

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



Andre Frederico Martins

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COMO BIOMARCADORES DE FASES AGUDA
E SUBAGUDA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM VÍRUS CHIKUNGUNYA,
ATENDIDOS NO HOSPITAL MUNICIPAL MOARCYR RODRIGUES DO CARMO,
DUQUE DE CAXIAS, RJ.**

**Duque de Caxias
2020**

Andre Frederico Martins

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COMO BIOMARCADORES DE FASES AGUDA
E SUBAGUDA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM VÍRUS CHIKUNGUNYA,
ATENDIDOS NO HOSPITAL MUNICIPAL MOARCYR RODRIGUES DO CARMO,
DUQUE DE CAXIAS, RJ.**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional (UNIGRANRIO/INMETRO/UEZO) de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (PPGBIOTRANS) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador: Dr. Sergian Vianna Cardozo

**Duque de Caxias
2020**

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO - NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

M386m

Martins, Andre Frederico.

Mediadores inflamatórios como biomarcadores de fase aguda e subaguda de pacientes diagnosticados com vírus *chikungunya*, atendidos no Hospital Municipal Moacyr Rodrigues do Carmo / Andre Frederico Martins. – Duque de Caxias, 2020.

83 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Biomedicina Translacional) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2020.

“Orientador: Dr. Sergian Vianna Cardozo”.

Referências: f. 65-73.

1. Biomedicina. 2. Arboviroses. 3. *Chikungunya*. 4. Biomarcadores. 5. Diagnóstico de laboratório. 6. Inflamação. 7. Hospital Municipal Moacyr Rodrigues do Carmo. I. Cardozo, Sergian Vianna. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. III. Título.

CDD –

André Frederico Martins

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS COMO BIOMARCADORES DE FASES AGUDA
E SUBAGUDA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM VÍRUS CHIKUNGUNYA,
ATENDIDOS NO HOSPITAL MUNICIPAL MOARCYR RODRIGUES DO CARMO,
DUQUE DE CAXIAS, RJ.**

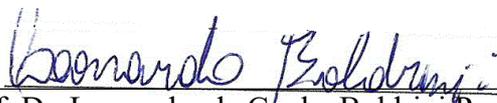
Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio
“Prof. José de Souza Herdy” UNIGRANRIO para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas.

Aprovada em 16 de outubro de 2020.

Banca Examinadora



Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Maria Pereira
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



Prof. Dr. Leonardo, da Cunha Boldrini Pereira
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO



Prof^ª. Dr^ª. Áurea Valadares Folgueras Flatschart
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, fortaleza e clareza mental e espiritual para ultrapassar todas as barreiras que me foram impostas.

Ao meu orientador, professor Dr. Sergian Vianna Cardozo, pela paciência comigo e pelo seu acompanhamento competente e participativo ao longo de cada etapa da pesquisa.

A professora Dr^a Thaís Accorsi Mendonça pelo apoio e pela continuidade do projeto.

Aos professores Wander Stayner Barbosa Martins e Dr^a Danielle Sequeira Corrêa pelo carinho e disponibilizar do seu tempo para me ajudar em momentos que precisei.

A todos do Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas (NPDI) da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), que estiveram juntos em toda essa caminhada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional (PPGBIOTRANS) que passaram por minha vida acadêmica, acrescentando sempre algo importante na minha carreira profissional.

Aos colegas e alunos do PPGBIOTRANS - UNIGRANRIO.

Há todos meus amigos, em especial Lucieny Souza e Alfeu Barreto, por sempre estarem ao meu lado, para que eu me mantivesse “de pé” e motivado a continuar.

“A gente não faz ideia de como mudou até que a mudança já tenha acontecido.”

Anne Frank

RESUMO

Os sintomas de chikungunya (CHIK) incluem manifestações agudas, entre as quais febre e dores fortes nas articulações e músculos são proeminentes. No entanto, existe uma preocupação crescente com as manifestações de longa duração, muitas vezes associadas aos efeitos incapacitantes da doença, com interferência direta na saúde geral e qualidade de vida do paciente. O objetivo deste trabalho foi determinar os mediadores inflamatórios (biomarcadores), presentes no soro de pacientes que apresentam a fase aguda e subaguda de CHIK. O *locus* da pesquisa foi a Unidade de Pronto Atendimento Beira Mar, localizada no município de Duque de Caxias (RJ), no qual foram investigados 175 pacientes com suspeita clínica de arboviroses (dengue, zika e CHIK). Critérios clínicos estabelecidos pelo Ministério da Saúde deram suporte à análise dos prontuários. Testes de biologia molecular (RT-qPCR) e imunodiagnóstico (ELISA) foram realizados para seleção das amostras de fase aguda (n = 17) e subaguda (n = 08). Ensaios em Luminex[®] foram realizados para determinação de 27 biomarcadores, nos referidos grupos experimentais, e os resultados obtidos foram confrontados com os do grupo controle (n = 13). Os resultados revelaram que os pacientes suspeitos de CHIK apresentarem quadro de artralgia, variando de moderada a intensa (91/94; 96,8%), e de artrite (77/94; 81,9%), verificados como sintomas claramente mais frequentes. O aumento significativo da expressão dos mediadores inflamatórios CXCL10/IP-10 e IL6, em pacientes de fase aguda, foram associados a uma carga viral elevada e a evolução da gravidade da doença, se mostrando importantes biomarcadores de fase aguda e subaguda de CHIK. Já a expressão, também significativamente elevada, da IL-15 e da quimiocina MCP-1 em amostras de fase aguda foi associada exclusivamente, a pacientes com inflamação artrítica, em fase inicial da doença. Para além disso, a expressão elevada de IL-1 (β e ra), TNF- α , INF- γ , IL-17a, IL-4 e IL-5, em uma amostra de fase subaguda, indicou uma transição à cronicidade, que foi corroborada com o tempo de evolução e sintomas de CHIK, apresentados pelo paciente.

Palavras-chave: arboviroses, biomarcadores, mediadores inflamatórios, diagnóstico laboratorial, chikungunya

ABSTRACT

The symptoms of chikungunya (CHIK) include acute manifestations, among which fever and severe pain in the joints and muscles are prominent. However, there is a growing concern about long-term manifestations, often associated with the disabling effects of the disease, with direct interference with the patient's general health and quality of life. The objective of this work was to determine the inflammatory mediators (biomarkers), present in the serum of patients who present the acute and subacute phase of CHIK. The research *locus* was the Beira Mar Emergency Care Unit, located in the municipality of Duque de Caxias (RJ), in which 175 patients with clinical suspicion of arboviruses (dengue, zika and CHIK) were investigated. Clinical criteria established by the Ministry of Health supported the analysis of medical records. Molecular biology (RT-qPCR) and immunodiagnostic (ELISA) tests were performed to select acute (n = 17) and subacute (n = 08) samples. Luminex[®] assays were performed to determine 27 biomarkers, in the aforementioned experimental groups, and the results obtained were compared with those of the control group (n = 13). The results revealed that patients suspected of CHIK present with arthralgia, ranging from moderate to severe (91/94; 96.8%), and arthritis (77/94; 81.9%), verified as clearly more frequent symptoms. The significant increase in the expression of inflammatory mediators CXCL10 / IP-10 and IL6, in acute phase patients, were associated with a high viral load and the evolution of the severity of the disease, proving to be important biomarkers of the acute and subacute phase of CHIK. The expression, also significantly elevated, of IL-15 and chemokine MCP-1 in acute phase samples was associated exclusively with patients with arthritic inflammation, in the initial phase of the disease. In addition, the elevated expression of IL-1 (β and α), TNF- α , INF- α , IL-17a, IL-4 and IL-5, in a subacute phase sample, indicated a transition to chronicity, which was corroborated with the time of evolution and symptoms of CHIK, presented by the patient.

Keywords: arboviroses, biomarkers, inflammatory mediators, laboratory diagnosis, chikungunya

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Estrutura física e genética do vírus chikungunya.....	17
Figura 2.	Estrutura genômica do CHIKV.....	19
Figura 3.	Incidência de casos prováveis de CHIK no Brasil.....	21
Figura 4.	Evolução clínica do CHIKV.....	26
Figura 5.	Fluxograma para diagnóstico das arboviroses DEN, CHIK e ZIK.....	28
Figura 6.	Imunoabsorção enzimática (ELISA)	37
Figura 7.	Ensaio multiplex em esferas flexíveis Luminex®	40
Figura 8.	Avaliação clínica avaliada nos prontuários analisados.....	44
Figura 9.	Expressão dos mediadores inflamatórios PDGF-BB, IL-13 e IL-8 por gênero e idade das amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.....	46
Figura 10.	Expressão dos mediadores inflamatórios IFN- γ , TNF- α , IL-17a, IL-5, IL-4, IL-1 β e IL1ra por gênero e idade das amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.....	47
Figura 11.	Expressão do mediador inflamatório MIP-1 β por gênero e idade das amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.....	51
Figura 12.	Expressão dos mediadores inflamatórios CXCL10/IP10 e IL6 por gênero e idade das amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.....	52
Figura 13.	Níveis encontrados da IL-6 em amostras do grupo experimental de fase aguda e subaguda	53
Figura 14.	Expressão dos mediadores inflamatórios eotaxin, MCP-1, CXCL10 /IP-10, IL-6 e IL-15 em amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda.....	54

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1.	Número de casos prováveis e incidência de CHIK (/100mil hab.), até a SE 52 e SE 22, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2019 e 2020.....	22
Tabela 2.	Municípios do Estado do Rio de Janeiro com as maiores incidências de casos prováveis de CHIK, por estrato populacional, semana epidemiológica 1 a 49, Brasil, 2019.....	23
Quadro 1.	Critérios clínicos utilizados para a classificação dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK.....	34
Tabela 3.	Dados das amostras classificadas como grupo controle, selecionadas para a dosagem de biomarcadores inflamatórios por ensaios Luminex [®]	39
Tabela 4.	Características clínicas dos casos prováveis de arboviroses de de pacientes atendidos na UPA Beira Mar, Duque de Caxias (RJ), no período de janeiro a junho/2018.....	43
Tabela 5.	Dados das amostras classificadas como fase aguda, selecionadas para a dosagem de biomarcadores inflamatórios por ensaios Luminex [®]	44
Tabela 6.	Dados das amostras classificadas como fase subaguda, selecionadas para a dosagem de biomarcadores inflamatórios por ensaios Luminex [®]	45

LISTA DE ABREVIACÕES

<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Ae. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
CCL2/MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos, do inglês monocyte chemoattractant protein 1
CHIK	Febre do chikungunya
CHIKV	Vírus Chikungunya
CXCL10/IP10	Proteína 10 induzida por Interferon gama, do inglês Interferon gamma-induced protein 10
DEN	Febre da dengue
DENV	Vírus Dengue
DNs	Doenças negligenciadas
ECSA	Genótipo África Central, Sul e Leste
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAM	6-carboxyfluorescein
FGF basic	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico, do inglês basic FGF Protein, Human recombinant
G-CSF	Fator estimulante da colônia de granulócitos, do inglês Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos, do inglês Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IFN- γ	Interferon gama, do inglês Interferon gamma
IL-10	Interleucina 10, do inglês Interleukin 10
IL-12	Interleucina 12, do inglês Interleukin 12
IL-13	Interleucina 13, do inglês Interleukin 13
IL-15	Interleucina 15, do inglês Interleukin 15
IL-16	Interleucina 16, do inglês Interleukin 16
IL-17	Interleucina 17, do inglês Interleukin 17
IL-1ra	Receptor Antagonista da interleucina 1, do inglês interleukin-1 receptor antagonist

