4 °C até análise.

5.8 Experimentos de genotipagem TaqMan® SNP

Os polimorfismos nos genes *TLR3* (rs3775291 C/T), *TLR7* (rs3853839 C/G), *TLR8* (rs3764879 C/G) e *IRF5* (rs2004640 G/T) foram determinados por um método de discriminação alélica VIC - FAM usando testes de PCR em tempo real TaqMan (Applied Biosystems®, Califórnia, EE. UU.) Seguindo as instruções do fabricante. A amplificação e genotipagem do DNA alvo foi realizada no sistema BIO-RAD CFX96 Manager 2.1 (BIO-RAD). A PCR em tempo real foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. O DNA de amostras foram usados como controles positivos. Água de qualidade PCR foi usada como controle negativo. Após o final das reações, o *software* do aparelho gera um relatório com as curvas de amplificação da discriminação alélica de cada indivíduo. A **Tabela 2** ilustra as diferentes variantes polimórficas utilizadas no estudo.

Tabela 2-Identificação e caracterização dos SNPs genotipados em grupos de pacientes e controles. Na tabela estão destacados o gene, identificação do SNP, localização cromossômica e região gênica, tipo da troca de base e ensaio das sondas TaqMan® utilizados neste estudo

Gene	SNP	Cromossomo / Localização	Tipo do SNP	Alelo	Assay
<i>TLR3</i>	rs3775291	Chr4/ Intragênica	Substituição de transição	C>T	C__1731425_10
<i>TLR7</i>	rs3853839	Chr.X/ Intragênica	Substituição de transversão	G>C	C__2259573_10
<i>TLR8</i>	rs3764879	Chr.X/ Intragênica	Substituição de transversão	G>C	C__2183829_10
<i>IRF5</i>	rs2004640	Chr17/ Intragênica	Substituição de transversão	G>T	C__9491614_20

FONTE: Thermofischer Scientific (2021).

Cada ensaio de genotipagem validado é composto por dois iniciadores (um senso e outro anti-senso) para a amplificação das regiões de interesse de cada polimorfismo e uma sonda (fragmentos de DNA marcados para hibridizar outra molécula de DNA) responsável pela detecção dos alelos.

5.9 Análises estatísticas dos dados

As análises estatísticas foram realizadas no software R (versão 3.4) com o pacote `-SNPassocll`. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de todos os SNPs foi realizado usando a calculadora online de Michael H. Court's (2005-2008). Para os SNPs localizados em autossomos as análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram realizadas com grupo controle. Enquanto para os SNPs localizados no cromossomo X, as análises do EHW foram feitas apenas com indivíduos do sexo feminino do grupo controle. As características clínicas dos indivíduos infectados foram estimadas pelo teste exato de Fisher usando contingência 2×2 . A regressão logística foi realizada para determinar o odds ratio (OR) entre pacientes caso e controle para os SNPs investigados nos genes *TLR3*, *TLR7*, *TLR8*, *IRF5*. A interpretação de Odds Ratio (<1 diminuição do risco de infecção ou diminuição da suscetibilidade; >1 Aumento do risco de infecção). O risco relativo foi calculado com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os padrões de desequilíbrio de ligação (LD) foram determinados usando a estatística r^2 .

5.9.1 Análise dos dados das manifestações clínicas

A prevalência dos sintomas, a presença de comorbidades entre os casos e o grupo controle. Para obtenção de tais resultados, foram realizados cálculos matemáticos envolvendo mediana, a variação interquartil (IQR) e porcentagem com regra de três simples. As variáveis não paramétricas foram mostradas como mediana (intervalo interquartil). Já as variáveis categóricas foram mostradas como frequência absoluta (n) e relativa (%).

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização dos participantes do estudo quanto ao gênero, idade, comorbidades e perfil sorológico

Não houveram diferenças entre os sexos nos indivíduos incluídos no estudo ($p=0,90$), nem tão pouco para os fatores que contribuem para a infecção, como por exemplo ter contatos domiciliares ($p=0,3641$) (**Tabela 3**). De acordo com o desenho do estudo, a mediana da idade (faixa interquartil) foi de 51 (27-63) anos para controles, 57 (48-68) anos para casos e 58 (40-70,5) anos para casos assintomáticos. Os indivíduos do grupo de casos apresentam maior frequência de doenças crônicas, como hipertensão (45%), diabetes (33%), asma (2%), anemia (3%), cardiomiopatia (8%) e hipotireoidismo (9 %), quando comparado a controles saudáveis. Em relação às doenças pré-existentes, houve uma distribuição desigual dessas comorbidades entre os diferentes grupos ($p < 0.001$), como mostrado na **Tabela 3**. Além disso, os indivíduos do grupo de casos relataram que as atividades domésticas foram prejudicadas e limitadas após infecção por CHIKV ($p < 0.0001$) (**Tabela 3**). Com relação ao impacto da doença nos afazeres domésticos, foi possível observar que 96% dos indivíduos infectados com CHIKV apresentaram de forma significativa limitação e diminuição na frequência de suas atividades domésticas (**Tabela 3**).

Tabela 3- Caracterização dos participantes do estudo quanto sexo, idade, comorbidades.

Sujeitos do estudo, N°. (%)			
Característica	Casos (n = 121)	Controle (n =182)	p-value
Sexo			
Masculino	35 (29)	51 (28)	0.90
Feminino	86 (71)	131 (72)	
Anos de idade (mediana e IQR)	57 (48 – 68)	51 (27 – 63)	0.195
Doenças crônicas			
Sim	75 (62)	30 (16)	<0.001*
Não	46 (38)	152 (84)	
Contatos domiciliares com CHIKV			
Sim	90 (74)	124 (68)	0.3641
Não	31 (26)	58 (32)	
Atividades domésticas prejudicadas			
Sim	96 (79)	0 (0)	<0.0001*
Não	25 (21)	182 (100)	

As análises de características foram realizadas pelo teste exato de Fisher com correção do valor de *P*. Os dados representam o número (%) de participantes do estudo, a menos que especificado de outra forma; Valores de *P*, IQR: intervalo interquartil e Doenças crônicas encontradas: Hipertensão, diabetes, asma ou artrite.

6.2 Características clínicas dos casos de CHIKF

Os principais sintomas relatados por indivíduos do grupo de casos sintomáticos foram febre (85%, 103/121), cefaleia (72%,87/121) e erupção cutânea (42%,51/121) Cerca de 99% (120/121) dos indivíduos relataram dor articular durante a doença. A intensidade da dor foi classificada como leve em 7% (9/121) dos pacientes, moderada em 23% (28/121) e grave em 69% (84/121). Um total de 71% (86/121) pacientes relatou ter sofrido dor persistente. As articulações mais afetadas foram pescoço, ombro, cotovelo, mão, dedos, joelho e tornozelo. Um total de 55% (67/121) dos casos relatou edema articular durante as manifestações de Chikungunya e 66% (80/121) dos casos relataram ter sofrido diarreia durante o curso da doença ($p= 0.001$). Esses resultados estão evidenciados na **Tabela 4**.

Dos 121 casos, 86 eram do sexo feminino, das quais 64 (74%) apresentaram dor crônica e 35 eram do sexo masculino, dos quais 22 (63%) apresentaram dor crônica. Em relação ao grupo controle dos 182 indivíduos, 131 eram do sexo feminino, (72%) e 51 eram do sexo masculino (28%). Dos 29 indivíduos do grupo assintomático, 14 eram do sexo feminino (48%) e 15 eram do sexo masculino (52%).

Tabela 4- Características clínicas de indivíduos sintomáticos para CHIKF

Pacientes sintomáticos investigados , N°. (%)					
Sintomas	Casos sintomáticos (n = 121)	Feminino (%) (n = 86)	Masculino (%) (n =35)	Prevalência dos sintomas de Chikungunya (%)	p- value
Febre	103	75 (87)	28 (80)	103 (85)	0.40
Cefaleia	87	63 (73)	24 (69)	87 (72)	0.66
Mialgia	81	61 (71)	20 (57)	81(67)	0.20
Erupção cutânea	51	37 (43)	14 (40)	51 (42)	0.84
Dor articular	120	85 (99)	35 (100)	120 (99)	1.00
Dor articular persistente	86	63 (73)	21 (60)	86 (71)	0.19
Dor retro-ocular	53	41 (48)	12 (34)	53 (44)	0.23
Edema	67	51 (59)	16 (48)	67 (55)	0.23
Vômito/ Náusea	48	35 (41)	13 (37)	48 (55)	0.84

Fraqueza	75	55 (64)	20 (57)	75 (62)	0.54
Diarreia	80	50 (93)	30 (86)	80 (66)	0.001*

Abreviaturas: N^o, Número de pacientes; *p-value*, valores de *p* determinados com teste de (Fisher).

6.3 Associação dos polimorfismos nos genes *TLR3*, *IRF5*, *TLR7* e *TLR8* como fator protetor contra infecção por CHIKV

As análises estatísticas permitiram estabelecer as frequências genotípicas dos polimorfismos nos genes *TLR3* e *IRF5*, sendo que os resultados de associação obtidos através de vários modelos para essas variantes não mostraram diferença (**Tabela 5**).

Os genes *TLR7* e *TLR8* estão localizados no cromossomo X sendo assim, as análises estatísticas foram primeiramente realizadas sob um modelo aditivo para permitir a inclusão de participantes do sexo masculino. Os resultados dessas análises mostraram um efeito protetor contra a infecção por CHIKV para o alelo G em ambos os SNPs rs3853839 (OR ajustado= 0.64; 95%CI=0.44-0.93; p=0,02) e rs3764879 (OR ajustado =0.54;95%CI=0.38-0.78; p=0.001) com ajuste para a idade e sexo.

Posteriormente, a análise dos dados foi realizada incluindo apenas indivíduos do sexo feminino, e, em seguida, diferentes modelos foram avaliados. Da mesma forma, alelo G do polimorfismo *TLR7* (rs3853839 G/C) e o alelo G do polimorfismo *TLR8* (rs3764879 G/C) conferiram proteção contra a infecção por CHIKV, assim como o SNP rs3853839 sob modelo Dominante (OR ajustado =0.55; 95% CI =0,32 - 0,93; p=0.024). Os modelos foram associados a um menor risco de infecção pelo CHIKV.

Enquanto a variante rs3764879 do gene *TLR8* apresentou os seguintes resultados obtidos utilizando o modelo Codominante para homocigoto GG e heterocigoto GC, a presença do alelo G diminui a suscetibilidade à infecção por CHIKV (OR ajustado =0.50; 95% CI =0.13-0.63; p=0.004) o modelo Dominante (OR ajustado=0.43; 95%CI =0.24 – 0.76; p=0.003) e o modelo log-aditivo (OR ajustado =0.54; 95% CI = 0.36 – 0.78; p=0.001) (**Tabela 5**).

Tabela 5- Associação genotípica dos SNPs de *TLR3/7/8* e *IRF5* com o risco de infecção por CHIKV.