IL-1 β	Interleucina 1 beta, do inglês Interleukin 1 beta
IL-2	Interleucina 2, do inglês Interleukin 2
IL-4	Interleucina 4, do inglês Interleukin 4
IL-5	Interleucina 5, do inglês Interleukin 5
IL-6	Interleucina 6, do inglês Interleukin 6
IL-7	Interleucina 7, do inglês Interleukin 7
IL-8	Interleucina 8, do inglês Interleukin 8
IL-9	Interleucina 9, do inglês Interleukin 9
IOL	Genótipo Oceano Índico
MIP-1 α	Proteínas Inflamatórias dos Macrófagos 1 alfa, do inglês Macrophage Inflammatory Proteins alfa
MIP-1 β	Proteínas Inflamatórias dos Macrófagos 1 beta, do inglês Macrophage Inflammatory Proteins beta
NK	Célula matadora natural, do inglês Natural Killer
NPDI	Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C Reativa
PDGF-BB	Fator de crescimento de plaquetas na isoforma BB, do inglês Platelet-derived growth fator BB
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
CCL5/RANTES	Ligante 5 de quimiocina, do inglês Chemokine (C-C motif) ligand 5
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RT-qPCR	Reação da Transcriptase Reversa e da Polimerase em Cadeia em Tempo Real
SMS-PMDC	Secretaria Municipal de Saúde-Prefeitura Municipal de Duque de Caxias
Th1	Linfócito T auxiliar, do inglês T helper 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2, do inglês T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês Tumor Necrosis Factor alpha
UPA	Unidade de Pronto atendimento
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês

	Vascular endothelial growth factor
WA	Vírus oeste africano
ZIK	Febre zika
ZIKV	zika vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. VÍRUS CHIKUNGUNYA: AGENTE ETIOLÓGICO E PERFIL HISTÓRICO.....	17
2.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS NO BRASIL.....	20
2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
2.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DIFERENCIAL.....	25
2.5. BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	29
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1. ÉTICA DA PESQUISA.....	33
4.2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	33
4.3. ÁREA DE ESTUDO.....	33
4.4. TRIAGEM CLÍNICA.....	34
4.5. COLETA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS.....	35
4.6. DETECÇÃO DO CHIKV.....	35
4.6.1. Extração do RNA viral	35
4.6.2. Reação da transcriptase reversa e da polimerase em cadeia em tempo real (RT-qTPCR)	36
4.7. IMUNODIAGNÓSTICO (ELISA)	36
4.8. AMOSTRAS PARA LUMINEX®.....	38
4.8.1. Grupo experimental	38
4.8.2. Grupo controle	39
4.9. ENSAIO MULTIPLEX EM ESFERAS FLEXÍVEIS LUMINEX®	40
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
4.11. VÍNCULO DA PESQUISA.....	41
5. RESULTADOS	42
5.1. ANÁLISE CLÍNICA.....	42
5.2. ENSAIOS LUMINEX®	44
6. DISCUSSÃO	55

7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	64
9. ANEXOS.....	73
Anexo I - Formulário estruturado para investigação de arbovírus.....	73
Anexo II - Questionário sobre estado de saúde passado e atual, doenças pré-existentes, uso de medicamentos e histórico familiar de doenças autoimunes para o grupo controle.....	74
Anexo III - Adendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CEP-Unigranrio) sob CAAE 70324417.1.0000.528.....	76
Anexo IV - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) referente à pesquisa proposta.....	77
Anexo V - Mediadores onde não houve diferença significativa entre os grupos experimental e controle	79
Anexo VI - Quadro com resultados encontrados após dosagem de mediadores por Luminex, avaliação clínica dos prontuários, resultados do valor de CT após RT-qPCR e valores dos resultados positivos para anticorpos anti IgG e anti IgM para CHIK.....	83

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses são um grupo de doenças virais caracterizada por sua transmissão por vetores artrópodes (*arthropode-borne virus*). Na última década, as arboviroses têm sido o ponto central das organizações e instituições de saúde pública devido a quantidade de surtos observados desde 2006, acometendo principalmente o Caribe, Índia, Sudeste asiático e América do Sul (ZAID et al., 2018).

Os arbovírus que apresentam maior circulação no Brasil são os da dengue (DENV), o chikungunya (CHIKV) e o zika (ZIKV) (BRASIL, 2015; BRASIL, 2020). DENV e ZIKV pertencem a família Flaviviridae e CHIKV à família Togaviridae. Os sintomas relacionados com as arboviroses dengue (DEN), zika (ZIK) e chikungunya (CHIK) são bastante parecidos, o que acaba interferindo no diagnóstico clínico preciso dessas doenças (RODRIGUEZ-MORALES, 2015). Além disso, estudos ainda não forneceram dados sobre os desdobramentos da associação desses arbovírus em um mesmo paciente, fato possível de ocorrer concomitantemente devido a estes vírus circularem na mesma região geográfica e serem transmitidos pelos mesmos vetores (CHAHAR et al., 2009; ARTAL & ARAUJO, 2020).

Em 2013, o CHIKV foi evidenciado nas Américas, dispersando-se pela América do Sul, chegando a cerca de 1 milhão de casos notificados (ZAID et al., 2018). Isso se deve ao clima propício, incluindo períodos chuvosos em áreas urbanas onde muitas vezes a vigilância epidemiológica de vetores é precária e por um conjunto de populações não imunizadas. Estes são os principais aspectos para o risco da disseminação de arboviroses (ZAID et al., 2018).

Em 2014 foram notificados no Brasil epidemias de CHIK com transmissão autóctone em municípios de Feira de Santana e Oiapoque, nas regiões nordeste e norte do país respectivamente. A doença se manifestou de forma significativa em Feira de Santana, onde pessoas adoeceram de forma grave, registrando-se durante a epidemia 1.319 casos de CHIK (BRASIL, 2014; RIOS et al., 2018) e 856 casos em Oiapoque (BRASIL, 2014). Nos anos seguintes (2015, 2016, 2017), devido a dispersão e adaptação vetorial, houve um espraiamento do CHIKV para as demais regiões do país.

Em 2018, o Ministério da Saúde notificou por meio de boletins epidemiológicos que a região Sudeste apresentou o maior número de pessoas infectadas pelo CHIKV no país, chegando a 51.094 casos (60%), seguido das regiões Centro-Oeste, 13.818 casos e Nordeste com 11.801 casos notificados. O Estado do Rio de Janeiro apresentou nesse período 223.4 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2018).

Em 2019, de acordo com o Ministério da Saúde, a região Sudeste demonstrou

estatisticamente o maior número de casos prováveis da CHIK em relação ao total do país, cerca de 92.414 casos já foram notificados na região. Destes casos, a maior parte são do Rio de Janeiro, com uma incidência de 499.6 casos/100 mil hab., com 66 óbitos no estado, dados descritos até a semanas epidemiológicas 1 a 52 (BRASIL, 2020).

A semelhança sintomática da DEN, CHIK e ZIK, aliadas às ferramentas laboratoriais inconclusivas disponíveis no serviço público de saúde para o diagnóstico diferencial destas arboviroses, e somado ao estágio crônico caracterizado pela persistência das condições artríticas associadas a sequelas de longo prazo, apontam a necessidade de determinar marcadores como os mediadores inflamatórios presentes em pacientes com diagnóstico de CHIK. O diagnóstico da CHIK é tipicamente baseado nas manifestações clínicas e há poucos estudos baseados em biomarcadores para detecção da infecção pelo CHIKV. Estes estudos se concentram principalmente no papel das citocinas e quimiocinas como IL-6, IL-1 β , IL-8, CCL2, CXCL9, CXCL10, MIFI e RANTES, no entanto, há uma ausência de validação (NG et al., 2009; SHARMA & JAIN, 2018).

Presentes no corpo, especialmente em tecidos corporais, sangue, urina e outros fluidos, os biomarcadores, compostos imunoativos, indicam ou identificam anormalidades e até riscos de doenças futuras (CORREIA et al., 2018). Tais estudos podem se constituir como ferramentas importantes na supervisão, conhecimento e na conduta da saúde pública, podendo gerar o desenvolvimento de imunomoduladores capazes de levar a um decréscimo da gravidade e da progressão da doença (NG et al., 2009).

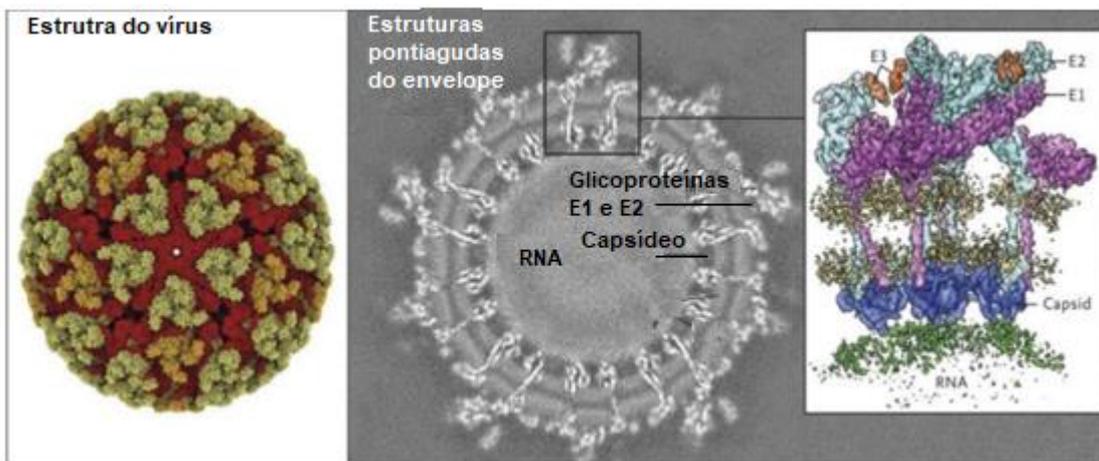
Neste sentido, as análises dos biomarcadores inflamatórios de fase aguda e subaguda de pacientes diagnosticados com CHIK podem vir a contribuir para o estabelecimento de mecanismos que viabilizem terapias minimizadoras dos sintomas em pacientes portadores dessa arbovirose.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. VÍRUS CHIKUNGUNYA: AGENTE ETIOLÓGICO E PERFIL HISTÓRICO

O CHIKV é um membro da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus* (JOHNSTON & PETERS, 1996), é envelopado e apresenta RNA de fita simples (Figura 1). O gênero *Alphavirus* engloba um conjunto de vírus transmitidos por artrópodes (GRIFFIN, 2007). Dividem-se em dois subgrupos: os encefalogênicos, onde se incluem os vírus da encefalite equina venezuelana (EEV), que infectam neurônios; e os artrítogênicos, como o CHIKV, que estão relacionados com uma maior intensidade algica de manifestações reumatológicas e erupções cutâneas (DEEBA et al., 2016). Apesar da transmissão vetorial ser a principal fonte de disseminação do vírus, a transmissão vertical foi identificada em estudo realizado na Ilha Reunion no continente africano. O estudo verificou que das 7.509 gestantes, sabidamente positivas pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) ou por imunodiagnóstico (IgM positiva), 39 gestantes com viremia, infectaram 49% dos seus recém-nascidos (CUNHA & TRINTA, 2017).

Figura 1. Estrutura física e genética do vírus chikungunya.



Legenda: O capsídeo e duas glicoproteínas do envelope, E1 e E2, que formam picos na superfície do vírion.

Fonte: Modificado de WEAVER & LECUIT (2015).

A procedência do nome chikungunya tem relação direta com o idioma Makonde, onde a dor e a incapacidade eram representadas clinicamente pelo “andar curvado”, significado de chikungunya (HONÓRIO et al., 2015; CASTRO et al., 2016). Foi descrito, pela primeira vez,

em 1952, durante um surto supostamente provocado pelo DENV, na Tanzânia, Newala, no leste africano (ROBINSON, 1955; CASTRO et al., 2016).

Existem quatro genótipos circulantes desse vírus: oeste-africano (WA); leste e centro sul africano (ECSA); asiático e oceano Índico (IOL). Tendo como vetor os mosquitos do gênero *Aedes*, eles são encontrados tanto em ciclos silvestres, atingindo hospedeiros mamíferos primatas, quanto causando epidemias urbanas, atingindo hospedeiros humanos (WEAVER, 2014; BURT et al., 2017).

Por estudos filogenéticos, foi possível estudar com maior profundidade sobre a origem do vírus, surgindo o conceito de que se deu na África Central/Oriental e, posteriormente, dispersou-se para a Ásia (GÓMEZ & ISAZA, 2016). O vírus circulante nas Américas está relacionado com os vírus originários da Indonésia e Filipinas que, dentre outras alterações, é resultado de uma deleção do gene NSP3 (GÓMEZ & ISAZA, 2016). Outra mutação importante na proteína de envelope E1 foi relacionada à epidemiologia da transmissão viral pelos mosquitos. Com essa mutação, mais tarde verificou-se um aumento maior que 90% para a progressão das epidemias de CHIK pelos países afetados (VERMA et al., 2018).

Entre as décadas de 1960 e 1990, houve um crescente número de surtos da CHIK em países da África Central e do Sul, que se iniciaram após períodos de grande pluviosidade e relacionados ao mosquito *Ae. albopictus*. Diferentemente, os surtos que ocorreram em grandes cidades, como as do sudeste asiático, tinham relação com o mosquito *Ae. aegypti* que, para sua reprodução, exigem quantidades menores de água parada, proliferando-se em ambientes urbanos com maior facilidade (VU et al., 2017).

A circulação do genótipo WA é enzoótica, relacionada basicamente com reservatórios animais, o que resulta em pequenas quantidades de focos humanos. Já o genótipo ECSA ocorre em grande quantidade de surtos humanos, e tem se expandindo cada vez mais. Em 2004, teve início no Quênia, espalhando-se para ilhas no oceano Índico e para a Índia, onde na ilha Reunion cerca de 266.000 pessoas foram infectadas (HUA & COMBE, 2017; DIAS et al., 2018).

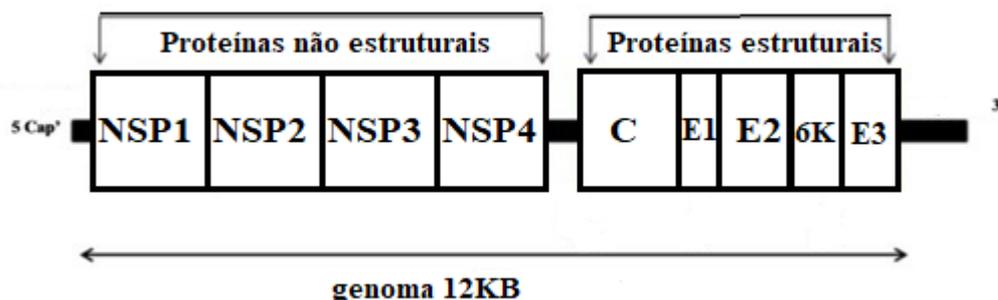
Na Itália, o primeiro caso autóctone da doença foi confirmada em 2007 (REZZA et al., 2007) e, na França, em 2009 (GRANDADAM et al., 2011). Uma mutação na proteína E1 do envelope, que expandiu a propriedade do mosquito *Ae. albopictus* de transmitir o vírus aos seres humanos, possibilitou uma maior e mais intensa dispersão do CHIKV (DONALISIO & FREITAS, 2015; VU et al., 2017). Outra expansão deste vírus ocorreu em função das viagens aéreas internacionais, onde passageiros portadores facilitavam o início de surtos locais, como os relatados na Itália, França e Américas a partir de 2013. Atualmente o vírus está presente em cinco continentes, espalhando-se continuamente (HUA & COMBE, 2017).

O vírus tem um genoma de 12 kb, é de RNA de fita simples em sentido positivo, sendo sete kb que codificam as quatro proteínas não estruturais (NSP1 a NSP4), necessárias para a transcrição e a replicação do RNA viral e quatro kb codificam as cinco proteínas estruturais do vírus C, E3, E2, 6K e E1 (Figura 2), que a partir do RNA subgenômico são sintetizadas por células infectadas (GOMÉZ & ISAZA, 2016; BURT et al., 2017). O CHIKV tem a aptidão de infectar diferentes tipos celulares, entre eles macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, penetrando na célula por meio de endocitose mediada por um receptor (CUNHA & TRINTA, 2017).

A E1 é a glicoproteína responsável pela realização da fusão do envelope com a membrana do endossomo para assim liberar o nucleocapsídeo no citosol, que às vezes consegue driblar a resposta imune (LESCAR et al., 2001; SILVA & DERMODY, 2017), a glicoproteína E2 é responsável pela ligação da partícula viral com a célula hospedeira (SMITH et al., 1995, ZHANG et al., 2005; SILVA & DERMODY, 2017) por onde o vírus entra na célula via endocitose mediada por clatrininas (SOLIGNAT et al., 2009; SILVA & DERMODY, 2017).

Na membrana das células infectadas se inicia a montagem dos viriões do CHIKV por meio das interações entre a proteína do capsídeo nuclear e o RNA genômico (TELLINGHUISEN et al., 1999; TELLINGHUISEN & KUHN, 2000, LINGER et al., 2004; BURT et al., 2017). A formação do envelope viral se dá por meio do transporte dessas proteínas para a membrana da célula hospedeira, onde o vírus é liberado da célula por meio de um processo de brotamento (CUNHA & TRINTA, 2017).

Figura 2. Estrutura genômica do CHIKV



Legenda: RNA de fita única de sentido positivo de aproximadamente 12 kb de comprimento que codifica quatro proteínas não estruturais e cinco proteínas estruturais principais do CHIKV.

2.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS NO BRASIL

O CHIKV é transmitido pelo *Ae. aegypti*, de *habitat* urbano em áreas tropicais, e pelo *Ae. albopictus*, presente principalmente em áreas rurais. Mas, este último, tem sido cada vez mais encontrado em áreas urbanas e periurbanas (CUNHA & TRINTA, 2017).

Os primeiros casos autóctones do CHIKV no Brasil foram notificados em setembro de 2014, na cidade do Oiapoque (AP) (HONÓRIO et al., 2015; PAHO, 2017). Supostamente, essa introdução do CHIKV se sucedeu à epidemia que ocorreu no Caribe em 2013. No mesmo período, outras epidemias atingiram áreas onde o vírus é visto como endêmico (África e Ásia) (WEAVER & LECUIT, 2015). Estudos de genotipagem demonstraram que a cepa do CHIKV introduzida no Brasil, na cidade de Oiapoque, foi a asiática. No mesmo período, outro surto ocorreu em Feira de Santana (BA) e foi causado pelo genótipo ECSA. No final do ano de 2014, já tinham sido notificados 3.657 casos autóctones de CHIK pelo Ministério da Saúde (CUNHA & TRINTA, 2017).

Dados do Ministério da Saúde mostraram que, em 2015, até a SE 48, foram confirmados 17.765 casos autóctones (BRASIL, 2015). Destes, 735 no Amapá (genótipo asiático) e 778 na Bahia, de genótipo africano (TEIXEIRA et al., 2015; BRASIL, 2015). Assim, observou-se que, em regiões próximas, dois tipos de genótipo estavam circulando. Uma vez caracterizada a transmissão sustentada da CHIK em uma determinada área, com a confirmação laboratorial dos primeiros casos, o Ministério da Saúde recomendou que os demais casos passassem a ser confirmados por critério clínico-epidemiológico (BRASIL, 2015).

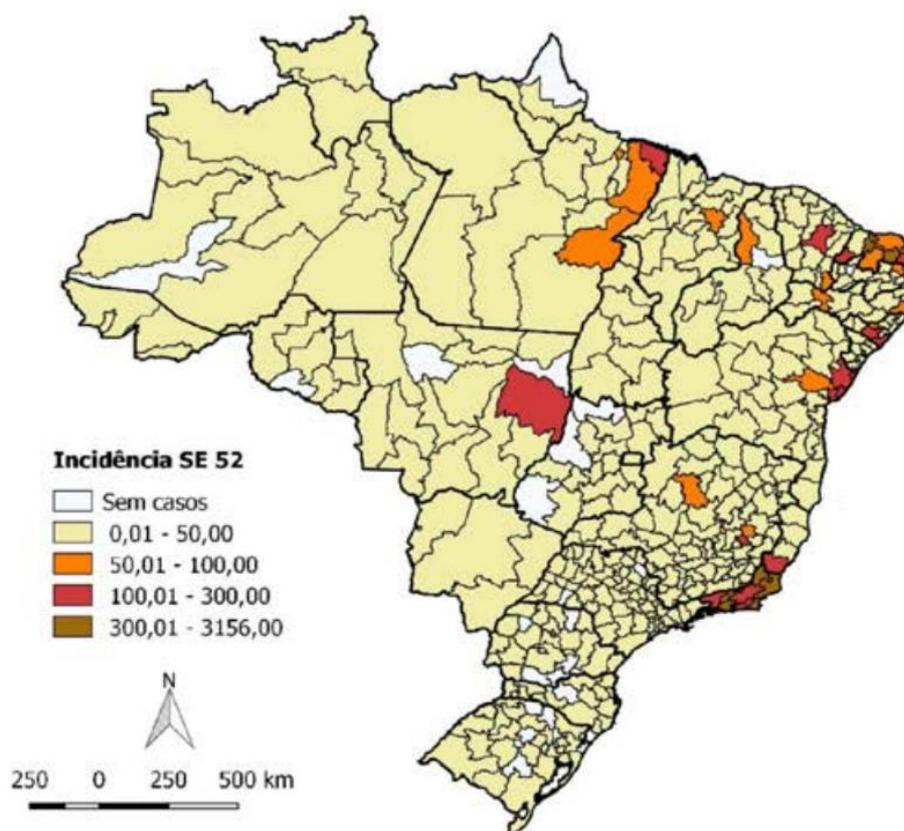
No decorrer do ano de 2016, houve 263.598 casos suspeitos. Desses, 145.059 casos foram confirmados como CHIK, distribuídos em vários estados no Brasil: Amapá (1.785), Bahia (64.704), Distrito Federal (17.801), Mato Grosso do Sul (42.896), Roraima (351), Tocantins (7.800), Amazonas (8.024), Ceará (49.845), Maranhão (23.692), Minas Gerais (527.022), Paraná (64.853), Santa Catarina (5.139), Rio grande do Norte (57.567), Alagoas (17.080), Sergipe (3.382), Pernambuco (66.331), São Paulo (205.091) e Rio de Janeiro (82.552) (BRASIL, 2016).