SNP	Genótipo	Casos SIN + ASS (%) (n=150)	Controles Saudáveis (%) (n=182)	OR ajustado (95% IC)	<i>p</i> -value
<i>TLR3</i>					
(rs3775291) TODOS					
	Codominante				
	C/C	65 (43.3)	87 (47.8)	1.0 (Referência)	
	C/T	67 (44.7)	80 (44.0)	1.12 (0.71- 1.77)	0.465
	T/T	18 (12.0)	15 (8.2)	1.61 (0.75 - 3.42)	
	Dominante				
	C/C	65 (43.3)	87 (47.8)	1.0 (Referência)	
	C/T-T/T	85 (56.7)	95 (52.2)	1.20 (0.78 - 1.85)	0.415
	log-Aditivo (T)	150 (45.2)	182 (54.8)	1.21 (0.87- 1.69)	0.254

IRF5**(rs2004640)****TODOS**

Codominante

G/G	46 (30.7)	49 (26.9)	1.0 (Referência)	
G/T	73 (48.7)	89 (48.9)	0.87 (0.53 - 1.45)	0.652
T/T	31 (20.7)	44 (24.2)	0.75 (0.41 - 1.38)	

Dominante

G/G	46 (30.7)	49 (26.9)	1.0 (Referência)	
G/T-T/T	104 (69.3)	133 (73.1)	0.83 (0.52 - 1.34)	0.453
log-Aditivo(G)	150 (45.2)	182 (54.8)	0.87 (0.64 - 1.17)	0.356

TLR7**(rs3853839)****TODOS**

	(n= 150)	(n= 182)		
log-Aditivo (G)	150 (45.2)	182 (54.8)	0.64 (0.44-0.93)	0.02*

FEMININO	(n=100)	(n=131)		
Codominante				
C/C	53 (53.0)	50 (38.2)	1.0 (Referência)	
G/C	36 (36.0)	64 (48.9)	0.53 (0.30 - 0.93)	0.075
G/G	11 (11.0)	17 (13.0)	0.61 (0.26 - 1.43)	
Dominante				
C/C	53 (53.0)	50 (38.2)	1.0 (Referência)	
G/C-G/G	47 (47.0)	81 (61.8)	0.55 (0.32 - 0.93)	0.024*
log-Aditivo (G)	100 (43.3)	131 (56.7)	0.69 (0.47 - 1.02)	0.060

TLR8

(rs3764879) TODOS	(n= 150)	(n= 182)		
log-Aditivo (G)	150 (45.2)	182 (54.8)	0.54 (0.38-0.78)	0.001*

FEMININO	(n=100)	(n=131)		
Codominante				
C/C	39 (39.0)	28 (21.4)	1.0 (Referência)	
G/C	46 (46.0)	66 (50.4)	0.50 (0.27 - 0.92)	0.004*
G/G	15 (15.0)	37 (28.2)	0.29 (0.13 - 0.63)	
Dominante				
C/C	39 (39.0)	28 (21.4)	1.0 (Referência)	
G/C-G/G	61 (61.0)	103 (78.6)	0.43 (0.24 - 0.76)	0.003*
log-Aditivo (G)	100 (43.3)	131 (56.7)	0.54 (0.36 - 0.78)	0.001*

Resultados de modelos de regressão logística ajustados para idade (contínua) e sexo. As associações significativas estão destacadas em negrito. A análise estatística foi realizada por meio de regressão logística, OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança, * $p < 0,05$ a 95% IC foi considerado estatisticamente significativo e em itálico. Sintomático(SIN) (121) + Assintomático (ASS) (29) = 150 (indivíduos infectados masculino e feminino); Sintomático (SIN) (86) + Assintomático (ASS) (14) = 100 (pacientes femininas infectadas).

6.4 Associação dos polimorfismos nos genes *TLR3*, *IRF5*, *TLR7* e *TLR8* como fator protetor na redução da dor persistente

Não houve diferença entre os grupos quanto à associação dos SNPs nos genes *TLR3* (rs3775291) e *IRF5* (rs2004640) com a dor persistente (**Tabela 6**). As análises incluindo indivíduos do sexo masculino e feminino com dor persistente foram obtidas pelo modelo aditivo, que considera o número de cópias do alelo de risco. Isso também permitiu a inclusão de homens, que podem ter 0 ou 1 alelo nos SNPs do cromossomo X. Houve associação dos SNPs rs3853839 em *TLR7* (OR ajustado = 0.54; 95% IC = 0.34-0.85; p = 0.0081) e rs3764879 em *TLR8* (OR ajustado = 0.42; 95% IC = 0.27-0.65; p = 0.001) com a dor crônica, exercendo efeito protetor na redução da dor persistente (**Tabela 6**).

Avaliando somente indivíduos do sexo feminino, o SNP em *TLR7* (rs3853839) mostrou-se associado com a proteção contra a dor crônica utilizando o modelo dominante (OR ajustado = 0.51; IC 95% = 0.28 – 0.94; p= 0.029). Da mesma forma, a variante rs3764879 do gene *TLR8* também se mostrou associada à redução da dor crônica, nos diferentes modelos (modelo codominante para homozigoto GG e heterozigoto GC, OR ajustado = 0.25; 95% IC = 0.10- 0.62; p= 0.004 / modelo dominante, OR ajustado = 0.37; 95% IC = 0.19 - 0.7; p = 0.002/ e o modelo aditivo, OR ajustado = 0.49; 95% IC = 0.31-0.77; p=0.001) (**Tabela 6**).

Tabela 6- Associação genotípica dos SNPs nos genes *TLR3/7/8* e *IRF5* com dor a persistente.

SNP	Genótipo	Dor articular persistente (%) (n=86)	Controles Saudáveis (%) (n=182)	OR ajustado (95% IC)	<i>p-value</i>
<i>TLR3 (rs3775291)</i>					
	TODOS				
	Codominante				
	C/C	36 (41.9)	87 (47.8)	1.0 (Referência)	
	C/T	39 (45.3)	80 (44.0)	1.18 (0.68 - 2.03)	0.433
	T/T	11 (12.8)	15 (8.2)	1.77 (0.74 - 4.23)	
	Dominante				
	C/C	36 (41.9)	87 (47.8)	1.0 (Referência)	
	C/T-T/T	50 (58.1)	95 (52.2)	1.27 (0.76- 2.13)	0.361
	log-Aditivo (T)	86 (32.1)	182 (67.9)	1.28 (0.86 -1.89)	0.220

<i>IRF5</i> (rs2004640)	TODOS				
	Codominante				
	G/G	27 (31.4)	49 (26.9)	1.0 (Referência)	
	G/T	38 (44.2)	89 (48.9)	0.77 (0.42 - 1.42)	0.710
	T/T	21 (24.4)	44 (24.2)	0.87 (0.43 - 1.75)	
	Dominante				
	G/G	27 (31.4)	49 (26.9)	1.0 (Referência)	
	G/T-T/T	59 (68.6)	133 (73.1)	0.81 (0.46 - 1.41)	0.450
log-Aditivo (G)	86 (32.1)	182 (67.9)	0.92 (0.65 -1.32)	0.655	
<i>TLR7</i> (rs3853839)	TODOS	(n=86)	(n=182)		
	log-Aditivo (G)	86 (32.1)	182 (67.9)	0.54 (0.34- 0.85)	0.008*

	FEMININO	(n=64)	(n=131)		
	Codominante				
	C/C	35 (54.7)	50 (38.2)	1.0 (Referência)	
	G/C	22 (34.4)	64 (48.9)	0.49 (0.26 - 0.94)	0.087
	G/G	7 (10.9)	17 (13.0)	0.59 (0.22 - 1.57)	
	Dominante				
	C/C	35 (54.7)	50 (38.2)	1.0 (Referência)	
	G/C-G/G	29 (45.3)	81 (61.8)	0.51 (0.28 - 0.94)	0.03*
	log-Aditivo (G)	64 (32.8)	131 (67.2)	0.66 (0.42 - 1.04)	0.069
<i>TLR8</i>	TODOS	(n=86)	(n=182)		
(rs3764879)	log-Aditivo (G)	86 (32.1)	182 (67.9)	0.42 (0.27-0.65)	0.000*

FEMININO	(n=64)	(n=131)		
Codominante				
C/C	27 (42.2)	28 (21.4)	1.0 (Referência)	
G/C	28 (43.8)	66 (50.4)	0.44 (0.22 - 0.88)	0.004*
G/G	9 (14.1)	37 (28.2)	0.25 (0.10 - 0.62)	
Dominante				
C/C	27 (42.2)	28 21.4	1.0 (Referência)	
G/C-G/G	37 (57.8)	103 78.6	0.37 (0.19 - 0.71)	0.002*
log-Aditivo (G)	64 (32.8)	131 (67.2)	0.49 (0.31 - 0.77)	0.001*

Resultados de modelos de regressão logística ajustados para idade (contínua) e sexo. As associações significativas estão destacadas em negrito. A análise estatística foi realizada por meio de regressão logística, OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança, *p<0,05 a 95% IC foi considerado estatisticamente significativo e em itálico. Mulheres (64) + homens (22) = 86 (indivíduos com dor articular persistente).

6.5 A variante rs3764879 no gene *TLR8* está associada à infecção assintomática por CHIKV

Dos 211 indivíduos que não relataram sintomas de CHIK, 29 (14%) apresentaram amostras soropositivas para IgG anti-CHIKV (**Tabela 7**). Dentre eles, 14 eram do sexo feminino (6,8%) e 15 do sexo masculino (7,2%). Utilizando o modelo aditivo, foram incluídos indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino, onde os seguintes resultados foram observados (OR ajustado =2.88; 95% IC= 1.40-5.94; p=0.004)(Tabela 7). Ao analisar apenas indivíduos do sexo feminino os resultados foram obtidos através do modelo dominante: OR ajustado =4.53; 95% IC= 0.96-21.49; p=0.029. Assim, o alelo polimórfico G do SNP rs3764879 de *TLR8* esteve associado com infecção assintomática (**Tabela 7**).

Tabela 7- Associação dos SNPs estudados com o desenvolvimento de infecção assintomática e infecção sintomática por CHIKV.

SNP	Genótipo	Casos Assintomáticos (%) (n=29)	Casos sintomáticos (%) (n=121)	OR ajustado (95% IC)	<i>p-value</i>
<i>TLR3 (rs3775291)</i>					
TODOS					
Codominante					
	C/C	11 (37.9)	54 (44.6)	1.0 (Referência)	
	C/T	15 (51.7)	52 (43.0)	1.42 (0.60- 3.37)	0.697
	T/T	3 (10.3)	15 (12.4)	0.98 (0.24 3.98)	
Dominante					
	C/C	11 (37.9)	54 (44.6)	1.0 (Referência)	0.511
	C/T-T/T	18 (62.1)	67 (55.4)	1.32 (0.57- 3.03)	
	log-Aditivo (T)	29 (19.3)	121 (80.7)	1.11 (0.61- 2.01)	0.739

<i>IRF5</i> (rs2004640)	TODOS				
	Codominante				
	G/G	8 (27.6)	38 (31.4)	1.0 (Referência)	
	G/T	16 (55.2)	57 (47.1)	1.33 (0.52 - 3.42)	0.729
	T/T	5 (17.2)	26 (21.5)	0.91(0.27- 3.11)	
	Dominante				
	G/G	8 (27.6)	38 (31.4)	1.0 (Referência)	0.686
	G/T-T/T	21 (72.4)	83 (68.6)	1.20 (0.49 -2.96)	
	log-Aditivo (G)	29 (19.3)	121 (80.7)	0.99 (0.56 -1.76)	0.976
<i>TLR7</i> (rs3853839)	TODOS	(n=29)	(n=121)		
	log-Aditivo (G)	29 (19.3)	121 (80.7)	1.52 (0.76-3.06)	0.24

	FEMININO	(n=14)	(n=86)		
	Codominante				
	C/C	6 (42.9)	47 (54.7)	1.0 (Referência)	
	G/C	7 (50.0)	29 (33.7)	1.89 (0.58 -6.18)	0.499
	G/G	1 (7.1)	10 (11.6)	0.78 (0.08 - 7.24)	
	Dominante				
	C/C	6 (42.9)	47 (54.7)	1.0 (Referência)	
	G/C-G/G	8 (57.1)	39 (45.3)	1.61 (0.51- 5.03)	0.412
	log-Aditivo (G)	14 (14.0)	86 (86.0)	1.17 (0.52- 2.62)	0.712
TLR8 (rs3764879)	TODOS	(n=29)	(n=121)		
	log-Aditivo (G)	29 (19.3)	121 (80.7)	2.88 (1.40-5.94)	0.004*
	FEMININO	(n=14)	(n=86)		

Codominante				
C/C	2 (14.3)	37 (43.0)	1.0 (Referência)	
G/C	10 (71.4)	36 (41.9)	5.14 (1.05 - 25.10)	0.071
G/G	2 (14.3)	13 (15.1)	2.85 (0.36 - 22.31)	
Dominante				
C/C	2 (14.3)	37 (43.0)	1.0 (Referência)	
G/C-G/G	12(85.7)	49 (57.0)	4.53 (0.96 - 21.49)	0.029*
log-Aditivo (G)	14 (14.0)	86 (86.0)	1.76 (0.79 - 3.94)	0.167

Resultados de modelos de regressão logística ajustados para idade (contínua) e sexo. As associações significativas estão destacadas em negrito. A análise estatística foi realizada por meio de regressão logística, OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança, *p<0,05 a 95% IC foi considerado estatisticamente significativo e em itálico.