De acordo com dados do Boletim Epidemiológico de 2017, foram registrados 185.583 casos prováveis de CHIK. Já em 2018, foram registrados 87.687 casos prováveis da CHIK no país, com uma incidência de 42.1 casos/100 mil hab. Destes, 68.962 (78.6 %) foram confirmados. A região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis da CHIK (52.966 casos; 60.4%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as regiões Centro-este, (13.862 casos; 15.8 %), Nordeste (11.287 casos; 12.9 %), Norte (9.315 casos; 10.6 %) e Sul

(257 casos; 0.3 %) (BRASIL, 2019).

Segundo os dados do Boletim Epidemiológico de 2019, 132.205 casos prováveis foram notificados, com uma incidência de 62.9 casos/100 mil habitantes, como mostrado na Figura 3 e na tabela 1. A região sudeste e nordeste notificaram o maior número de casos prováveis no país. O Rio de Janeiro foi o estado com maior número de pacientes infectados com CHIK, com uma incidência de 499.6 casos/100 mil hab. Há 66 óbitos confirmados, dos quais, no mesmo período em 2018, 10 óbitos haviam sido confirmados para a região sudeste, sendo quatro no Rio de Janeiro. Na tabela 2 verifica-se que no município do Rio de Janeiro houve um número de 38.044 casos prováveis da CHIK e uma incidência de 568.8 casos/100 mil habitantes em 2019; já no município de Duque de Caxias, nesse mesmo período, foram registrados 1.959 casos prováveis, com uma incidência de 214.2 casos/100 mil habitantes (SES, 2019).

Figura 3. Incidência de casos prováveis de CHIK no Brasil.



Legenda: Taxa de incidência de casos prováveis de chikungunya, por semana epidemiológica 01 a 52, Brasil, 2019.

Fonte: SVS, 2019.

Tabela 1. Número de casos prováveis e incidência de chikungunya (/100mil hab.), até a Semana Epidemiológica 52 e Semana Epidemiológica 22, por região e Unidade da Federação, Brasil, 2019 e 2020.

Região/Unidade Federação	Semanas Epidemiológicas 1 a 52 (2019) e 1 a 22 (2020)				
	Casos		Incidência		pop.est.IBGE
	(n)	(n)	(casos/100 mil hab.)	(casos/100 mil hab.)	
	2019	2020	2019	2020	
NORTE	4.347	907	23.6	4.9	18.182.253
Rondônia	111	129	6.2	7.3	1.757.589
Acre	71	15	8.1	1.7	869.265
Amazonas	105	13	2.5	0.3	4.080.611
Roraima	51	11	8.4	1.8	576.568
Pará	3.655	639	42.4	7.4	8.513.497
Amapá	37	8	4.4	0.9	829.944
Tocantins	317	92	20.2	5.8	1.555.229
NORDESTE	33.901	18.586	59.4	32.6	56.760.780
Maranhão	752	138	10.6	2.0	7.035.055
Piauí	898	69	27.4	2.1	3.264.531
Ceará	1.410	648	15.4	7.1	9.075.649
Rio Grande do Norte	13.713	1.863	391.0	53.1	3.479.010
Paraíba	1.449	310	36.1	7.7	3.996.496
Pernambuco	3.035	800	31.8	8.4	9.496.294
Alagoas	1.920	58	57.5	1.7	3.322.820
Sergipe	300	89	13.1	3.9	2.278.308
Bahia	10.424	14.611	70.1	98.2	14.812.617
SUDESTE	92.414	16.715	104.6	18.9	87.711.946
Minas Gerais	2.834	1.608	13.4	7.6	21.040.662
Espírito Santo	1.786	11.392	44.4	283.5	3.972.388
Rio de Janeiro	86.264	3.213	499.6	18.6	17.159.960
São Paulo	1.530	502	3.3	1.1	45.538.936
SUL	479	541	1.6	1.8	29.754.036
Paraná	242	412	2.1	3.6	11.348.937
Santa Catarina	140	77	2.0	1.1	7.075.494
Rio Grande do Sul	97	52	0,9	0,5	11.329.605
CENTRO-OESTE	1.064	638	6.5	3.9	16.085.85
Mato Grosso do Sul	177	187	6.4	6.7	2.748.023
Mato Grosso	539	272	15.5	7.8	3.441.998
Goiás	129	59	1.8	0.8	6.921.161
Distrito Federal	219	120	7.3	4.0	2.974.703
BRASIL	132.205	37.387	62.9	17.8	208.494.900

Fonte: SVS, 2019, 2020.

Tabela 2. Municípios do Estado do Rio de Janeiro com as maiores incidências de casos prováveis de CHIKV, por estrato populacional, Semana Epidemiológica 1 a 49, Brasil, 2019.

Município/UF	Casos prováveis 2019	2019 Incidência (/100 mil hab.)	2018 Incidência (/100 mil hab.)
Duque de Caxias	1.959	214.2	36.4
Nova Iguaçu	2.798	341.7	11.0
Queimados	1.388	929.9	65.7
São Gonçalo/RJ	1.732	160.7	584.7
Rio de Janeiro/RJ	38.044	568.8	145.1
Campos dos Goytacazes/RJ	7.720	1533.5	1458.2
Itaperuna/RJ	6.379	6215.8	254.3
Bom Jesus de Itabapoana	1.881	5085.8	73.0
Magé	1.022	419.4	15.6
Belford Roxo	1.040	204.5	35.0
Cabo Frio	1.111	499.3	37.7

Fonte: SES/RJ, 2019.

2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Em regiões endêmicas das arboviroses DEN e CHIK, há uma grande dificuldade de diagnóstico do paciente, uma vez que os sintomas iniciais das duas doenças são muito semelhantes (DEEBA et al., 2016). Apesar das semelhanças entre os sintomas que atingem as articulações periféricas, na CHIK os sintomas podem persistir de meses a anos, sendo esse um importante diferencial em comparação à DEN (SILVA & DERMODY, 2017).

Logo após o período de incubação, que gira em torno de 4 a 7 dias, inicia-se a fase aguda da CHIK, que dura cerca de 5 a 14 dias (ZAID et al., 2018). Pode ser assintomática em 3 a 5% dos casos (AZEVEDO et al., 2015), podendo chegar a 28%, o que pode facilitar que a infecção se propague com maior facilidade (GOMÉZ & ISAZA, 2016), sendo raramente fatal (MORCERFI et al., 2015). Em casos mais graves, a falência múltipla de órgãos, a encefalite e encefalopatia, miocardite, hepatite e infecção grave podem se manifestar com a viremia (BURT et al., 2017). Convulsões, estado mental alterado, paralisia flácida e até morte, ocorrem com pouca frequência em razão da neuroinvasão do vírus (BURT et al., 2017).

A fase aguda da doença tem início súbito, com sintomas de febre alta, exantema e artralgia, atingindo as pequenas e grandes articulações. A erupção maculopapular eritematosa pode se estender por até 90% da pele, podendo variar de leve a grave. Sinovite e edema periarticular são observados em indivíduos infectados com o CHIKV (BURT et al., 2017). As artralgias acometem pequenas articulações como mãos e pés, e atingem também as grandes articulações, como membros inferiores e superiores, podendo gerar tenossinovite e sintomas reumatoides como poliartralgia e poliartrite. Essa aliança entre os sintomas durante a fase

aguda, que englobam dor, inflamação e sensibilidade, somados a rigidez articular, contribuem para uma incapacidade desses pacientes para lidar com a doença (RAAD et al., 2016).

A fase aguda, com duração de até 14 dias, pode progredir para fase subaguda, caracterizada pelo agravamento das artralguas, com duração de 15 dias a 3 meses, e a remissão da febre (BRASIL, 2018).

A fase crônica, após três meses de sintomas persistente, é descrita por apirexia, poliartralgia/artrite e em menor incidência mialgia, prurido, fadiga, linfadenopatia e anorexia. A dor articular se encontra mais frequente, simétrica e aditiva e acomete as articulações grandes e menores nos braços (como punhos, falanges, ombros e cotovelos) e pernas (joelhos, pés e quadris), causando rigidez e inchaço que indicam sinovite, observados em tornozelos, falanges, punhos e, em alguns casos, em grandes músculos. Existe uma grande possibilidade de pacientes acometidos pela CHIK apresentarem recidivas inflamatórias e exacerbação precoce com reumatismo de duração prolongada (ZAID et al., 2018).

Em alguns casos, o acometimento articular é persistente ou recidivante e afeta as mesmas articulações atingidas na fase aguda. As articulações ficam dolorosas, podendo ou não apresentar edema, tem limitação de movimento e deformidade. O acometimento é poliarticular e simétrico. Em alguns pacientes, esses problemas podem evoluir para artropatia destrutiva, semelhante a artrite reumatoide (SHARMA & JAIN, 2018).

A apresentação clínica da CHIK em crianças, idosos e em pacientes com comorbidades pode levar a casos mais graves e ocasionalmente a óbitos (BROECKEL et al., 2015). Manifestações consideradas atípicas têm sido relatadas com maior frequência e incluem alterações cardíacas, renais, oculares e neurológicas (AZEVEDO et al., 2015). A infecção durante o parto não está relacionada à teratogenicidade e há raros relatos de abortamento. Nos últimos anos a incidência de formas graves vem aumentando, envolvendo casos de comprometimento neurológico, hepatite fulminante e encefalite (BURT et al., 2017). Contudo, encefalite está relatada com maior frequência em recém-nascidos de mães com infecção recente com a CHIK, no período intraparto (BRASIL, 2015).

A infecção, devido a seus impactos clínicos de complicações crônicas de médio a longo prazo, interfere na produtividade da pessoa infectada e conseqüentemente gera reflexos na economia (HUA & COMBE, 2017). A redução da produtividade e da qualidade de vida do indivíduo são conseqüência da CHIK em razão da elevada taxa de morbidade associada à artralgia persistente. Em relação ao restante do continente americano, o Brasil apresenta um número bastante elevado de infecções por CHIKV (BRASIL, 2017).

Pesquisas que visam o estudo da coexistência de infecção pelo CHIKV e doenças

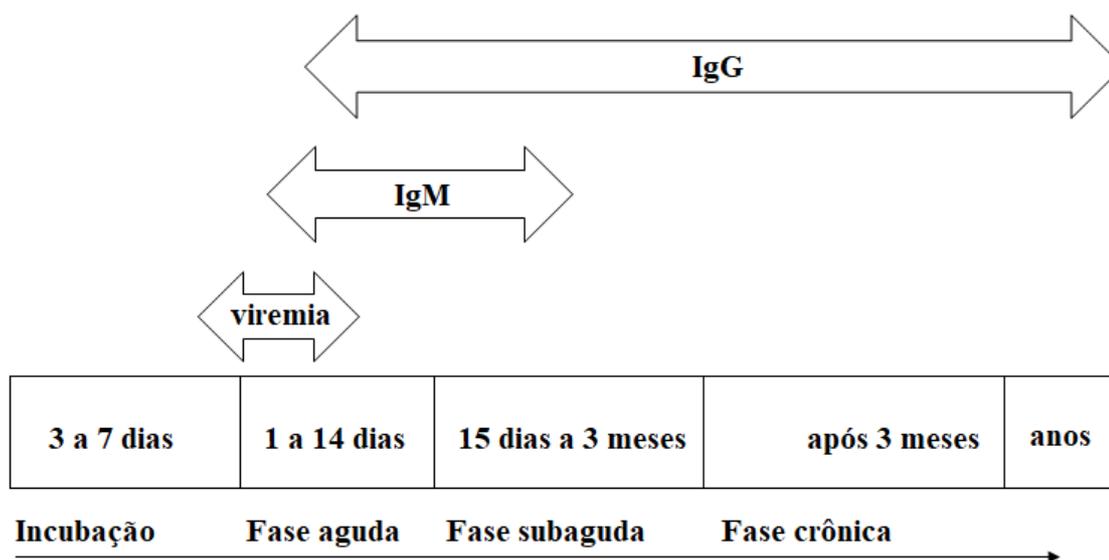
reumáticas oferecem novos horizontes para o conhecimento e compreensão da patogênese de ambas as condições, e possivelmente respostas aos mecanismos de certas doenças autoimunes, bem como novas expectativas sobre a atividade imunológica de pacientes que se recuperam completamente da infecção por CHIK e aqueles que progridem para cronicidade (RAAD et al., 2016).

2.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DIFERENCIAL

Os achados laboratoriais mais comuns na pessoa infectada com CHIK são leucopenia e trombocitopenia, com a elevação por vezes das enzimas hepáticas, velocidade de hemossedimentação e da proteína C reativa (GOMÉZ & ISAZA, 2016).

Há diferentes metodologias para o diagnóstico da infecção pelo CHIKV. No início do período febril ocorre uma maior concentração de carga viral correlacionada à infecção aguda, que dura, aproximadamente cinco dias (Figura 4). Neste período, o diagnóstico pode ser realizado pela reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-qPCR), por métodos de amplificação isotérmica ou, ainda, por meio de isolamento do vírus, RNA viral ou antígeno viral. As três metodologias envolvem as etapas de extração, amplificação e detecção do produto amplificado e apresentam melhores valores de sensibilidade quando comparado ao isolamento viral (MARDEKIAN & ROBERTS, 2015).

Para a detecção de imunoglobulinas IgM e IgG anti-CHIKV, métodos sorológicos como Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), neutralização e inibição de hemaglutinação são empregados. Os anticorpos IgM aparecem entre dois e cinco dias, e podendo persistir por várias semanas e até três meses (MOHAN et al., 2010). Já os anticorpos da classe IgG, mostram-se presentes a partir de duas semanas após o início dos sintomas (Figura 4). Na sorologia, pode existir uma reação cruzada do CHIKV com outros *Alphavirus* com complexos antigênicos semelhantes, como o vírus Ross River, o'nyong-nyong e o vírus Mayaro (SHARMA & JAIN, 2018).

Figura 4. Evolução clínica do CHIKV.

Legenda: Período de incubação, fase aguda, subaguda e crônica da CHIK.

Fonte: Modificado de HUA & COMBE (2017).

Em contraste com os ensaios sorológicos convencionais, Faye et al. (2013), observaram que o RT-qPCR em tempo real apresenta muitos ganhos, dentre os quais incluem facilidade de padronização, rapidez, avaliação quantitativa, especificidade, baixa taxa de contaminação e, em locais onde estes arbovírus co-circulam, permitem a otimização do diagnóstico diferencial das infecções arbovirais. No entanto, os autores advertem que os testes de biologia molecular se limitam ao diagnóstico na curta fase de viremia dessas arboviroses, e são ainda métodos de alto custo e não se encontram amplamente disponíveis na rede pública (MATOS et al., 2020).

Segundo Tanabe et al. (2018), qualquer que seja o tipo de método utilizado para a detecção da presença do CHIKV, este estará submetido ao tempo em que foi coletada a amostra, assim como à existência de partículas virais na corrente sanguínea.

Por recomendação do Ministério da Saúde, em situações epidêmicas, a sorologia para o CHIKV deve ser realizada na fase aguda somente em situações clínicas complicadas, podendo ser solicitada no quinto dia após início de sintomas. Para resultados mais apurados, indica-se a realização dos testes após sete a 10 dias para os anticorpos IgM e 10 a 14 dias para os IgG, assim seguindo as orientações do fluxograma para diagnóstico de arboviroses como mostrado na Figura 5 (BRASIL, 2015). Assim, os testes moleculares são considerados mais sensíveis e são utilizados comumente para confirmar casos suspeitos de fase aguda (CAMPOS et al., 2015; MLAKAR et al., 2016). Em paralelo, alguns pesquisadores também utilizam o isolamento viral

C6/36 ou VERO como metodologia para o diagnóstico. Porém, é um procedimento que demanda tempo, sendo mais utilizado para estudos epidemiológicos e pesquisa, e só deve ser realizado em laboratório com nível de segurança biológico 3 (SHARMA & JAIN, 2018).

2.5. BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS

Na infecção aguda, o CHIKV está relacionado a uma intensa resposta do interferon (IFN) I, em até 21 dias após o início da infecção, e encontrado também em plasma níveis superiores de múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas como: CCL2, inibidores de macrófagoimigração, CCL4, CXCL10, IL-6, IL-8, , IL-16, citocinas anti-inflamatórias (IL-1A, IL-10, e IL-13), fatores de crescimento como o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) e fator de crescimento de colônias de macrófagos (GM-CSF) e outros mediadores como IFN γ , IL-4, IL-7 e CXCL9 (ZAID et al., 2018).

Em 2011, Chow et al. realizaram um estudo com os mediadores IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α , VEGF, IFN- α , IL-1Ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-15, IL-4, Eotaxin, HGF, FGF-basic, MIG, MIP-1 α , RANTES, EGF, IL-17, IP-10, MCP-1, GM-CSF em Singapura envolvendo plasma de 30 pacientes sabidamente positivos para CHIKV, confirmados por PCR, de onde foram coletadas amostras em quatro períodos de infecção, do início dos sintomas até 2 a 3 meses após. Nele, os pacientes ainda foram divididos em CHIK grave, que possuíam febre > 38.5°C acompanhada de batimentos > 100 / minuto ou contagem de plaquetas < 100 x 10⁹ células/L. Nos resultados foram encontrados níveis de IFN- α , IL-1ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12 e IL-15, significativamente aumentados durante a fase aguda, quando comparados ao grupo controle, atingindo seu pico no 10º dia após o início da doença. Encontraram, ainda, uma relação dos níveis aumentados de IL-6 e GM-CSF em pacientes que apresentavam artralgia persistente na fase crônica.

No mesmo ano, na Índia, outro estudo elaborado por Chaaithanya et al. (2008), aferiu os níveis de mediadores inflamatórios em 30 amostras de pacientes, sabidamente positivos para CHIK, por imunodiagnóstico (IgM). Nele, os níveis das citocinas pró inflamatórias IL-1 e IL-6 aumentaram durante a fase aguda, juntamente com a IL-10, podendo ser um efeito anti-inflamatório nesses pacientes. Na fase crônica, os mediadores inflamatórios elevados foram MCP-1, IL-6, IL-8, MIP-1 α e MIP-1 β ; marcadores esses já relacionados a outros processos artríticos, como na artrite reumatoide (AR) e nas artrites causadas por outros *Alfavirus*, como a do vírus Ross River (RRV).

Lohachanakul et al. (2012) realizaram um estudo com plasma de 62 amostras na Tailândia. Dentre elas, 35 foram positivas para o CHIKV, tanto em biologia molecular, quanto em imunodiagnóstico por marcador IgM. A equipe de pesquisadores separou as amostras em grupos CHIK leve e CHIK grave, onde estes últimos permaneciam com sintomas artritogênicos por mais de 30 dias. Em sua avaliação para mediadores inflamatórios, chegaram à conclusão de

que a IL-6 e a quimiocina MCP-1 se mantinham com valores elevados em pacientes nos grupos CHIK leve e CHIK grave. Não houve alteração no grupo controle e a IL-8 se manteve maior em pacientes sem a presença do CHIKV. A IL-6, segundo os mesmos autores, pode ser responsável pela dor articular prolongada em pacientes infectados com CHIKV.

Nayak et al. (2017) relataram que em macrófagos de camundongos, há uma elevação tanto da IFN quanto da IL-6 na resposta ao processo inflamatório causado pelo CHIKV. A IL-6 tem mostrado, em outros trabalhos, ter uma relação à gravidade e persistência nos sintomas articulares do CHIKV (SEPÚLVEDA-DELGADO et al., 2017).

Foram descritas elevações na produção de interleucinas (IL -1 β e IL-6) e TNF- α em pacientes portadores de CHIKV, com patologia articular grave e associada inflamação com lesão tecidual (THANAPATI et al., 2017). Citocinas próinflamatórias são liberadas durante os períodos de maior intensidade de *estresse* ou doença crônica, dentre elas a IL-6. Esta é uma citocina multifuncional que regula o crescimento e a diferenciação de vários tecidos (RODRIGUES-MORALES et al., 2017).

Um estudo realizado por Ng et al. (2009) que envolvia pacientes com infecção confirmada por CHIKV em um surto de Singapura entre os meses de janeiro e fevereiro de 2008, demonstrou o perfil de mais de 30 biomarcadores, entre citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, utilizando o método *multiplex-microbead*. Essa análise descreveu um crescimento significativo das citocinas IL-1 β , IL-6 e diminuição na RANTES, relacionado à gravidade da doença e também um diferenciador encontrado com relação ao DENV, já que a RANTES se encontra aumentada nessa doença, sugerindo ser um forte biomarcador de diferenciação. Conseguindo demonstrar a diferença nesses biomarcadores nas formas mais leves e mais graves do CHIKV, um caminho se abriria para uma melhor identificação nos pacientes que poderão adquirir um prognóstico ruim e um melhor monitoramento do CHIKV.

No trabalho realizado por Kelvin et al. (2011), foram investigadas as expressões de 13 mediadores inflamatórios em amostras de pacientes de um surto em Emilia-Romagna na Itália no ano de 2007. Nesse trabalho, esses pacientes foram acompanhados no período da fase aguda até 6 a 12 meses após a infecção pela CHIK, encontrando dados significativos sobre o estabelecimento da doença e convalescença, recomendando que as pesquisas com essas citocinas sejam mais aprofundadas, pois esses mediadores podem ajudar a aprimorar substancialmente a recuperação desses pacientes.

Com base em dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), J.L. Magalhães et al. (2016, p.236) informa que:

80% da população mundial não tem acesso aos medicamentos essenciais. Eles vivem em países de baixa ou média renda e, portanto, são negligenciados. Neste contexto, é premente novas abordagens translacionais a fim de realizar pesquisas para área da saúde não mais tradicionais. Esta realidade se potencializa com a possibilidade de aparecimento das doenças endêmicas e daquelas que perpetuam as condições de pobreza, como por exemplo, as doenças negligenciadas (DNs), que não atraem investimentos das Big Pharma por não gerarem lucro; como exemplo dengue, zika e chikungunya.

Os estudos com esses biomarcadores devem ser usados para mensurar a gravidade da doença, examinando o comportamento desse vírus em surtos nos diferentes tipos de população. Tais estudos podem se constituir como ferramentas importantes na supervisão, conhecimento e na conduta da saúde pública, podendo gerar o desenvolvimento de imunomoduladores estimuladores que podem conduzir à acentuação da resposta normal das células imunocompetentes, capazes de levar a um decréscimo da gravidade e da progressão da doença (NG et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar os mediadores inflamatórios (possíveis biomarcadores), no soro de pacientes que apresentem a fase aguda ou subaguda da infecção por CHIK.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confrontar o diagnóstico clínico do CHIK com aquele obtido por sorologia (ELISA) e biologia molecular (RT-qPCR);
- Traçar um perfil epidemiológico, com base nas variáveis gênero e idade, dos pacientes diagnosticados com CHIK;
- Analisar os mediadores inflamatórios (possíveis biomarcadores) de fase aguda e subaguda da infecção por CHIK, confrontando com um grupo controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÉTICA DA PESQUISA

Esta pesquisa foi submetida e aprovada em adendo ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CEP-UNIGRANRIO) sob o CAAE 70324417.1.0000.5283, como consta no Anexo 3. Todos os participantes da pesquisa tomaram ciência, através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que foi disponibilizado antes do procedimento de coleta de sangue dos mesmos (Anexo 4).