6.6 Análises de desequilíbrio de ligação

Foram realizadas análises de desequilíbrio de ligação (DL) para os SNPs rs3764879 e rs3853839, usando marcadores bi-alélicos r^2 e D' . Dessa forma, foram observadas evidências de forte desequilíbrio de ligação entre esses SNPs ($D'=0.99$ e $r^2=0.99$). $D' < 1$ indica que ocorreu recombinação entre dois loci. O $r^2 < 1$ representa a correlação entre dois loci (**Tabela 8**).

Tabela 8- Desequilíbrio de ligação entre os SNPs rs3764879 e rs3853839 no cromossomo X.

TLR8_rs3764879	D	0.2487394
<i>TLR8_rs3764879</i>	D'	0.9996761
<i>TLR8_rs3764879</i>	Corr.	0.9996761
<i>TLR8_rs3764879</i>	X^2	261.8303098
<i>TLR8_rs3764879</i>	<i>P-value</i>	< 2.2204e-16
<i>TLR8_rs3764879</i>	N	131.0000000

Os valores de p foram obtidos a partir de modelos de regressão logística log-aditiva

7. DISCUSSÃO

A imunopatogênese da infecção pelo CHIKV é bastante complexa. Os fatores do hospedeiro desempenham um papel importante sua progressão e gravidade da doença. Além disso, fatores como a idade e a existência de comorbidades também podem contribuir (DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA; BORGES, 2021; CHAAITHANYA et al., 2016).

No presente estudo, os grupos de casos e controles foram pareados por idade e sexo. A mediana de idade (intervalo interquartil) foi de 51 (27 – 63) anos para o grupo controle e 57 (48 – 68) anos para o grupo casos. Indivíduos do sexo feminino constituíram 72% dos participantes do grupo controle e 71% do grupo de casos. Esses achados são semelhantes aos mostrados por Bucardo *et.al* (2021), no qual 64% dos indivíduos do grupo controle eram do sexo feminino (84 /132) e 66% dos casos pacientes (87 /132) também eram do sexo feminino. Em relação às doenças pré- existentes, nossas análises mostraram uma distribuição desigual dessas comorbidades entre os diferentes grupos. Esses resultados também concordam com os apresentados nos estudos de Bucardo *et al.* (2021), que mostraram que essa desigualdade entre doenças pré-existentes e ter uma doença crônica pode ser um fator de risco para infecção por CHIKV (BUCARDO *et al.*, 2021).

Em relação aos contatos domiciliares com CHIKV, 74% dos casos e 68% dos controles saudáveis tiveram contatos domiciliares com CHIKV, o que significa que, efetivamente, a população estudada reside em área endêmica para CHIKV e, portanto, que todos os casos e controles , estão expostos à infecção por CHIKV. Esses resultados também concordam com os apresentados no estudo de Bucardo *et al.* (2021), que mostrou resultados semelhantes para contato domiciliar com CHIKV 82% dos casos e 64% dos controles (BUCARDO *et al.* 2021).

Com relação ao impacto da doença nos afazeres domésticos, foi possível observar neste estudo que 96% dos indivíduos infectados com CHIKV apresentaram de forma significativa limitação e diminuição na frequência de suas atividades domésticas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Hossain, Mohammad Sorowar *et al.* (2018) que confirmaram que 83% dos pacientes infectados pelo CHIKV apresentavam limitações em suas atividades domésticas (HOSSAIN *et al.*, 2018). Outro estudo, realizado em Santa Cruz de Natal/Brasil, avaliou a funcionalidade, dor, qualidade de vida, sono e produtividade ocupacional de indivíduos com artralgia crônica pós CHIKV também demonstrou que pacientes apresentaram limitações funcionais no trabalho

doméstico (ALMEIDA *et al.*, 2022). Dessa forma, essas limitações podem estar relacionadas com a presença de dor e disfunção articular presente nos indivíduos que vivenciam a fase crônica da CHIKF. Nesse contexto, é provável que a artralgia relatada pelos indivíduos com sequelas da doença seja um fator importante para a diminuição da funcionalidade dessas pessoas.

Com relação à sintomatologia, foi possível observar que cerca de 99% apresentaram dor articular após a infecção por CHIKV e que em 71% dos indivíduos com CHIKF essa dor se tornou persistente. As articulações mais afetadas neste estudo foram joelhos, punhos, ombros, mãos, tornozelos e pés. De forma semelhante, outros estudos também evidenciaram a presença de dor persistente como um sintoma bastante prevalente, variando de 67% a 85% dos indivíduos com essa queixa (DUTTA *et al.*, 2017; BUCARDO *et al.*, 2021; SENGUPTA; BHATTACHARYA; TRIPATHI, 2023).

Alguns estudos têm estabelecido a ligação entre a infecção pelo vírus CHIKV e a artrite reumatoide. Já foi demonstrado que cerca de 1% dos pacientes com CHIKF crônica podem desenvolver artrite reumatoide (JIA *et al.*, 2013).

Além da presença de dor, sintomas como febre (85%), cefaleia (72%), mialgia (67%) e diarreia (66%), também foram relatados pelos pacientes do presente estudo. Durante um grande surto de CHIKF no leste da Índia, entre os anos 2011 e 2013, os principais sintomas relatados pelos pacientes foram mialgia (95,9%), dor nas articulações (85,5%), inchaço nas articulações (57,8%), febre (57,2%), erupção cutânea (44,5%), dor abdominal (21,9%) e vômitos (20,2%). Em média, 80,3% dos pacientes apresentavam dores em sete articulações (DUTTA *et al.*, 2017). Dessa forma, fica claro notar a diversidade de sintomas que estão relacionados à infecção por CHIKV, assim como em outras arboviroses, sendo a dor e o comprometimento articular os mais frequentes em pacientes com CHIKF.

A frequência da infecção assintomática por Chikungunya pode variar dependendo de fatores como a população estudada, a localização geográfica e a cepa do vírus. Alguns estudos, estabeleceram inquéritos sorológicos para documentar a prevalência da infecção por CHIKV e identificar os fatores de risco para CHIKF assintomática e sintomática, e os resultados variam de 17,5% e 27,7% das pessoas com anticorpos contra CHIKV mas que não apresentam nenhum sintoma, ou seja, apresentam infecção assintomática (NAKKHARA *et al.*, 2013). Na pesquisa realizada por Bucardo *et al.* (2021) na Nicarágua, foi observado que 22% dos indivíduos incluídos no estudo apresentaram a forma assintomática da infecção por CHIKV. Esses achados são semelhantes aos mostrados no presente estudo, onde foi visto que 29 indivíduos (16%), durante a aplicação do questionário, não relataram ter tido sintomas

de CHIKF em nenhum momento, mas que apresentaram IgG anti-CHIKV sérica, confirmando a infecção.

O regulador de interferon 5 (IRF5) desempenha um papel crucial em vários processos celulares, incluindo a transcrição de genes de citocinas inflamatórias e moléculas antivirais. Já foi demonstrado que a variante genética rs2004640, no exon 1, do gene *IRF5* resulta em modificações funcionais que afetam a expressão do RNA mensageiro, aumentando o risco de desenvolvimento de artrite reumatóide (JIA *et al.*, 2013). No entanto, em nosso estudo, não foi observado diferenças nas frequências de alelos ou genótipos do polimorfismo rs2004640 do gene *IRF5*, bem como nenhuma associação com o risco de infecção ou dor persistente. Até o presente momento não há relatos na literatura acerca da influência do SNP rs2004640 em arboviroses, somente em infecção causada por HIV e vírus Epstein-Barr (TANG *et al.*, 2021; SEPÚLVEDA-CRESPO *et al.*, 2023).

A capacidade dos seres humanos de responder a padrões moleculares associados a patógenos pode ser alterada por vários SNPs dentro dos genes *TLR* da imunidade inata, o que pode influenciar suas funções, afetando a capacidade de reconhecimento microbiano e as vias de sinalização dos TLR (COLONNA, 2007; TREJO-DE LA O; HERNANDEZ-SANCEN; MALDONADO-BERNAL, 2014). O TLR-3 desempenha um papel importante na resposta imune a infecções causadas por vírus. Estudos demonstraram que o TLR-3 regula a resposta imune do hospedeiro e que a perda de TLR-3 agrava a doença na infecção por CHIKV (HER *et al.*, 2015). No presente estudo, não foi possível observar diferenças nas frequências de alelos ou genótipos dos polimorfismos do gene *TLR3* (rs3775291) e também não houve associação com suscetibilidade à infecção, dor crônica ou infecção assintomática por CHIKV. Por outro lado, Bucardo *et al* (2021) mostraram que pacientes com CHIKF tinham probabilidade significativamente maior de serem portadores do genótipo AA do que do genótipo GG deste SNP (BUCARDO *et al.*, 2021).

Este SNPs também foi estudado na severidade da dengue por Singh *et al.*, 2021, e os autores não encontraram nenhuma associação entre a frequência genotípica do SNP em pacientes com dengue grave *versus* pacientes com dengue não grave (SINGH *et al.*, 2021). No contexto da COVID-19, Pati *et al.*, (2021) não observaram associação entre a variante rs3775291 do gene *TLR3* com a suscetibilidade à infecção e a mortalidade

causada pelo por SARS-CoV-2 (PATI *et al.*, 2021). Em um estudo de revisão sistemática e meta-análise, Silva e colaboradores (2023) objetivaram determinar se existe associação entre o SNP rs3775291 e a suscetibilidade a infecções. Os resultados da metanálise sugerem uma associação significativa entre este polimorfismo e a suscetibilidade a infecções. Assim, ao analisar os subgrupos, os continentes asiático e americano mostraram que este SNP confere maior risco contra infecções em um modelo dominante. No entanto, os autores sugerem que mais estudos são necessários para elucidar completamente o papel do SNP rs3775291 nas infecções (SILVA *et al.*, 2023).

Os polimorfismos nos genes *TLR7* e *TLR8* são amplamente estudados no contexto de infecções virais, haja visto seus papéis no reconhecimento viral e resposta antiviral. No entanto, até o presente momento, somente dois estudos demonstraram o papel dos polimorfismos nos genes *TLR7* e *TLR8* (rs3853839 e rs3764879, respectivamente) na suscetibilidade à infecção por CHIKV e na gravidade da doença. O objetivo do estudo de Dutta *et al.* (2017) foi identificar o papel de diversos polimorfismos de TLRs na suscetibilidade ao CHIKV e suas associações com citocinas e sintomas clínicos. Já no estudo de Sengupta *et al.* (2021), os autores investigaram a importância dos SNPs em *TLR7* e *TLR8* na monoinfecção ou coinfeção por DENV/CHIKV (DUTTA; TRIPATHI, 2017; SENGUPTA *et al.*, 2021).

Nesse contexto, nosso estudo representa o primeiro relato de variantes genéticas em *TLR7* e *TLR8* associadas à proteção contra a infecção pelo CHIKV e à redução da dor em pacientes com dor persistente. Os resultados obtidos pelo método log aditivo sugerem que pacientes do sexo feminino e masculino que carregam o alelo G da variante rs3853839 em *TLR7* e rs3764879 em *TLR8* apresentam proteção contra a infecção por CHIKV ou estão associados a um risco reduzido de infecção. Tomados em conjunto, esses achados sugerem que o alelo G atua como um fator benéfico ao hospedeiro.

Polimorfismos nos genes de *TLR7* e *TLR8* também já foram investigados em outras infecções virais. Estudos de genética populacional realizados por YUE *et al.*, 2014 investigaram também a variante rs3853839 no gene *TLR7*, onde foi visto um efeito protetor contra a persistência do vírus da hepatite C em pacientes do sexo feminino devido a uma superexpressão do mRNA de TLR-7 alterando o perfil de citocinas *in vitro* (YUE *et al.*, 2014). No estudo conduzido por Sengupta *et al.* (2021),

utilizando um modelo aditivo, observaram uma associação protetora da variante rs3764879 do gene *TLR8* durante a coinfeção dengue-chikungunya vírus, sugerindo uma alteração na resposta imune (SENGUPTA *et al.*, 2021). Em outro estudo, Oh *et al.* (2008) avaliaram o polimorfismo rs3764880 no gene *TLR8*, e também observaram que esse SNP confere um efeito protetor contra o vírus do HIV. Ensaio de superexpressão mostraram que esta variante do receptor apresenta ativação de NF- κ B *in vitro*, modulando a secreção de citocinas. Consequentemente, isto poderia ser responsável por um menor nível de ativação imunológica, o que explicaria o curso natural mais lento da doença nos portadores da essa variante (OH *et al.*, 2008). Estudo realizado em pacientes com COVID-19 revelou que indivíduos do sexo feminino apresentam expressão bialélica dos receptores TLR-7 e TLR-8, tendo maior efeito protetor contra COVID-19 grave (SPIERING; DE VRIES, 2021).

Estudos realizados Shen *et al.* (2010) demonstraram que o polimorfismo 3' UTR rs3853839 em *TLR7*, situado na região não traduzida aumenta a expressão de mRNA em indivíduos com o alelo G aumentando os níveis de expressão da proteína TLR-7 do que os portadores do alelo C, alterando a capacidade de ligação de dsRNA e produção de fatores inflamatórios relacionados a vias de sinalização, principalmente NF- κ B e MAPK (SHEN *et al.*, 2010).

Outras pesquisas realizadas por Wang *et al.*, (2014), analisando a expressão do receptor TLR-8 em pacientes com a variante rs3764879 demonstrou que indivíduos portadores do alelo G, infectados pelo vírus da hepatite C, apresentaram maior expressão da atividade promotora e expressão do receptor. Assim sugere-se que esse SNP pode modular a regulação transcricional em monócitos, explicando dessa forma porque o curso natural da infecção é inibido nesses hospedeiros (WANG *et al.*, 2014).

Existem poucos estudos que associaram variantes polimórficas presentes em genes *TLRs* com dor persistente na infecção por CHIKV. Estudos conduzido por Dutta *et al.* (2017) estabeleceram a ligação de algumas variantes genéticas com a dor articular na fase aguda da CHIKF. O genótipo GG do polimorfismo rs5741880 apresentou associação significativa com dor articular. Esse mesmo estudo detectou um nível consideravelmente mais elevado de IFN- α entre pacientes com CHIKV com genótipo CC para a variante rs179010 (DUTTA *et al.*, 2017). Já no estudo de Bucardo *et al.* (2021) foi observado a relação entre a variante rs1800629 do gene *TNF- α* e a dor

persistente, mostrando que indivíduos portadores do genótipo AG apresentaram redução da dor articular persistente, expressando maiores níveis de TNF- α , que de alguma forma modulou e controlou a dor (BUCARDO *et al.*, 2021).

No presente estudo, o alelo G polimórfico da variante rs3853839 e rs3764879 foi significativamente mais prevalente em pacientes que relataram dor articular persistente após infecção por CHIKV do que em pacientes sem dor articular persistente. Os resultados sugerem que os indivíduos portadores do alelo G experimentaram uma redução na dor. Uma hipótese pode ser que a diminuição da dor seja mediada pela diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, dependente da sinalização desses receptores. Esse possível mecanismo já foi observado em outras doenças virais crônicas, em estudos caso-controle, que analisaram os receptores TLRs do tipo endossomal (SIRONI *et al.*, 2012).

De forma geral, podemos sugerir que o alelo G da variante rs3853839 (C/G) do gene *TLR7* e o alelo G da variante rs3764879 (C/G) do *TLR8* contribuem não apenas para proteção para a infecção, mas também na redução da dor. O presente estudo tem algumas limitações, sendo uma delas o fato de que a coleta de dados clínicos foi baseada nas respostas recordatórias dos pacientes. Assim, dados relativos aos sintomas e sua duração podem não ser totalmente precisos. Outro ponto foi em relação ao número amostral limitado de pacientes assintomáticos, limitando assim as comparações estatísticas entre os grupos do estudo.

8. CONCLUSÕES

Com relação aos SNPs estudados em *TLR3* e *IRF5*, conclui-se que não houveram diferenças na frequência alélica e genotípica nos diferentes grupos, e também não houve associação deles com a infecção por CHIKV e dor persistente. Com base nas análises de desequilíbrio de ligação, conclui-se que os SNPs estudados em *TLR7* e *TLR8* segregam juntos. A presença do alelo G na variante rs3853839 do gene *TLR7* e na variante rs3764879 de *TLR8* mostrou-se associada à diminuição do risco de infecção por CHIKV, bem como proteção contra a dor crônica, sugerindo que o alelo G atua como um fator benéfico. Por fim, indivíduos que apresentaram o alelo G na variante rs3764879 tiveram maior chance de desenvolver a infecção na forma assintomática da CHIKV.

Em suma, o presente estudo identificou que os polimorfismos dos genes *TLR7* e *TLR8* podem atuar como fatores protetores para infecção por CHIKV e redução da dor, sugerindo que essas variantes podem desempenhar um papel na patogênese da Chikungunya.

9. REFERÊNCIAS

- ABELLA, J.; ROJAS, Á.; ROJAS, C.; RONDÓN, F.; MEDINA, Y.; PEÑA, M.; CAMPO, A.; RICO, Á.; MERCADO, M. Clinical and immunological features of post-chikungunya virus chronic arthritis and its effect on functional ability and quality of life in a cohort of Colombian patients. **Rev. Colomb. Reumatol. (English Ed.)**, v. 26, n. 4, p. 253–259, 2019.
- AGHAI, Z. H.; KODE, A.; SASLOW, J. G.; NAKHLA, T.; FARHATH, S.; STAHL, G. E.; EYDELMAN, R.; STRANDE, L.; LEONE, P.; RAHMAN, I. Azithromycin suppresses activation of nuclear factor-kappa B and synthesis of pro-inflammatory cytokines in tracheal aspirate cells from premature infants. **Pediatr. Res.**, v. 62, n. 4, p. 483–488, 2007.
- ALMEIDA, YA (2022). Relação entre sono e limitações funcionais em pessoas na fase crônica da chikungunya (Dissertação de bacharelado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte).
- ALURI, J.; COOPER, M. A.; SCHUETTPELZ, L. G. Toll-like receptor signaling in the establishment and function of the immune system. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1374, 2021.
- ALVES, G. F. Estudo sobre insetos transmissores de doenças na área urbana por meio de uma sequência didática investigativa. 2022.
- AMARAL, J. K.; BINGHAM III, C. O.; TAYLOR, P.; VILÁ, L. M.; WEINBLATT, M. E.; SCHOEN, R. T. Pathogenesis of chronic chikungunya arthritis: Resemblances and links with rheumatoid arthritis. **Travel Med. Infect. Dis.**, p. 102534, 2022.
- AMDEKAR, S.; PARASHAR, D.; ALAGARASU, K. Chikungunya virus-induced arthritis: role of host and viral factors in the pathogenesis. **Viral Immunol.**, v. 30, n. 10, p. 691–702, 2017.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; BOZZA, M. T.; DA POIAN, A. T. Pro-inflammatory response resulting from sindbis virus infection of human macrophages: implications for the pathogenesis of viral arthritis. **J. Med. Virol.**, v. 82, n. 1, p. 164–174, 2010.
- AVENDAÑO-TAMAYO, E.; RÚA, A.; PARRA-MARÍN, M. V.; ROJAS, W.; CAMPO, O.; CHACÓN-DUQUE, J.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; NARVÁEZ, C. F.; SALGADO, D. M.; RESTREPO, B. N. Evaluation of variants in IL6R, TLR3, and DC-

SIGN genes associated with dengue in a sampled Colombian population. **Biomédica**, v. 39, n. 1, p. 88–101, 2019.

BALKA, K. R.; DE NARDO, D. Understanding early TLR signaling through the Myddosome. **J. Leukoc. Biol.**, v. 105, n. 2, p. 339–351, 2019.

BAXTER, V. K.; HEISE, M. T. Genetic control of alphavirus pathogenesis. **Mamm. Genome**, v. 29, n. 7, p. 408–424, 2018.

BERNARD, E.; SOLIGNAT, M.; GAY, B.; CHAZAL, N.; HIGGS, S.; DEVAUX, C.; BRIANT, L. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11479, 2010.

BERRY, I. M.; EYASE, F.; POLLETT, S.; KONONGOI, S. L.; JOYCE, M. G.; FIGUEROA, K.; OFULA, V.; KOKA, H.; KOSKEI, E.; NYUNJA, A. Global outbreaks and origins of a chikungunya virus variant carrying mutations which may increase fitness for *Aedes aegypti*: revelations from the 2016 Mandera, Kenya outbreak. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 5, p. 1249, 2019.

BEZERRA, W. P.; MOIZÉIS, R. N. C.; SALMERON, A. C. A.; PEREIRA, H. W. B.; DE ARAÚJO, J. M. G.; GUEDES, P. M. M.; FERNANDES, J. V.; NASCIMENTO, M. S. L. Innate immune response in patients with acute Chikungunya disease. **Med. Microbiol. Immunol.**, p. 1–12, 2023.

BIYANI, S.; GARG, R. K.; JAIN, A.; MALHOTRA, H. S.; KUMAR, R.; PRAKASH, S.; VERMA, R.; SHARMA, P. K. Toll-like receptor-3 gene polymorphism in patients with Japanese encephalitis. **J. Neuroimmunol.**, v. 286, p. 71–76, 2015.

BORTOLOTTI, D.; GENTILI, V.; RIZZO, S.; SCHIUMA, G.; BELTRAMI, S.; STRAZZABOSCO, G.; FERNANDEZ, M.; CACCURI, F.; CARUSO, A.; RIZZO, R. TLR3 and TLR7 RNA sensor activation during SARS-CoV-2 infection. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1820, 2021.

BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 42, 2021. **Bol. Epidemiológico Arboviroses**, v. 52, n. 24, p. 1–20, 2021.

BRASIL. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus

transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 26, 2021. **Bol. Epidemiológico Arboviroses**, v. 52, n. 24, p. 1–20, 2023.

BRASIL; SAÚDE, M. DA; SAÚDE, S. DE V. EM. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49 de 2018. **Bol Epidemiol**, v. 49, n. 34, p. 1–14, 2018.

BRITO, C. A. A. DE. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, p. 585–589, 2017.

BRITO, C. A. A. DE; SOHSTEN, A. K. A. VON; LEITÃO, C. C. DE S.; BRITO, R. DE C. C. M. DE; VALADARES, L. D. D. A.; FONTE, C. A. M. DA; MESQUITA, Z. B. DE; CUNHA, R. V.; LUZ, K.; LEÃO, H. M. C. Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 49, p. 668–679, 2016.

BUCARDO, F.; REYES, Y.; MORALES, M.; BRICEÑO, R.; GONZÁLEZ, F.; LUNDKVIST, Å.; SVENSSON, L.; NORDGREN, J. Association of genetic polymorphisms in DC-SIGN, toll-like receptor 3, and tumor necrosis factor α genes and the Lewis-negative phenotype with chikungunya infection and disease in Nicaragua. **J. Infect. Dis.**, v. 223, n. 2, p. 278–286, 2021.

BURT, F. J.; ROLPH, M. S.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M. T. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012.

BUSTOS CARRILLO, F.; GORDON, A.; HARRIS, E. Reply to Gérardin et al. **Clin. Infect. Dis.**, v. 68, n. 1, p. 172–174, 2019.

CAO-LORMEAU, V.-M.; MUSSO, D. Emerging arboviruses in the Pacific. **Lancet**, v. 384, n. 9954, p. 1571–1572, 2014.

CAO, B.; DIAMOND, M. S.; MYSOREKAR, I. U. Maternal-fetal transmission of Zika virus: routes and signals for infection. **J. Interf. Cytokine Res.**, v. 37, n. 7, p. 287–294, 2017.

CASANOVA, J.-L.; ABEL, L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.**, v. 14, p. 215–243, 2013.