4.2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Com base em revisão bibliográfica de materiais publicados na literatura acadêmica e em manuais de domínio público de órgãos governamentais, a fundamentação teórica ocorreu ao longo de todo o desenvolvimento desta pesquisa. Os termos de indexação foram pesquisados nas principais bases de dados, tais como: Bireme; MEDLINE; LILACS; e Scielo, sustentaram a pesquisa bibliográfica, foram arboviroses, biomarcadores, luminex, diagnóstico sorológico, Chikungunya.

4.3. ÁREA DE ESTUDO

Na década de 1950, o município de Duque de Caxias foi dividido em dois distritos: Duque de Caxias e Imbariê. Mais tarde, foram criados os distritos de Campos Elyseos e Xerém, ambos desmembrados do distrito de Imbariê e anexados ao município de Duque de Caxias. Atualmente é formado por quatro distritos: Duque de Caxias, Campos Elyseos, Imbariê e Xerém.

Integrante da Região Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro, Duque de Caxias é um município brasileiro do interior estado do Rio de Janeiro, situado na região da Baixada Fluminense, sendo o terceiro município mais populoso do estado, depois da capital e de São Gonçalo, com uma população estimada de 914.383 habitantes, sendo 443.974 (51.92%) mulheres e 411.074 (48.08%) homens (IBGE, 2018). O Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) é de 0,711 (IBGE, 2010).

4.4. TRIAGEM CLÍNICA

Os pacientes com suspeita clínica de arboviroses (DEN, ZIK ou CHIK) foram provenientes da Unidade de Pronto atendimento (UPA) Beira Mar, localizada na mesma área do Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo, município de Duque de Caxias (RJ). Tal unidade de saúde é responsável pelo atendimento diário de cerca de 600 pacientes, funcionando 24 horas.

Ao chegar na UPA Beira Mar, cada paciente foi encaminhado ao enfermeiro de triagem que tem a responsabilidade de realizar a avaliação inicial do paciente, iniciar o diagnóstico e encaminhar o paciente (dentro do departamento de emergência) para a área clínica adequada. Em seguida, cada paciente foi atendido pelo médico que avaliou em seu prontuário, os sinais e sintomas observados e emitia um diagnóstico clínico, na maioria das vezes sugestivo para arbovirose.

A análise desses prontuários foi realizada para este trabalho, de acordo com os critérios clínicos estabelecidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), tendo um perfil de estudo quantitativo e descritivo. Os prontuários foram fotografados e armazenados em formato JPG e em seguida salvos em pastas com identificação das iniciais dos pacientes e por numeração para serem analisados *a posteriori* por meio de um formulário estruturado (Anexo 1). Conforme as informações contidas, os prontuários foram classificados em 5 categorias, DEN, ZIK, CHIK, DEN/ZIK e DEN/CHIK (quadro 1).

Quadro 1. Critérios clínicos utilizados para a classificação dos casos suspeitos de DEN, ZIK e CHIK.

CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AVALIAÇÃO				
DEN	CHIK	ZIK	DEN/ZIK	DEN/CHIK
Discrasia	Artralgia moderada a intensa	Hiperemia conjuntival sem secreção ou prurido	Dor nos olhos	Mal-estar
Eventos sistêmicos	Artrite	Exantema pruriginoso	Edema	Artralgia moderada/intensa
			Artralgia	
			Mialgia	
			Cefaleia	Exantema
			Evento sistêmico	Mialgia

Foram utilizados os seguintes critérios de inclusão e exclusão para análise dos prontuários médicos obtidos:

- *Critérios de inclusão:* pacientes, sem distinção de gênero e idade, que tenham diagnóstico clínico-epidemiológico de DEN, CHIK ou ZIK; pacientes que apresentem endereço de Duque de Caxias, RJ; pacientes atendidos de janeiro a junho de 2018.
- *Critérios de exclusão:* pacientes com sintomatologia que não caracterize as arboviroses (DEN, CHIK e ZIK); morador de área ou período que não abranja aquela do presente estudo; pacientes cujos prontuários não tenham os dados avaliados no estudo preenchidos corretamente ou ilegíveis.

A coleta de dados dos prontuários foi realizada com base nas variáveis de caracterização amostral, tais como: idade, gênero e sintomas.

4.5. COLETA DAS AMOSTRAS SANGUÍNEAS

As amostras do grupo experimental fazem parte da soroteca do Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas (NPDI) da Unigranrio, a coleta de sangue total foi feita de acordo com as diretrizes de coleta de sangue da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2010). As amostras foram coletadas no período de janeiro a junho de 2018, em tubos de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugadas para retirada do soro. Os soros foram identificados, aliquotados e transportados em recipientes com gelo seco para serem transportados para a soroteca do laboratório de pesquisa da UNIGRANRIO (LabGen). Uma vez lá, foram armazenados em tubos plásticos tipo *Eppendorf* e congelados em *freezer* a -80°C , até a realização das análises laboratoriais diagnósticas (sorologia e biologia molecular).

4.6. DETECÇÃO DO CHIKV

4.6.1. Extração do RNA viral

De acordo com o protocolo do fabricante, para extração do RNA viral, foi utilizado o *kit ReliaPrep[®] Viral TNA Miniprep, Custom (Promega corporation, USA)*, para cada amostra de soro. O sistema incorpora uma etapa de tratamento com DNase diretamente na matriz da

minicoluna e remove efetivamente substâncias que podem inibir os ensaios. A purificação é realizada sem o uso de extrações com fenol clorofórmio ou precipitações com etanol, resultando em RNA puro que não requer purificação ou concentração adicional do RNA.

4.6.2. Reação da transcriptase reversa e da polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)

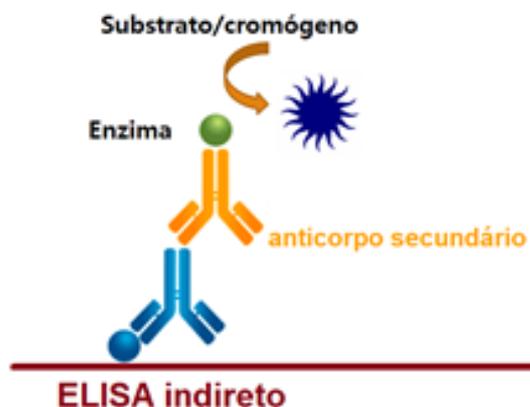
Cada amostra de RNA obtida pela extração foi submetida a uma reação de transcriptase reversa, seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) para a detecção da presença de ácido nucléico de CHIKV. Para isso, foi utilizado um kit de RT-PCR ZDC Biomanguinhos. O kit é um produto comercial, registrado pela agência reguladora brasileira ANVISA e apresenta reações multiplex discriminativas para os três vírus, além de um controle interno (patente da Fiocruz) que garante a eficiência em todas as etapas do procedimento. Foi realizado seguindo um fluxo metodológico: a adição de controles, A, B e controle interno e amostras; amplificação com os reagentes: mistura de PCR, Enzima RT, sondas e iniciadores ZC (ZIK e CHIK), sondas e iniciadores D (DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4).

Após a transcrição do RNA em cDNA, a metodologia se baseia na marcação de produtos amplificados com sondas marcadas com fluorescência, que é utilizada para determinar a presença de ZIKV, CHIKV e DENV em equipamento ABI 7500 *Real Time PCR System Fast*. Os valores limites de ciclo (*Cycle thresholds* [CT]) abaixo de 38.5 foram considerados positivos seguindo as diretrizes do CDC (LANCIOTTI et al. 2008). Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicatas, incluindo controles negativos e positivos do kit.

4.7. IMUNODIAGNÓSTICO (ELISA)

Foram submetidas ao imunodiagnóstico, para detecção de IgM anti-CHIK e IgG anti-CHIK, as amostras com diagnóstico negativo na biologia molecular (grupo experimental e grupo controle). Isto porque o teste de biologia molecular (RT-qPCR) é considerado “padrão ouro” para detecção viral em fase aguda. Apenas *kits* XGEN (Biometrix, Curitiba, Brasil) foram empregados para a detecção de anticorpos IgM e IgG para CHIK. As reações foram realizadas todas em duplicata e de acordo com as instruções do fabricante. Se baseiam em testes de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), para verificar as reações antígeno-anticorpo, detectáveis através de reações enzimáticas. Nesse *kit*, as placas são revestidas com antígeno sintético relativo à região ENV do CHIKV (figura 6).

Figura 6. Imunoabsorção enzimática (ELISA)



Legenda: Reação de Imunoabsorção enzimática ocorrida durante a realização do imunodiagnóstico.

Fonte: Bula do kit Biometrix

As placas e reagentes foram previamente deixadas à temperatura ambiente antes do início dos ensaios. Todas as amostras foram inicialmente diluídas 1:101, em tubos tipo *ependorfs*, com o diluente de amostra do *kit* (1.000 µl do diluente e 10 µl de amostra) e homogeneizados em vórtex. Para a realização do teste IgM foi necessária a pipetagem de 50 µl de reagente neutralizante em todos os poços da placa, com exceção do poço A1. O poço A1 da placa foi utilizado como branco, e em seguida, foram pipetados 100 µl de controles positivos alto (somente teste IgG) e médio em duplicatas, controle negativo em triplicata e amostras de estudo e controle, de acordo com as posições do protocolo de trabalho. Terminado, a placa foi selada e incubada em estufa a 37°C por 60 minutos. Após esse período, as placas foram lavadas cinco vezes com 350 µl de solução de lavagem preparada anteriormente e foram pipetados 100 µl do conjugado nos poços, com exceção do poço branco, e colocadas para nova incubação em estufa a 37°C por mais 60 minutos. Após esse tempo, realizou-se nova lavagem das placas, como citado anteriormente, e pipetados 100 µl do cromogênio/substrato em todos os poços. A placa, então, foi colocada em incubação em temperatura ambiente e fora de alcance da luz por 20 minutos. Após esse momento, adicionados 100 µl da solução stop em todos os poços. Logo após esses procedimentos, as placas foram levadas para leitura em leitora de microplacas em filtro 450 nm e 630 nm de referência.

O controle de qualidade prescrito na bula do *kit* foi realizado, e a leitura dos controles negativo, positivo e do branco se encontraram dentro dos limites preconizados pelo fabricante tanto para anticorpos anti-IgM, quanto o anti-IgG.

Anti IgG:

Poço em branco < 0,100 OD450 nm

Controle Negativo (CN) < 0,100 OD450 nm após *blanking*

Controle Positivo Alto (CPA) OD450 nm > 1,200

Controle Positivo Médio (CPM) OD450 nm > 0,400

Anti IgM:

Poço em branco < 0,100 OD450 nm

Controle Negativo (CN) < 0,200 OD450 nm após *blanking*

Controle Positivo (CP) OD450 nm > 0,500

Se o teste for validado no controle de qualidade do *kit*, os resultados das amostras são calculados por meio de *cut-off* determinado pela média de valor OD450 nm do controle positivo médio (CPM), utilizando a seguinte fórmula:

$$\begin{array}{ll} \text{IgG:} & \text{IgM:} \\ \frac{\text{média CPM}}{2} = \text{cut-off} & \text{CN} + 0,250 = \text{cut-off} \end{array}$$

Os resultados dos testes são interpretados como proporção da amostra OD450 nm (S) e o valor de corte (Co), ou S/Co, de acordo com as orientações do fabricante:

Para IgG: $\leq 0,9$ Negativo, $0,91 - 1,0$ Indeterminado e $\geq 1,1$ Positivo.