- CASTANEDA, S.; GARCÉS-PUENTES, M. V; BERNAD PINEDA, M. Fisiopatología de la osteoporosis en las enfermedades articulares inflamatorias crónicas. **Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.**, v. 13, n. 1, p. 32–38, 2021.
- CASTRO, A. P. C. R. DE; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. DOS S. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Rev. Dor**, v. 17, p. 299–302, 2016.
- CHAAITHANYA, I. K.; MURUGANANDAM, N.; SURYA, P.; ANWESH, M.; ALAGARASU, K.; VIJAYACHARI, P. Association of oligoadenylate synthetase gene cluster and DC-SIGN (CD209) gene polymorphisms with clinical symptoms in chikungunya virus infection. **DNA Cell Biol.**, v. 35, n. 1, p. 44–50, 2016.
- CHAM, C. M.; KO, K.; NIEWOLD, T. B. Interferon regulatory factor 5 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2012, 2012.
- CHANDAK, N. H.; KASHYAP, R. S.; KABRA, D.; KARANDIKAR, P.; SAHA, S. S.; MOREY, S. H.; PUROHIT, H. J.; TAORI, G. M.; DAGINAWALA, H. F. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurol. India**, v. 57, n. 2, p. 177, 2009.
- CHEN, J. C.; WANG, Z.; HUANG, H.; WEITZ, S. H.; WANG, A.; QIU, X.; BAUMEISTER, M. A.; UZGIRIS, A. Infection of human uterine fibroblasts by Zika virus in vitro: implications for viral transmission in women. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 51, p.139–140, 2016.
- CHENG, P.-L.; ENG, H.-L.; CHOU, M.-H.; YOU, H.-L.; LIN, T.-M. Genetic polymorphisms of viral infection-associated Toll-like receptors in Chinese population. **Transl. Res.**, v. 150, n. 5, p. 311–318, 2007.
- CHING, K.-C.; FP NG, L.; CHAI, C. L. L. A compendium of small molecule direct-acting and host-targeting inhibitors as therapies against alphaviruses. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 72, n. 11, p. 2973–2989, 2017.
- CHIRATHAWORN, C.; CHANSAENROJ, J.; POOVORAWAN, Y. Cytokines and chemokines in chikungunya virus infection: protection or induction of pathology. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 415, 2020.
- CHIRATHAWORN, C.; RIANTHAVORN, P.; WUTTIRATTANAKOWIT, N.; POOVORAWAN, Y. Serum IL-18 and IL-18BP levels in patients with Chikungunya virus infection. **Viral Immunol.**, v. 23, n. 1, p. 113–117, 2010.

CHUA, C.-L.; SAM, I.-C.; CHIAM, C.-W.; CHAN, Y.-F. The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171989, 2017.

COLONNA, M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: To each its own. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 2, p. 306–309, 2007.

COOK, L. E.; LOCKE, M. C.; YOUNG, A. R.; MONTE, K.; HEDBERG, M. L.; SHIMAK, R. M.; SHEEHAN, K. C. F.; VEIS, D. J.; DIAMOND, M. S.; LENSCHOW, D. J. Distinct roles of interferon alpha and beta in controlling chikungunya virus replication and modulating neutrophil-mediated inflammation. **J. Virol.**, v. 94, n. 1, p. 10–1128, 2019.

COURT, M.; MICHAEL, H. Court's (2005–2008) online calculator. 2012.

CROCI, S.; VENNERI, M. A.; MANTOVANI, S.; FALLERINI, C.; BENETTI, E.; PICCHIOTTI, N.; CAMPOLO, F.; IMPERATORE, F.; PALMIERI, M.; DAGA, S. The polymorphism L412F in TLR3 inhibits autophagy and is a marker of severe COVID-19 in males. **Autophagy**, v. 18, n. 7, p. 1662–1672, 2022.

DE CALUWÉ, L.; COPPENS, S.; VEREECKEN, K.; DALED, S.; DHAENENS, M.; VAN OSTADE, X.; DEFORCE, D.; ARIËN, K. K.; BARTHOLOMEEUSEN, K. The CD147 protein complex is involved in entry of chikungunya virus and related alphaviruses in human cells. **Front. Microbiol.**, v. 12, p. 615165, 2021.

DE OLIVEIRA, D. M.; DE OLIVEIRA, D. M.; BORGES, A. C. N. Sintomas clínicos associados à hospitalização em idosos acometidos por febre Chikungunya Clinical symptoms associated with hospitalization in elderly people affected by Chikungunya fever. **Brazilian J. Heal. Rev.**, v. 4, n. 3, p. 13660–13675, 2021.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 18, p. 283–285, 2015.

DUAN, T.; DU, Y.; XING, C.; WANG, H. Y.; WANG, R.-F. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. **Front. Immunol.**, v. 13, p. 812774, 2022.

DUNLEVY, F.; MCELVANEY, N. G.; GREENE, C. M. TLR3 sensing of viral infection. **Open Infect. Dis. J.**, v. 4, n. 1, 2010.

DURÁN, A.; OCHOA, E.; ALCOCER, S.; GÓMEZ, M.; MILLANO, M.; MARTÍNEZ,

O.; MALDONADO, M.; VALERO, N. Frecuencia de signos y síntomas gastrointestinales del dengue: Análisis de una cohorte de 1484 pacientes. *Invest. Clin.*, v. 54, n. 3, p. 299–310, 2013.

DUTTA, S. K.; TRIPATHI, A. Association of toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. *Virology*, v. 511, p. 207–213, 2017.

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 Reunion. *Epidemiol. Infect.*, v. 137, n. 4, p. 534–541, 2009.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Chikungunya worldwide overview. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>. Accessed Dec 05, 2022.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). Chikungunya worldwide overview. Available from <https://www.ecdc.europa.eu/en/chikungunya-monthly>. Accessed 04/02/24

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. DA. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *Brazilian J. Infect. Dis.*, v. 21, p. 540–544, 2017.

ESTOFOLETE, C. F.; DE OLIVEIRA MOTA, M. T.; TERZIAN, A. C. B.; DE AGUIAR MILHIM, B. H. G.; RIBEIRO, M. R.; NUNES, D. V.; MOURÃO, M. P.; ROSSI, S. L.; NOGUEIRA, M. L.; VASILAKIS, N. Unusual clinical manifestations of dengue disease—Real or imagined? *Acta Trop.*, v. 199, p. 105134, 2019.

FANG, X.; HU, Z.; SHANG, W.; ZHU, J.; XU, C.; RAO, X. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, v. 66, n. 2, p. 134–146, 2012.

FERIA DÍAZ, G. E.; LEYVA PROENZA, C. A.; CONCEPCIÓN PARRA, W.; CASTRO MAQUILÓN, A. G.; LARREA MEZA, I. S. Papel de las citoquinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide. *Correo Científico Médico*, v. 24, n. 1, p. 341–360, 2020.

FERNANDES, M. DA C. R.; MONTE, W. S. DO; BEZERRA, F. S. B. Avaliação do desenvolvimento tecnológico em saúde a partir da ocorrência das epidemias de zika e chikungunya no Brasil. **Cad. Saude Publica**, v. 39, p. e00090022, 2023.

FERREIRA, D. T. DE O.; ATANAKA, M.; ESPINOSA, M. M.; SCHÜLER-FACCINI, L.; SILVA, J. H. DA; VIVI, V. K.; PAZ, R. DE C. DA; NASCIMENTO, V. F. DO; TERÇAS-TRETTEL, A. C. P. Sociodemographic and sanitary profile of chikungunya virus infection in medium-sized municipality in Mato Grosso, from January to March 2018, Brasil. **Población y Salud en Mesoamérica**, v. 18, n. 2, p. 94–120, 2021a.

FERREIRA, J. M.; SANTOS, L. D. S.; OLIVEIRA, S. P.; DOS SANTOS, B. R. C.; DOS SANTOS, A. C. M.; DE MOURA, E. L.; DE SOUZA, E. V. M.; DE LIMA FILHO, J. L. Chikungunya virus infection outcome: a systematic review of host genetics. **Immunol. Invest.**, v. 50, n. 1, p. 58–79, 2021b.

FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 47, p. 677–683, 2014.

FINNERUP, N. B.; ATTAL, N.; HAROUTOUNIAN, S.; MCNICOL, E.; BARON, R.; DWORKIN, R. H.; GILRON, I.; HAANPÄÄ, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Neurol.**, v. 14, n. 2, p. 162–173, 2015.

FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. Alphavirus infection: host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 166, 2016.

GADELHA, D. P.; TODA, A. T. Biologia e comportamento do *Aedes aegypti*. **Rev. bras. malariol. doenças trop.**, p. 29–36, 1985.

GALÁN-HUERTA, K. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J. A.; RAMOS-JIMÉNEZ, J. Chikungunya virus: A general overview. **Med. Univ.**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.

GAO, Y.; GUO, J.; ZHANG, F.; GUO, Z.; ZHANG, L.-R.; WANG, T.; WANG, B.; FENG, S.-Y.; WANG, S.-P. Evaluation of neonatal Toll-like receptors 3 (c. 1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in HBV intrauterine transmission susceptibility. **Epidemiol. Infect.**, v. 143, n. 9, p. 1868–1875, 2015.

GHILDIYAL, R.; GABRANI, R. Antiviral therapeutics for chikungunya virus. **Expert Opin. Ther. Pat.**, v. 30, n. 6, p. 467–480, 2020.

GIMÉNEZ-RICHARTE, Á.; DE SALAZAR, M. O.; ARBONA, C.; GIMÉNEZ-RICHARTE, M. P.; COLLADO, M.; FERNÁNDEZ, P. L.; QUILES, F.; CLAVIJO, C.; MARCO, P.; RAMOS-RINCON, J.-M. Prevalence of chikungunya, dengue and Zika viruses in blood donors: A systematic literature review and meta-analysis. **Blood Transfus.**, v. 20, n. 4, p. 267, 2022.

GIRARD, M.; NELSON, C. B.; PICOT, V.; GUBLER, D. J. Arboviruses: A global public health threat. **Vaccine**, v. 38, n. 24, p. 3989–3994, 2020.

GOTAY, W. J. P.; RODRIGUES, R. O.; YAOCHITE, J. N. U. Influence of host genetic polymorphisms involved in immune response and their role in the development of Chikungunya disease: a review. [s.d].

HAMMON, W. M.; RUNDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science (80-.)**, v. 131, n.3407, p. 1102–1103, 1960.

HAWMAN, D. W.; STOERMER, K. A.; MONTGOMERY, S. A.; PAL, P.; OKO, L.; DIAMOND, M. S.; MORRISON, T. E. Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. **J. Virol.**, v. 87, n. 24, p. 13878–13888, 2013.

HE, X.; JIA, H.; JING, Z.; LIU, D. Recognition of pathogen-associated nucleic acids by endosomal nucleic acid-sensing toll-like receptors. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 45, n. 4, p. 241–258, 2013.

HER, Z.; TENG, T.; TAN, J. J. L.; TEO, T.; KAM, Y.; LUM, F.; LEE, W. W. L.; GABRIEL, C.; MELCHIOTTI, R.; ANDIAPPAN, A. K. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. **EMBO Mol. Med.**, v. 7, n. 1, p. 24–41, 2015.

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saude Publica**, v. 31, p. 906–908, 2015.

HONÓRIO, N. A.; CÂMARA, D. C. P.; CALVET, G. A. Chikungunya: an arbovirus

infection in the process of establishment and expansion in Brazil Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil Chikungunya: una arbovirosis en establecimiento y. **Cad. Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 1–3, 2015.

HOSSAIN, M. S.; HASAN, M. M.; ISLAM, M. S.; ISLAM, S.; MOZAFFOR, M.; KHAN, M. A. S.; AHMED, N.; AKHTAR, W.; CHOWDHURY, S.; ARAFAT, S. M. Y. Chikungunya outbreak (2017) in Bangladesh: Clinical profile, economic impact and quality of life during the acute phase of the disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 6, p. e0006561, 2018.

JACOB-NASCIMENTO, L. C.; CARVALHO, C. X.; SILVA, M. M. O.; KIKUTI, M.; ANJOS, R. O.; FRADICO, J. R. B.; CAMPI-AZEVEDO, A. C.; TAURO, L. B.; CAMPOS, G. S.; MOREIRA, P. S. DOS S. Acute-phase levels of CXCL8 as risk factor for chronic arthralgia following chikungunya virus infection. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 744183, 2021.

JIA, X.; HU, M.; LIN, Q.; REN, H. Association of the IRF5 rs2004640 polymorphism with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Rheumatol. Int.**, v. 33, p. 2757–2761, 2013.

KINDBERG, E.; VENE, S.; MICKIENE, A.; LUNDKVIST, Å.; LINDQUIST, L.; SVENSSON, L. A functional Toll-like receptor 3 gene (TLR3) may be a risk factor for tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection. **J. Infect. Dis.**, v. 203, n. 4, p. 523–528, 2011.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **Int. Rev. Immunol.**, v. 30, n. 1, p. 16–34, 2011.

LEE, W. W. L.; TEO, T.-H.; HER, Z.; LUM, F.-M.; KAM, Y.-W.; HAASE, D.; RÉNIA, L.; RÖTZSCHKE, O.; NG, L. F. P. Expanding regulatory T cells alleviates chikungunya virus-induced pathology in mice. **J. Virol.**, v. 89, n. 15, p. 7893–7904, 2015.

LEE, Y. H.; BAE, S.-C.; CHOI, S. J.; JI, J. D.; SONG, G. G. Associations between interferon regulatory factor 5 polymorphisms and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Mol. Biol. Rep.**, v. 40, n. 2, p. 1791–1799, 2013.

LEPARC-GOFFART, I.; NOUGAIREDE, A.; CASSADOU, S.; PRAT, C.; DE LAMBALLERIE, X. Chikungunya in the Americas. **Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.

LEUNG, J. Y.-S.; NG, M. M.-L.; CHU, J. J. H. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Adv. Virol.**, v. 2011, 2011.

LEVI, L. I.; VIGNUZZI, M. Arthritogenic alphaviruses: a worldwide emerging threat? **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 133, 2019.

LI, F. S.; CARPENTIER, K. S.; HAWMAN, D. W.; LUCAS, C. J.; ANDER, S. E.; FELDMANN, H.; MORRISON, T. E. Species-specific MARCO-alphavirus interactions dictate chikungunya virus viremia. **Cell Rep.**, v. 42, n. 5, 2023.

LI, Y.; ZHOU, Y.; HUANG, Z.; TAO, X.; YANG, J.; ZHANG, Y.; LI, J.; YAO, H. Phytochemicals from *Potentilla fragarioides* Inhibit LPS-induced Inflammation in RAW 264.7 Macrophages via Inactivating NF- κ B Pathway. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 40, n. 12, p. 3091–3096, 2021.

LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviroses and new challenges for public health in Brazil. **Ver Saúde Pública**, v. 7, p. 1–7, 2016.

LIRA, C. Z. S. DE. **A relação entre a artralgia da Febre Chikungunya e as alterações do sono em idosos assistidos por uma unidade básica de saúde** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, , 2017.

LIU, H.; ZHOU, R.; LIU, Y.; GUO, L.; WANG, X.; HU, W.; HO, W. HIV infection suppresses TLR3 activation-mediated antiviral immunity in microglia and macrophages. **Immunology**, v. 160, n. 3, p. 269–279, 2020.

LOCKE, M. C.; FOX, L. E.; DUNLAP, B. F.; YOUNG, A. R.; MONTE, K.; LENSCHOW, D. J. Interferon alpha, but not interferon beta, acts early to control chronic chikungunya virus pathogenesis. **J. Virol.**, v. 96, n. 1, p. e01143-21, 2022.

LUM, F.-M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Res.**, v. 120, p. 165–174, 2015.

MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECION, C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Brazilian J. Infect. Dis.**, v. 20, p. 91–98, 2016.

MANIERO, V. C.; SANTOS, M. O.; RIBEIRO, R. L.; DE OLIVEIRA, P. A. C.; DA SILVA, T. B.; MOLERI, A. B.; MARTINS, I. R.; LAMAS, C. C.; CARDOZO, S. V. Dengue, chikungunya e zika vírus no brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. **Alm. Multidiscip. Pesqui.**, v. 3, n. 1, 2016.

MANZOOR, K. N.; JAVED, F.; EJAZ, M.; ALI, M.; MUJADDADI, N.; KHAN, A. A.; KHATTAK, A. A.; ZAIB, A.; AHMAD, I.; SAEED, W. K. The global emergence of Chikungunya infection: An integrated view. **Rev. Med. Virol.**, v. 32, n. 3, p. e2287, 2022.

MEERTENS, L.; HAFIRASSOU, M. L.; COUDERC, T.; BONNET-MADIN, L.; KRIL, V.; KÜMMERER, B. M.; LABEAU, A.; BRUGIER, A.; SIMON-LORIERE, E.; BURLAUD-GAILLARD, J. FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. **Nature**, v. 574, n. 7777, p. 259–263, 2019.

MEHTA, R.; GERARDIN, P.; DE BRITO, C. A. A.; SOARES, C. N.; FERREIRA, M. L. B.; SOLOMON, T. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. **Rev. Med. Virol.**, v. 28, n. 3, p. e1978, 2018.

MERCADO, M.; ACOSTA-REYES, J.; PARRA, E.; GUZMÁN, L.; BELTRÁN, M.; GASQUE, P.; MEJÍA-GARCÍA, C.; VIASUS, D. Renal involvement in fatal cases of chikungunya virus infection. **J. Clin. Virol.**, v. 103, p. 16–18, 2018.

METZ, S. W.; PIJLMAN, G. P. Function of chikungunya virus structural proteins. In: **Chikungunya Virus**. [s.l.] Springer, 2016. p. 63–74.

MICKIENĖ, A.; PAKALNIENĖ, J.; NORDGREN, J.; CARLSSON, B.; HAGBOM, M.; SVENSSON, L.; LINDQUIST, L. Polymorphisms in chemokine receptor 5 and Toll-like receptor 3 genes are risk factors for clinical tick-borne encephalitis in the Lithuanian population. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106798, 2014.

MOLLER-TANK, S.; KONDRATOWICZ, A. S.; DAVEY, R. A.; RENNERT, P. D.; MAURY, W. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. **J. Virol.**, v. 87, n. 15, p. 8327–8341, 2013.

MONTERO, A. Fiebre chikungunya-Una nueva amenaza global. **Med. Clin. (Barc)**, v. 145, n. 3, p. 118–123, 2015.

MORI, T.; MIYAMOTO, T.; YOSHIDA, H.; ASAKAWA, M.; KAWASUMI, M.; KOBAYASHI, T.; MORIOKA, H.; CHIBA, K.; TOYAMA, Y.; YOSHIMURA, A. IL-1 β and TNF α -initiated IL-6–STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. **Int. Immunol.**, v. 23, n. 11, p. 701–712, 2011.

MUDHAKIR, D.; HARASHIMA, H. Learning from the viral journey: how to enter cells and how to overcome intracellular barriers to reach the nucleus. **AAPS J.**, v. 11, n. 1, p. 65–77, 2009.

MUKHERJEE, S.; HUDA, S.; SINHA BABU, S. P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. **Scand. J. Immunol.**, v. 90, n. 1, p. e12771, 2019.

MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.

NAKKHARA, P., CHONGSUWIVATWONG, V., & THAMMAPALO, S. (2013). Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 107(12), 789-796.

NARENDRA, S. C.; CHALISE, J. P.; HÖÖK, N.; MAGNUSSON, M. Dendritic cells activated by double-stranded RNA induce arthritis via autocrine type I IFN signaling. **J. Leukoc. Biol.**, v. 95, n. 4, p. 661–666, 2014.

NARESH KUMAR, C. V. M.; SAI GOPAL, D. V. R. Reemergence of Chikungunya virus in Indian subcontinent. **Indian J. Virol.**, v. 21, n. 1, p. 8–17, 2010.

NG, L. F. P.; CHOW, A.; SUN, Y.-J.; KWEK, D. J. C.; LIM, P.-L.; DIMATATA, F.; NG, L.-C.; OOI, E.-E.; CHOO, K.-H.; HER, Z. IL-1 β , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4261, 2009.

OH, D.-Y.; TAUBE, S.; HAMOUDA, O.; KÜCHERER, C.; POGGENSEE, G.; JESSEN, H.; ECKERT, J. K.; NEUMANN, K.; STOREK, A.; POULIOT, M. A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. **J. Infect. Dis.**, v. 198, n. 5, p. 701–709, 2008.

OLIVEIRA, L. C. DE; RAMASAWMY, R.; BORGES, J. D.; MARIN, M. L. C.; MULLER, N. G.; KALIL, J.; GOLDBERG, A. C. Frequência de polimorfismo de nucleotídeo único de alguns genes da resposta imune em amostra populacional da cidade de São Paulo, Brasil. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, p. 359–366, 2011.

PAIXÃO, E. S.; RODRIGUES, L. C.; COSTA, M. DA C. N.; ITAPARICA, M.; BARRETO, F.; GÉRARDIN, P.; TEIXEIRA, M. G. Chikungunya chronic disease: a

systematic review and meta-analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 112, n. 7, p. 301–316, 2018.

PATERSON, H. E.; MCINTOSH, B. M. Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962: II.—Transmission Experiments with the *Aedes Furcifer-Taylori* Group of Mosquitoes and with a Member of the *Anopheles Gambiae* Complex. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 58, n. 1, p. 52–55, 1964.

PATI, A.; PADHI, S.; CHAUDHURY, S.; PANDA, A. K. TLR3 (rs3775291) variant is not associated with SARS-CoV-2 infection and related mortality: A population-based correlation analysis. **Hum. Cell**, v. 34, n. 4, p. 1274–1277, 2021.

POO, Y. S.; NAKAYA, H.; GARDNER, J.; LARCHER, T.; SCHRODER, W. A.; LE, T. T.; MAJOR, L. D.; SUHRBIER, A. CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. **J. Virol.**, v. 88, n. 12, p. 6862–6872, 2014.

PRADO ACOSTA, M.; GEOGHEGAN, E. M.; LEPENIES, B.; RUZAL, S.; KIELIAN, M.; MARTINEZ, M. G. Surface (S) layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* block virus infection via DC-SIGN interaction. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 810, 2019.

RESTREPO, B. N.; MARÍN, K.; ROMERO, P.; ARBOLEDA, M.; MUÑOZ, A. L.; BOSCH, I.; VÁSQUEZ-SERNA, H.; TORRES, O. A. Role of cytokines, chemokines, C3a, and mannose-binding lectin in the evolution of the chikungunya infection. **Am. J. Clin. Exp. Immunol.**, v. 11, n. 3, p. 51, 2022.

REYKANDE, S. E.; REZAEI, A.; SADR, M.; SHABANI, M.; VARZANEH, F. N.; ZIAEE, V.; REZAEI, N. Association of interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis. **Clin. Rheumatol.**, v. 37, n. 10, p. 2661–2665, 2018.

RIBEIRO, A. R.; SANTOS, C. N.; RIBEIRO, D. R.; CARDOSO, J. A.; CAZZANIGA, R. A.; MAGALHAES, L. S.; DE SOUZA, M. S.; FONSECA, A. B.; BISPO, A. J.; PORTO, R. L. ASSOCIATION BETWEEN ZIKA VIRUS MICROCEPHALY IN THE NEWBORN WITH THE RS3775291 VARIANT AT TOLL-LIKE RECEPTOR 3 AND RS1799964 VARIANT AT TNFA GENES. AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. **Anais...AMER SOC TROP MED & HYGIENE** 8000 WESTPARK DR, STE 130, MCLEAN, VA 22101 USA,

2019

RIBÉRA, A.; DEGASNE, I.; BANDJEE, J.; GASQUE, P. Chronic rheumatic manifestations following chikungunya virus infection: clinical description and therapeutic considerations. **Med. Trop. Rev. du Corps sante Colon.**, v. 72, p. 83–85, 2012.

ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 family cytokines. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 10, n. 2, p. a028415, 2018.

RUEDA, B.; REDDY, M. V. P. L.; GONZÁLEZ-GAY, M. A.; BALSÁ, A.; PASCUAL-SALCEDO, D.; PETERSSON, I. F.; EIMON, A.; PAIRA, S.; SCHERBARTH, H. R.; PONS-ESTEL, B. A. Analysis of IRF5 gene functional polymorphisms in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.**, v. 54, n. 12, p. 3815–3819, 2006.

RUIZ, U. E. A.; SANTOS, I. A.; GROSCHE, V. R.; FERNANDES, R. S.; DE GODOY, A. S.; TORRES, J. D. A.; FREIRE, M. C. L. C.; MESQUITA, N. C. DE M. R.; GUEVARA-VEGA, M.; NICOLAU-JUNIOR, N. Imidazonaphthyridine effects on Chikungunya virus replication: Antiviral activity by dependent and independent of interferon type 1 pathways. **Virus Res.**, v. 324, p. 199029, 2023.

RUPP, J. C.; SOKOŁOSKI, K. J.; GEBHART, N. N.; HARDY, R. W. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. **J. Gen. Virol.**, v. 96, n. Pt 9, p. 2483, 2015.