Para IgM: $< 0,9$ Negativo, $0,9 - 1,1$ Indeterminado e $> 1,1$ Positivo.

4.8. AMOSTRAS PARA ENSAIO LUMINEX®

4.8.1. Grupo experimental

O grupo experimental foi composto pelas amostras de fase aguda, ou seja, aquelas que tiveram diagnóstico molecular (RT-qPCR) positivo com $CT < 22,01$ e que se apresentaram reagentes apenas para IgM. Além destas, foram consideradas aquelas de fase subaguda, que se apresentaram negativos na RT-qPCR e reagentes apenas para IgG no imunodiagnóstico ou com resultado de IgG 4 vezes maior que o resultado de IgM. As amostras de fase subaguda tiveram seus diagnósticos com 15 a 90 dias após o início dos sintomas.

4.8.2. Grupo controle

Em setembro de 2018 foram coletadas 40 amostras sanguíneas de indivíduos que informaram, por meio de um questionário (Anexo 2), não possuir doenças reumáticas ou autoimunes e não manifestavam sintomatologia de infecção aguda ou crônica de CHIK. Todo o procedimento de obtenção das amostras sanguíneas seguiu os mesmos critérios utilizados para o grupo experimental, sendo as amostras coletadas de funcionários da UPA Beira Mar.

Tais amostras foram submetidas ao método de velocidade de hemossedimentação por *Westergren* (VHS), a prova do látex e teste de Proteína C Reativa em látex (PCR) do fabricante Biolab.

Após a análise dos resultados dos exames de VHS, PCR e látex nas amostras do grupo controle, verificou-se que 18 amostras (7.2%) não apresentaram alteração no exame de velocidade de hemossedimentação, 32 amostras (12.8%) apresentaram resultado negativo para o fator reumatoide e 22 amostras (8.8%) tiveram resultado negativo para PCR. Dessa avaliação, foi possível selecionar 13 amostras que também se apresentaram negativas na biologia molecular (RT-qPCR) e imunodiagnóstico (IgM e IgG) (Tabela 2).

Tabela 3. Dados das amostras classificadas como grupo controle, selecionadas para a dosagem de biomarcadores inflamatórios por ensaios Luminex®.

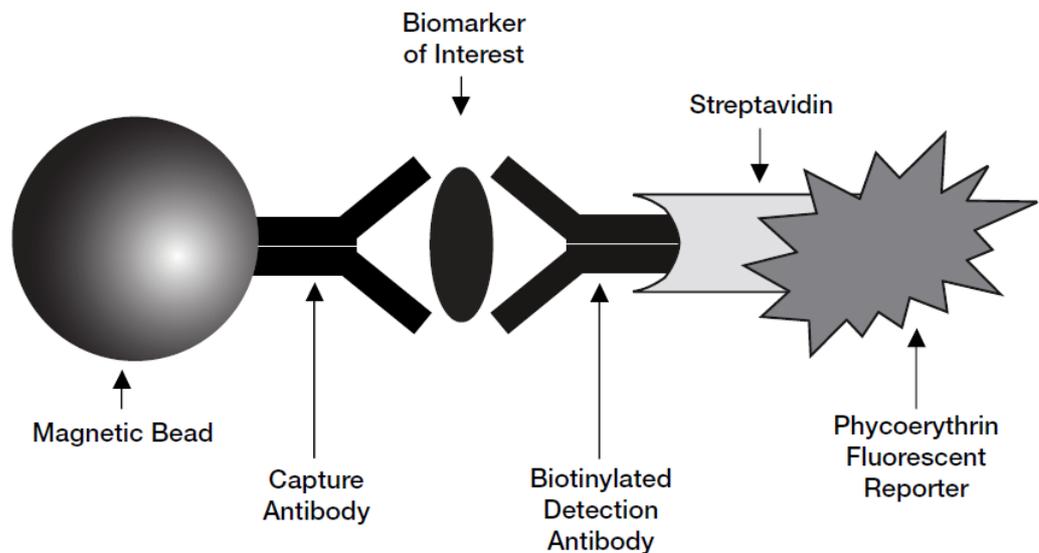
Dosagem de marcadores inflamatórios						
ID da amostra	Idade	Gênero	VHS	Látex	RT-qPCR	Imunodiagnóstico IgM/IgG
C01	28	M	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C03	19	F	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C05	25	F	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C06	45	F	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C11	20	F	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C15	57	M	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C18	26	M	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C21	35	F	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C24	30	M	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C27	23	M	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C29	30	F	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C33	41	F	Normal	Negativo	Negativo	Negativo
C40	38	M	Normal	Negativo	Negativo	Negativo

Legenda: F – feminino; M – masculino

4.9. ENSAIO MULTIPLEX EM ESFERAS FLEXÍVEIS LUMINEX®

O imunoenensaio contém esferas magnéticas (*beads*) que são adicionadas à placa e diluídas em tampão, as quais contém anticorpos de captura específicos (figura 7). Os alvos foram delineados através do *kit Bio-Plex Pró Human Cytokine 27-Plex Immunoassay* (Bio-Rad®, EUA). A pesquisa foi feita com as seguintes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento: FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α e VEGF.

Figura 7. Ensaio multiplex em esferas flexíveis Luminex®



Legenda: Reação ocorrida no ensaio multiplex em esferas flexíveis Luminex®

Fonte: Bula do kit *Bio-Plex Pró Human Cytokine 27-Plex Immunoassay* (Bio-Rad®, EUA)

A técnica foi realizada iniciando-se com a lavagem da placa na *Bio-Plex Pro™ Wash Station*, em seguida, as amostras (em duplicata) foram adicionadas, criando uma interligação entre esfera-anticorpo de captura-amostra. A incubação, seguindo o protocolo, foi feita por 12 horas (*overnight*). Após este período, foram realizadas duas lavagens na estação de lavagem, com posterior aplicação de um anticorpo secundário (biotilado). Após a agitação da microplaca por uma hora, houve a adição de solução de lavagem e incubação por 10 minutos. Seguiu-se para uma nova lavagem na *Bio-Plex Pro™ Wash Station*. A finalização foi feita com adição de estreptavidina ficoeritrina, que se liga à biotina e age como um indicador fluorescente.

Após uma nova lavagem da microplaca, é realizada a adição da solução do *kit* para ressuspender as esferas magnéticas presentes no ensaio. A leitura da microplaca é realizada no sistema *Bio-Plex*[®] *MAGPIX*[™] (Bio-Rad[®], EUA).

Os valores referenciais utilizados pertencem ao protocolo *Bio-Rad*[®] *Laboratories* de níveis fisiológicos normais de citocinas humanas.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Pelas informações obtidas por meio dos prontuários, foram elaboradas planilhas de frequência e planilhas cruzadas, utilizando o programa computacional *Microsoft*[®] *Excel*. Para análise estatística descritiva qualitativa foi utilizado o programa *Minitab v.15*[®]. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata e os dados obtidos através da leitura da placa pelo sistema *Bio-Plex*[®] *MAGPIX*[™] foram submetidos a análise estatística utilizando-se o software *GraphPad Prism*. Os dados foram expostos a comparações entre grupos através do teste *T de student*. Foram considerados os valores de $p < 0,05$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$.

4.11. VÍNCULO DA PESQUISA

Esta pesquisa está vinculada ao Grupo de Pesquisa (CNPq) intitulado “Biologia e Patologia de Organismos de Importância Médica e Ambiental” e foi desenvolvida nos Laboratórios de Pesquisa da UNIGRANRIO, com a colaboração do Laboratório de Virologia Molecular (UFRJ) e Laboratório de Bioengenharia Tecidual (INMETRO). Teve apoio financeiro do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (PROSUP-CAPES).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE CLÍNICA

No período de janeiro a junho de 2018 foram coletadas 175 amostras sanguíneas de pacientes atendidos na UPA Beira Mar (Hospital Municipal Dr. Moacyr Rodrigues do Carmo) com diagnóstico clínico de arboviroses (DEN, CHIK e ZIK). Destas amostras, 45 (25.71%) foram classificadas como DEN, 30 (17.10%) como ZIK e 94 (53.71%) tiveram diagnóstico clínico de CHIK, o que sugeriu um quadro epidêmico da CHIK no período estudado. Aqueles pacientes classificados como DENV/ZIKV (4/2.28%) e DENV/CHIKV (2/1.14%) apresentaram sintomatologia inespecífica para direcioná-los a uma das arboviroses.

Na última estimativa demográfica para a região estudada (IBGE, 2018), foi observado um quantitativo total da população do município de Duque de Caxias-RJ de 914.383 habitantes, sendo 444.445 (49.6%) do gênero masculino e 469.938 (51.4%) do gênero feminino.

O cálculo da idade mediana dos pacientes do presente estudo foi de 41 anos (intervalo entre 01 e 73 anos). A maioria dos casos foi do gênero feminino (88/169; 52.07%) e entre estes, chama-se atenção para o quantitativo de casos suspeitos do gênero feminino de ZIK na faixa etária de 20 a 59 anos (11/22; 50%). Na análise individual das arboviroses, observou-se diferença significativa ($p=0.0263$), entre ambos os gêneros, apenas para os casos prováveis de ZIK (Tabela 3).

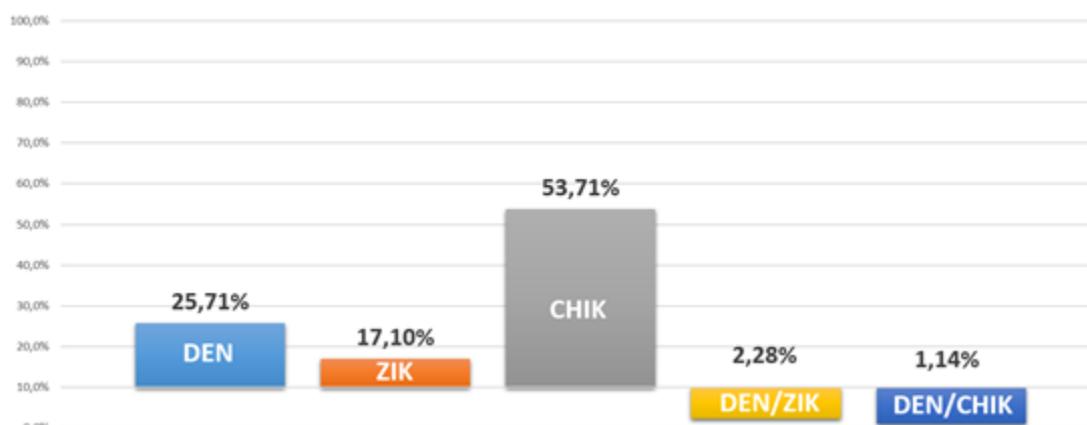
Levando em consideração a população estimada da região estudada, estratificada nas faixas etárias de <20 e ≥ 60 anos (392.201) e 20 a 59 anos (522.182), observou-se diferença significativa ($p = 0.002$) para ZIK e CHIK (Tabela 3). Tal diferença foi impulsionada pela quantitativo de casos prováveis do gênero feminino para ZIK e masculino para CHIK.