RUST, R. S. **Human arboviral encephalitis**. Seminars in pediatric neurology. **Anais...Elsevier**, 2012

SÁ, K. S. G. DE; PIRES-NETO, O. DE S.; SANTANA, B. B.; GOMES, S. T. M.; AMORAS, E. DA S. G.; CONDE, S. R. DA S.; DEMACHKI, S.; AZEVEDO, V. N.; MACHADO, L. F. A.; MARTINS-FEITOSA, R. N. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms are not associated with the risk of hepatitis B and hepatitis C virus infection. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 48, p. 136–142, 2015.

SANTOS, M. C. D.; NASCIMENTO, Y. M.; MONTEIRO, J. D.; ALVES, B. E. B.; MELO, M. F.; PAIVA, A. A. P.; PEREIRA, H. W. B.; MEDEIROS, L. G.; MORAIS, I. C.; NETO, J. C. F. ATR-FTIR spectroscopy with chemometric algorithms of multivariate classification in the discrimination between healthy vs. dengue vs.

chikungunya vs. zika clinical samples. **Anal. Methods**, v. 10, n. 10, p. 1280–1285, 2018.

SAXENA, A. B.; JAWATKAR, J.; MURTHY, J. M. K.; RATH, A.; GURUPRASAD, H. Entrapment Neuropathies in Chikungunya Arthritis: Clinical and Electrodiagnostic Study. **Ann. Indian Acad. Neurol.**, v. 11, 2008.

SCHILTE, C.; COUDERC, T.; CHRETIEN, F.; SOURISSEAU, M.; GANGNEUX, N.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; KRAXNER, A.; TSCHOPP, J.; HIGGS, S.; MICHAULT, A. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **J. Exp. Med.**, v. 207, n. 2, p. 429–442, 2010.

SENGUPTA, S.; BHATTACHARYA, N.; TRIPATHI, A. Increased CRP, anti-CCP antibody, IL-2R, COMP levels in prognosis of post-chikungunya chronic arthritis and protective role of their specific genotypes against arthritic manifestation. **Virus Res.**, v. 323, p. 198998, 2023.

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; BHATTACHARYA, N.; TRIPATHI, A. Differential genotypic signatures of Toll-like receptor polymorphisms among dengue-chikungunya mono-and co-infected Eastern Indian patients. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, p. 1–13, 2021.

SEPÚLVEDA-CRESPO, D.; JIMÉNEZ-SOUSA, M. A.; FERNÁNDEZ-RODÍGUEZ, A.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M. A.; JIMÉNEZ, J. L.; MORENO, S.; GARCIA, F.; MARTÍNEZ, I.; BENITO, J. M.; RALLÓN, N. IRF5-TNOP3 polymorphisms are associated with elite control of HIV infection: A retrospective study. **J. Med. Virol.**, v. 95, n. 6, p. e28841, 2023.

SHEN, N.; FU, Q.; DENG, Y.; QIAN, X.; ZHAO, J.; KAUFMAN, K. M.; WU, Y. L.; YU, C. Y.; TANG, Y.; CHEN, J.-Y. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 107, n. 36, p. 15838–15843, 2010.

SIGURDSSON, S.; PADYUKOV, L.; KURREEMAN, F. A. S.; LILJEDAHL, U.; WIMAN, A.; ALFREDSSON, L.; TOES, R.; RÖNNELID, J.; KLARESKOG, L.; HUIZINGA, T. W. J. Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum. Off. J. Am. Coll. Rheumatol.**, v. 56, n. 7, p. 2202–2210, 2007.

SILVA JR, J. V. J.; LUDWIG-BEGALL, L. F.; DE OLIVEIRA-FILHO, E. F.; OLIVEIRA, R. A. S.; DURÃES-CARVALHO, R.; LOPES, T. R. R.; SILVA, D. E. A.; GIL, L. H. V. G. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology,

clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Trop.**, v. 188, p. 213–224, 2018.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **J. Clin. Invest.**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.

SILVA, R. X. L.; DE LIMA, R. S.; WANDENKOLK, N. A. ARTRITE REUMATOIDE: UM LEGADO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA. [s.d.].

SILVA, M. J. A.; SILVA, C. S.; DA SILVA VIEIRA, M. C.; DOS SANTOS, P. A. S.; FROTA, C. C.; LIMA, K. V. B.; LIMA, L. N. G. C. The relationship between TLR3 rs3775291 polymorphism and infectious diseases: A meta-analysis of case-control studies. *Genes (Basel)*, v. 14, n. 7, p. 1311, 2023.

SIMÕES, A. D.; JÚNIOR, Á. N. M.; DA SILVA OLIVEIRA, A. B.; PEREIRA, A. C. P.; DE FIGUEIREDO, B. Q.; DA SILVA PINHEIRO, F. E.; LOPES, L. F. P. Principais distúrbios do sono e seus impactos na qualidade de vida humana: uma revisão sistemática de literatura. **Res. Soc. Dev.**, v. 11, n. 5, p. e38411528457–e38411528457, 2022.

SIMON, F.; JAVELLE, E.; CABIE, A.; BOUQUILLARD, E.; TROISGROS, O.; GENTILE, G.; LEPARC-GOFFART, I.; HOEN, B.; GANDJBAKHCH, F.; RENE-CORAIL, P. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Med Mal Infect**, v. 45, n. 7, p. 243–263, 2015.

SINGH, A. K.; PRAKASH, S.; GARG, R. K.; JAIN, P.; KUMAR, R.; JAIN, A. Study of Single Nucleotide Polymorphisms in Endosomal Toll-Like Receptors-3, 7, and 9 Genes in Patients With Dengue: A Case-Control Study. **Cureus**, v. 13, n. 5, 2021.

SIRONI, M.; BIASIN, M.; CAGLIANI, R.; FORNI, D.; DE LUCA, M.; SAULLE, I.; CAPUTO, S. LO; MAZZOTTA, F.; MACÍAS, J.; PINEDA, J. A. A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. **J. Immunol.**, v. 188, n. 2, p. 818–823, 2012.

SOUSA, A. J. DOS S.; SILVA, M. C. DA; CASTRO, S. S. DE. Impacto da Chikungunya na qualidade de vida, Fortaleza/CE. 2018.

SOUYRIS, M.; MEJÍA, J. E.; CHAUMEIL, J.; GUÉRY, J.-C. **Female predisposition to TLR7-driven autoimmunity: gene dosage and the escape from X chromosome inactivation.** *Seminars in immunopathology. Anais...Springer*, 2019

SOUZA, T. M. L.; VIEIRA, Y. R.; DELATORRE, E.; BARBOSA-LIMA, G.; LUIZ, R. L. F.; VIZZONI, A.; JAIN, K.; MIRANDA, M. M.; BHUVA, N.; GOGARTEN, J. F. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Sci. Rep.**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019.

SPIERING, A. E.; DE VRIES, T. J. Why females do better: the X chromosomal TLR7 gene-dose effect in COVID-19. **Front. Immunol.**, v. 12, p. 756262, 2021.

SPUUL, P.; BALISTRERI, G.; KÄÄRIÄINEN, L.; AHOLA, T. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. **J. Virol.**, v. 84, n. 15, p. 7543–7557, 2010.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 15, n. 10, p. 597–611, 2019.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.-C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 8, n. 7, p. 420–429, 2012.

TANG, N.; HUANG, J.; CHEN, C.; WU, X.; XU, H.; CHEN, G.; XUE, H. Polymorphisms and haplotypes of IL2RA, IL10, IFNG, IRF5, and CCR2 are associated with Epstein–Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in children. *Pediatr. Blood Cancer*, v. 68, n. 8, p. e29097, 2021.

TAUIL, P. L. Transmissibility conditions of chikungunya fever. **Epidemiol. e Serviços Saúde**, v. 23, n. 4, p. 773–774, 2014.

TENG, T.-S.; KAM, Y.-W.; LEE, B.; HAPUARACHCHI, H. C.; WIMAL, A.; NG, L.-C.; NG, L. F. P. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. **J. Infect. Dis.**, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 2015.

THIBERVILLE, S.-D.; MOYEN, N.; DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; NOUGAIREDE, A.; GOULD, E. A.; ROQUES, P.; DE LAMBALLERIE, X. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res.**, v. 99, n. 3,

p. 345–370, 2013.

THIBOUTOT, M. M.; KANNAN, S.; KAWALEKAR, O. U.; SHEDLOCK, D. J.; KHAN, A. S.; SARANGAN, G.; SRIKANTH, P.; WEINER, D. B.; MUTHUMANI, K. Chikungunya: a potentially emerging epidemic? **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 4, p. e623, 2010.

THOMAS, G.; MICCI, L.; YANG, W.; KATAKOWSKI, J.; ODERUP, C.; SUNDAR, P.; WANG, X.; GELES, K. G.; POTLURI, S.; SALEK-ARDAKANI, S. Intra-tumoral activation of endosomal TLR pathways reveals a distinct role for TLR3 agonist dependent type-1 interferons in shaping the tumor immune microenvironment. **Front. Oncol.**, v. 11, p. 711673, 2021.

THOMPSON, C. D.; MATTA, B.; BARNES, B. J. Therapeutic targeting of IRFs: pathway-dependence or structure-based? **Front. Immunol.**, v. 9, p. 2622, 2018.

TREJO-DE LA O, A.; HERNANDEZ-SANCEN, P.; MALDONADO-BERNAL, C. Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. **Genes Immun.**, v. 15, n. 4, 2014.

TSETSARKIN, K. A.; WEAVER, S. C. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 12, p. e1002412, 2011.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S.; HOORNWEG, T. E.; RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; SMIT, J. M. Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647–3674, 2015.

VOLK, S. M.; CHEN, R.; TSETSARKIN, K. A.; ADAMS, A. P.; GARCIA, T. I.; SALL, A. A.; NASAR, F.; SCHUH, A. J.; HOLMES, E. C.; HIGGS, S. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. **J. Virol.**, v. 84, n. 13, p. 6497–6504, 2010.

WANG, C.; ENG, H.; LIN, K.; LIU, H.; CHANG, C.; LIN, T. Functional polymorphisms of TLR8 are associated with hepatitis C virus infection. **Immunology**, v. 141, n. 4, p. 540–548, 2014.

WANG, T.; MARKEN, J.; CHEN, J.; TRAN, V. B.; LI, Q.-Z.; LI, M.; CEROSALETTI, K.; ELKON, K. B.; ZENG, X.; GILTIAY, N. V. High TLR7

expression drives the expansion of CD19⁺ CD24^{hi}CD38^{hi} transitional B cells and autoantibody production in SLE patients. **Front. Immunol.**, v. 10, p. 1243, 2019.

WANG, X.; GUO, J.; WANG, Y.; XIAO, Y.; WANG, L.; HUA, S. Expression levels of interferon regulatory factor 5 (IRF5) and related inflammatory cytokines associated with severity, prognosis, and causative pathogen in patients with community-acquired pneumonia. **Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.**, v. 24, p. 3620, 2018.

WEAVER, S. C.; CHEN, R.; DIALLO, M. Chikungunya virus: role of vectors in emergence from enzootic cycles. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 65, p. 313–332, 2020.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.

WEBB, L. G.; VELOZ, J.; PINTADO-SILVA, J.; ZHU, T.; RANGEL, M. V.; MUTETWA, T.; ZHANG, L.; BERNAL-RUBIO, D.; FIGUEROA, D.; CARRAU, L. Chikungunya virus antagonizes cGAS-STING mediated type-I interferon responses by degrading cGAS. **PLoS Pathog.**, v. 16, n. 10, p. e1008999, 2020.

WEBER, C.; BÜCHNER, S. M.; SCHNIERLE, B. S. A small antigenic determinant of the Chikungunya virus E2 protein is sufficient to induce neutralizing antibodies which are partially protective in mice. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 4, p. e0003684, 2015.

WEINBREN, M. P. The Occurrence of Ghikungunya Virus in Uganda. II. The Occurrence of Ghikungunya Virus in Man on the Entebbe Peninsula. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 3, p. 258–259, 1958.

WILL, R. B.; MENDES, I. R.; DA MOTTA, O. J. R.; DE OLIVEIRA PEREIRA, S.; ASSUNÇÃO, M. N.; SANTANA, L. A. Chikungunya. **SAÚDE DINÂMICA**, v. 3, n. 1, p. 35–48, 2021.

WINTACHAI, P.; WIKAN, N.; KUADKITKAN, A.; JAIMIPUK, T.; UBOL, S.; PULMANAUSAHAKUL, R.; AUEWARAKUL, P.; KASINRERK, W.; WENG, W.; PANYASRIVANIT, M. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **J. Med. Virol.**, v. 84, n. 11, p. 1757–1770, 2012.

YOKOTA, S.; OKABAYASHI, T.; FUJII, N. The battle between virus and host: modulation of Toll-like receptor signaling pathways by virus infection. **Mediators Inflamm.**, v. 2010, 2010.

YUE, M.; FENG, L.; WANG, J.; XUE, X.; DING, W.; ZHANG, Y.; DENG, X. Sex-specific association between X-linked Toll-like receptor 7 with the outcomes of hepatitis C virus infection. **Gene**, v. 548, n. 2, p. 244–250, 2014.

ZANOTTO, P. M. DE A.; LEITE, L. C. DE C. The challenges imposed by Dengue, Zika, and Chikungunya to Brazil. **Front. Immunol.**, v. 9, p. 1964, 2018.

ZHOU, P.; FAN, L.; YU, K.; ZHAO, M.; LI, X. Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. **FASEBJ.**, v. 25, n. 10, p. 3489–3495, 2011.

APÊNDICE A – FICHA PARA COLETA DE DADOS

QUESTIONÁRIO

Paciente/AmostraNº: _____ Amostras coletadas: _____

Data do atendimento: _____

Local do atendimento: _____

Identificação: _____

Data de nascimento: _____ Sexo: _____

Endereço: _____ N° _____

Complemento: _____

Bairro: _____ Cidade _____

Telefone: () _____ Celular: () _____

1. Já teve Chikungunya? () SIM () NÃO

Quando (mês/ano) _____

2. Apresentou:

() Febre alta () Dor de cabeça () Dor articular () Náuseas () Dor retroorbitária ()
Prostração () Diarreia () vômitos () Mialgia/dor muscular () Tontura () Fadiga () Dor
nas costas () Convulsão () paralisia () Manifestações hemorrágicas

() Manchas/erupções na pele () Dor abdominal

Outros: _____

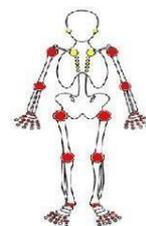
3. Apresentou edema (inchaço) nas articulações afetadas? () SIM () NÃO

4. Apresentou ansiedade, depressão ou desmotivação pós infecção? () SIM () NÃO

Se sim, qual(s) deste(s)? _____

5. Data aproximada do início da manifestação dos sintomas: _____

Marcar com X
as articulações
afetadas



ANEXO A– PARECER DO COMITE DE ÉTICA

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de polimorfismos genéticos associados aos processos de imunorregulação em pacientes acometidos por Chikungunya

Pesquisador: JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03271118.2.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.212.740

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que pretende investigar a associação entre polimorfismos de genes envolvidos nos processos de imunorregulação e a progressão da doença em pacientes acometidos por Chikungunya.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

Investigar a associação entre polimorfismos de genes envolvidos nos processos de imunorregulação e a progressão da doença em pacientes acometidos por Chikungunya.

Específicos:

- Investigar polimorfismos de genes de citocinas imunorreguladoras (IL-6, IL-10, TGF-beta, TNF);
- Investigar polimorfismos de genes de moléculas de superfície (CTLA-4, DC-sign);
- Investigar polimorfismos de fatores de transdução de sinal e transcrição (JAK1, NF-kB);
- Associar a evolução clínica dos pacientes com a distribuição genotípica e as frequências alélicas dos polimorfismos;
- Comparar os grupos controles x pacientes em relação ao genótipo apresentado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: mínimos associados a coleta de sangue e estão descritos no TCLE.

Benefícios: indiretos para os participantes, pois serão fontes de conhecimento que poderão ser

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de polimorfismos genéticos associados aos processos de imunoregulação em pacientes acometidos por Chikungunya

Pesquisador: JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03271118.2.0000.5054

Instituição Proponente: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.212.740

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que pretende investigar a associação entre polimorfismos de genes envolvidos nos processos de imunoregulação e a progressão da doença em pacientes acometidos por Chikungunya.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

Investigar a associação entre polimorfismos de genes envolvidos nos processos de imunoregulação e a progressão da doença em pacientes acometidos por Chikungunya.

Específicos:

- Investigar polimorfismos de genes de citocinas imunorreguladoras (IL-6, IL-10, TGF-beta, TNF);
- Investigar polimorfismos de genes de moléculas de superfície (CTLA-4, DC-sign);
- Investigar polimorfismos de fatores de transdução de sinal e transcrição (JAK1, NF-kB);
- Associar a evolução clínica dos pacientes com a distribuição genotípica e as frequências alélicas dos polimorfismos;
- Comparar os grupos controles x pacientes em relação ao genótipo apresentado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: mínimos associados a coleta de sangue e estão descritos no TCLE.

Benefícios: indiretos para os participantes, pois serão fontes de conhecimento que poderão ser

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-275

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 3.212.740

utilizados futuramente para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da chikungunya.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo transversal, onde serão incluídos indivíduos (> 18 anos, n=200) que apresentaram, nos anos de 2016, 2017 ou 2018, pelo menos três sintomas clássicos de febre chikungunya (febre súbita, dor de cabeça, mialgia, erupção cutânea e dor nas articulações), com sorologia positiva (IgG- anti CHIKV positiva).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1219385.pdf	19/02/2019 12:18:19		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles_polimorfismo_atual.pdf	19/02/2019 12:17:55	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes_polimorfismo_atual.pdf	19/02/2019 12:17:37	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Folha de Rosto	rostho.pdf	21/11/2018 17:13:46	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Orçamento	valores.pdf	16/11/2018 10:48:09	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_atual.pdf	16/11/2018 10:24:28	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	questionario.pdf	30/10/2018 09:47:38	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 3.212.740

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes_polimorfismo.pdf	30/10/2018 09:35:43	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controles_polimorfismo.pdf	30/10/2018 09:35:31	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	coparticipante_hsj.pdf	30/10/2018 09:27:18	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	compromisso_hsj.pdf	30/10/2018 09:27:01	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	termo_confidencialidae_hsj.pdf	30/10/2018 09:26:38	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	onus_hsj.pdf	30/10/2018 09:26:13	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	termo_confidencialidae_hemoce.pdf	30/10/2018 09:25:49	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	comprometimento_hemoce.pdf	30/10/2018 09:25:27	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	fiel_hsj.pdf	30/10/2018 09:24:58	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	fiel_hemoce.pdf	30/10/2018 09:24:32	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_polimorfismos_final.pdf	30/10/2018 09:23:54	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	carta_hemoce.pdf	30/10/2018 09:23:20	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	carta_hsj.pdf	30/10/2018 09:22:58	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Outros	carta_propesq.pdf	30/10/2018 09:22:30	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	participantes.pdf	30/10/2018 09:17:11	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_hsj.pdf	30/10/2018 09:16:44	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_hemoce.pdf	30/10/2018 09:16:27	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_dact.pdf	30/10/2018 09:16:11	JULIANA NAVARRO UEDA YAOCHITE	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
 Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-275
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3366-8344 E-mail: comepe@ufc.br

UFC - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 3.212.740

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 21 de Março de 2019

Assinado por:
FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1000
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-275
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8344 **E-mail:** comepe@ufc.br

ANEXO B – PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2023) 56: e12557, <https://doi.org/10.1590/1414-431X2023e12557>

ISSN 1414-431X

Review



1/11

Influence of host genetic polymorphisms involved in immune response and their role in the development of Chikungunya disease: a review

W.J.P. Gotay¹, R.O. Rodrigues¹, and J.N.U. Yaochite¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Chikungunya virus (CHIKV) is transmitted by the bite of infected mosquitoes and can cause significant pathogenicity in humans. Moreover, its importance has increased in the Americas since 2013. The primary vectors for viral delivery are the mosquito species *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Several factors, including host genetic variations and immune response against CHIKV, influence the outcomes of Chikungunya disease. This work aimed to gather information about different single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes that influence the host immune response during an infection by CHIKV. The viral characteristics, disease epidemiology, clinical manifestations, and immune response against CHIKV are also addressed. The main immune molecules related to this arboviral disease elucidated in this review are *TLR3/7/8*, *DC-SIGN*, *HLA-DRB1/HLA-DQB1*, *TNF*, *IL1RN*, *OAS2/3*, and *CRP*. Advances in knowledge about the genetic basis of the immune response during CHIKV infection are essential for expanding the understanding of disease pathophysiology, providing new genetic markers for prognosis, and identifying molecular targets for the development of new drug treatments.

Key words: Single nucleotide polymorphisms (SNPs); Chikungunya virus (CHIKV); Chikungunya disease; Immune response

Introduction

The chikungunya virus (CHIKV) is a member of the *Alphavirus* genus, belonging to the *Togaviridae* family, whose genetic material is constituted by a single strand of RNA of approximately 12 kb with positive polarity. This virus is the etiologic agent of Chikungunya disease (CHIK) and was first isolated in 1952–1953 during an epidemic in East Africa (Makonde Plateau-Tanzania) (1,2). Between 1960 and 1990, CHIK outbreaks occurred sporadically in Africa and Asia, reappearing more frequently from 2000 onwards and spreading to other countries (3). In 2014, CHIKV was responsible for causing a major epidemic in Brazil, mainly affecting the Northeast region (4). In the Americas alone, about 693,489 suspected cases and 37,480 confirmed cases of CHIK were reported in 2015 (5,6). In 2022, from January until November 23, 2022, a total of 362,021 cases and 77 deaths were reported. The majority of cases have been reported in Brazil (247,537) (7). CHIKV infection may have different clinical presentations. The acute phase of Chikungunya is associated with various symptoms and characterized by the onset of high fever, polyarthrititis, and maculopapular rash. The chronic phase is marked by arthritogenic manifestations lasting

>3 months and the onset of rheumatic symptoms (8). After the bite of an infected mosquito, CHIKV is inoculated into the blood capillaries and dermis, where it infects resident skin cells such as keratinocytes and dermal fibroblasts, initiating the first cycle of viral replication (9). The main sites of secondary infection are the muscles and joints, causing polyarthralgia/polyarthrititis. The incubation period for CHIKV is usually 2 to 7 days in most cases (10). Numerous risk factors for developing severe disease in adult patients have been reported, including age and gender. Moreover, host genetic variation has a significant influence on the immune response and outcome of CHIKV infections. It modulates the disease, influences viral entry into cells, symptom onset and progression, and individual susceptibility or resistance to infection (11,12). Thus, the knowledge of the host profile of genes that influence or contribute to the outcome and susceptibility of CHIKV infection is an essential tool to elucidate the pathophysiology of this arboviral disease and its progression (2,13). Therefore, the present review aimed to identify in the literature the influence of host genetic variations on the immune response during CHIKV

Correspondence: J.N.U. Yaochite: <ueda.juliana@gmail.com>

Received February 13, 2023 | Accepted July 22, 2023

Braz J Med Biol Res | doi: 10.1590/1414-431X2023e12557

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 **X-linked polymorphisms in *TLR7* and *TLR8* genes are associated with**
2 **protection against Chikungunya fever and chronic pain**

3

4 Wilker Jose Perez Gotay¹, Mariella Sousa Coelho Maciel¹, Raphael de Oliveira
5 Rodrigues¹, Cynthia Chester Cardoso², Caroline Nobre Oliveira¹, Artur Fontenelle
6 Lima Montenegro¹, Juliana Navarro Ueda Yaochite* ¹.

7

8

9 1- Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of
10 Ceará. R. Pastor Samuel Munguba, 1210, - Rodolfo Teófilo - CEP: 60430-
11 372, Fortaleza, Ceará, Brazil.

12 2- Laboratório de Virologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade
13 Federal do Rio de Janeiro, Brazil.

14

15 *Corresponding author: JNU, Yaochite. R. Pastor Samuel Munguba, 1210, - Rodolfo
16 Teófilo - CEP: 60430-372, Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail:
17 ueda.juliana@gmail.com.

18 ORCID ID - <https://orcid.org/0000-0002-9666-5992>

19

20

21 ***Running title = TLR7 and TLR8 SNPs in Chikungunya***

22

23

24