Quanto aos aspectos clínicos apresentados pelos pacientes, entre os 45 casos suspeitos de DEN, a mialgia (29/45; 64.4%), artralgia leve (30/45; 66.7%) e cefaleia (35/45; 77.8%) foram os mais observados, além de 4/45 (8.8%) pacientes que apresentaram sintomas de discrasia. O exantema (30/30; 100%) e o prurido (27/30; 90%) foram observados principalmente nos pacientes suspeitos de ZIK, que apresentaram ainda hiperemia conjuntival em 12/30 (40%). Os pacientes suspeitos de CHIK apresentaram a artralgia moderada/intensa (91/94; 96.8%) e a artrite (77/94; 81.9%) como sintomas mais frequentes (Tabela 3 e figura 8).

Tabela 4. Características clínicas dos casos prováveis de arboviroses de pacientes atendidos na UPA Beira Mar, Duque de Caxias (RJ), no período de janeiro a junho/2018.

	Janeiro a junho/2018		
	DEN	ZIK	CHIK
Gênero	n = 45 (%)	n = 30 (%)	n = 94 (%)
Masculino	24 (53.3)	8 (26.6)	49 (52.1)
Feminino	21 (46.7)	22 (73.4)	45 (47.9)
<i>p</i> -values ($\alpha=0.05$)*	0.6274	0.0263	0.5620
Faixa etária			
<20 e ≥60	14 (28.6)	4 (33.3)	25 (33.3)
20 a 59	31 (71.4)	26 (66.7)	69 (66.7)
<i>p</i> -values ($\alpha=0.05$)*	0.1481	0.002	0.002
Sintomas			
Febre <38.5 C	20 (44.4)	14 (46.7)	36 (38.3)
Febre >38.5C	25 (55.6)	16 (53.3)	58 (61.7)
Exantema	2 (4.4)	30 (100)	23 (24.5)
Prurido	1 (2.2)	27 (90)	2 (2.1)
Mialgia	29 (64.4)	20 (66.7)	72 (76.6)
Artralgia leve	30 (66.7)	15 (50)	3 (3.2)
Artralgia mod/int.	1 (2.2)	13 (43.3)	91 (96.8)
Artrite	0 (0)	12 (40)	77 (81.9)
Conjuntivite	2 (4.4)	12 (40)	34 (36.2)
Cefaleia	35 (77.8)	22 (73.3)	74 (78.7)
Gânglio	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Discrasia	4 (8.8)	0 (0)	0 (0)
Neurológico	1 (2.2)	0 (0)	3 (3.2)

Legenda: DEN - Dengue; ZIK - Zika vírus; CHIK – Chikungunya; *Teste Qui-quadrado; mod/int. – moderada / intensa.

Figura 8. Avaliação clínica avaliada nos prontuários analisados

Legenda: Percentual de diagnóstico clínico para arboviroses avaliados nos prontuários das 175 amostras da soroteca do NPDI - UNIGRANRIO.

5.2. ENSAIOS EM LUMINEX®

As amostras de fase aguda utilizadas para análise dos biomarcadores inflamatórios em ensaios por Luminex® foram selecionadas de um total de 92 amostras com diagnóstico positivo para CHIKV pela técnica de RT-qPCR e 06 reagentes apenas para IgM anti-CHIK.

Dessas, 98 amostras caracterizadas como fase aguda de CHIK, 17 (17.3%) atenderam os critérios de inclusão para realização dos ensaios em Luminex®. A seleção destas amostras foi baseada no CT encontrado após a análise por RT-qPCR, além da idade e gênero dos pacientes. Todas apresentavam $CT < 22.01$ o que indica alta carga viral na amostra aferida (Tabela 5). Com este critério, não foi utilizado no estudo nenhuma amostra de fase aguda determinada pelo Imunodiagnóstico.

Tabela 5. Dados das amostras classificadas como fase aguda, selecionadas para a dosagem de biomarcadores inflamatórios por ensaios Luminex®.

Amostras de fase aguda (Grupo experimental)				
Amostra	Idade	Gênero	RT-qPCR	CT
46	40	F	Positivo	20.31
57	54	M	Positivo	18.97
78	24	F	Positivo	18.42
79	25	M	Positivo	17.08
89	50	F	Positivo	20.08
91	48	M	Positivo	16.74

97	38	F	Positivo	19.35
106	45	M	Positivo	17.84
110	41	F	Positivo	20.46
116	47	M	Positivo	19.62
120	30	F	Positivo	18.07
163	21	F	Positivo	21.74
164	30	M	Positivo	18.10
165	29	M	Positivo	18.83
166	18	F	Positivo	22.01
167	46	M	Positivo	16.27
180	53	M	Positivo	15.64

Legenda: F – feminino; M – masculino

As amostras de fase subaguda foram selecionadas a partir dos dados de IgG anti-CHIKV nas amostras de soro dos pacientes. Das 83 amostras negativas pela técnica de RT-qPCR, 16 (19.3%) foram positivas pelo imunodiagnóstico. Destas, 08 foram selecionadas para a realização dos ensaios em Luminex[®] por serem reagentes somente para IgG ou por apresentarem resultado pelo menos 4 vezes maior do que aquele observado para IgM (Tabela 6).

Tabela 6. Dados das amostras classificadas como fase subaguda, selecionadas para a dosagem de biomarcadores inflamatórios por ensaios Luminex[®].

Amostras de fase subaguda (Grupo experimental)						
Amostra	Idade	Gênero	IgM	IgG	Controle do kit	RT-qPCR
Branco	-	-	-	-	<0.100	
Negativo	-	-	-	-	<0.200	
Positivo alto	-	-	-	-	>1.200	
Positivo médio	-	-	-	-	>0.400	
06	65	M	2.818	12.861		Negativo
51	23	F	0.351	1.462		Negativo
56	42	M	1.705	12.290		Negativo
64	51	M	2.186	12.369		Negativo
98	43	M	0.475	2.036		Negativo
127	24	F	2.481	12.267		Negativo
131	69	F	1.852	12.963		Negativo
137	42	M	1.047	10.897		Negativo

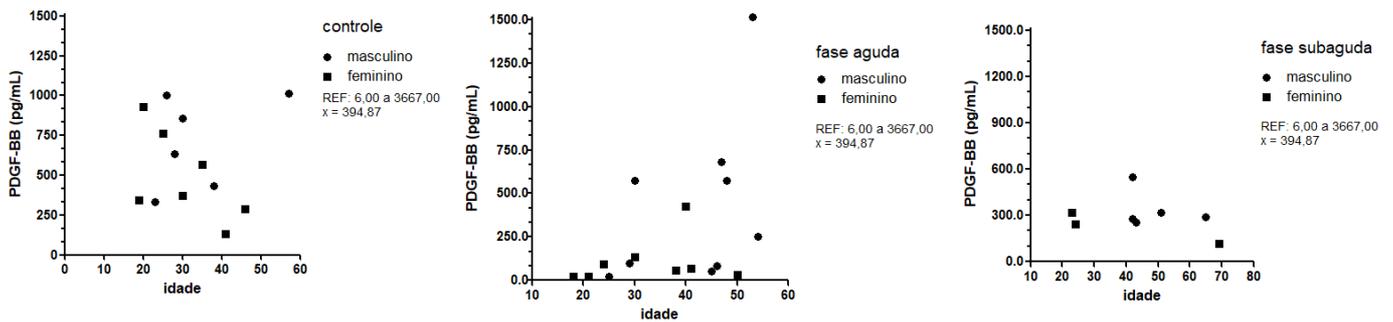
Legenda: F – feminino; M – masculino

Ao avaliar a expressão dos mediadores inflamatórios, por gênero e idade, das amostras de pacientes dos grupos experimentais (fase aguda e subaguda de CHIK) e grupo controle, frente aos valores de referência, verificou-se que os mediadores PDGF-BB, IL-13, IL-8 não sofreram alterações (Figura 9A – 9C). A expressão do mediador inflamatório GM-CSF não foi detectada nas amostras dos grupos experimentais e controle.

Figura 9. Expressão dos mediadores inflamatórios PDGF-BB, IL-13 e IL-8 por gênero e idade, das amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.

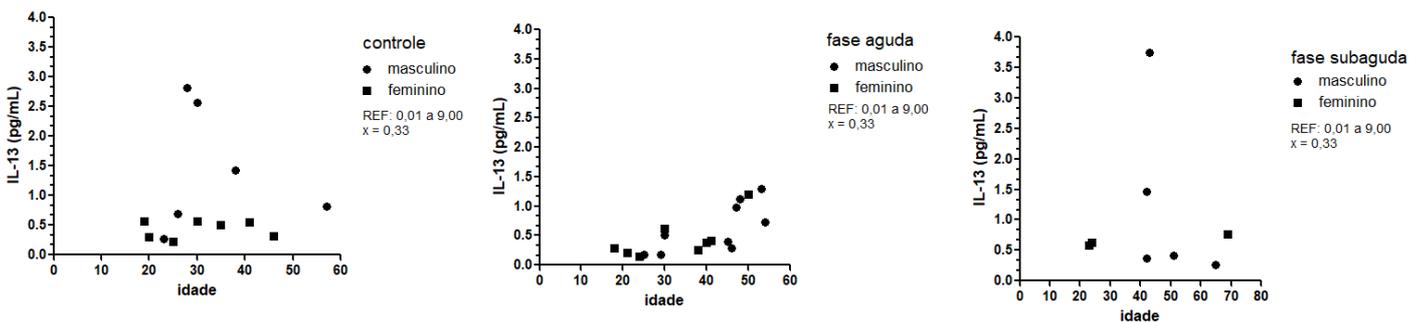
A

<i>PDGF-BB</i>	<i>Valor ref.</i>	<i>Controle</i>	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	>3667.0			
Normal	6.00 a 3667.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	8 (5m+3f)
Baixo	<6.00			



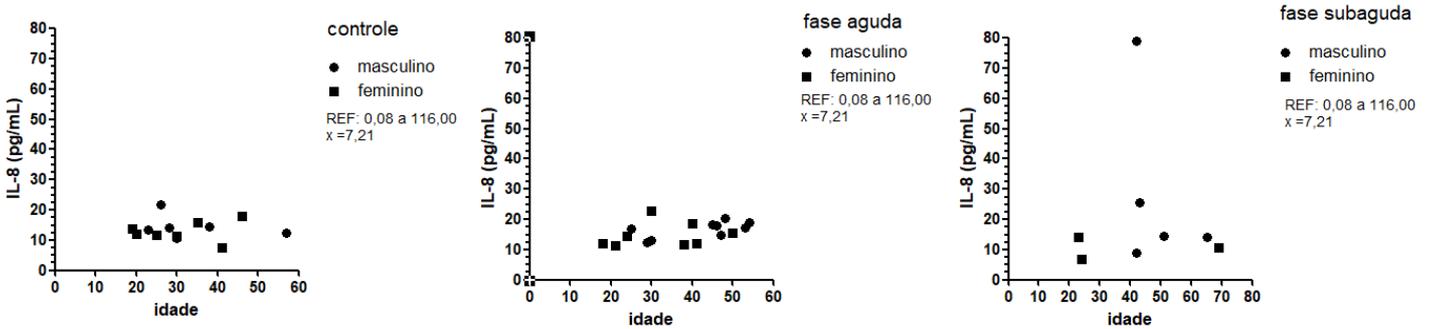
B

<i>IL-13</i>	<i>Valor ref.</i>	<i>Controle</i>	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 9.0			
Normal	0.01 a 9.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	8 (5m+3f)
Baixo	< 0.01			



C

<i>IL-8</i>	<i>Valor ref.</i>	<i>Controle</i>	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 116.0			
Normal	0.08 a 116.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	8 (5m+3f)
Baixo	< 0.08			



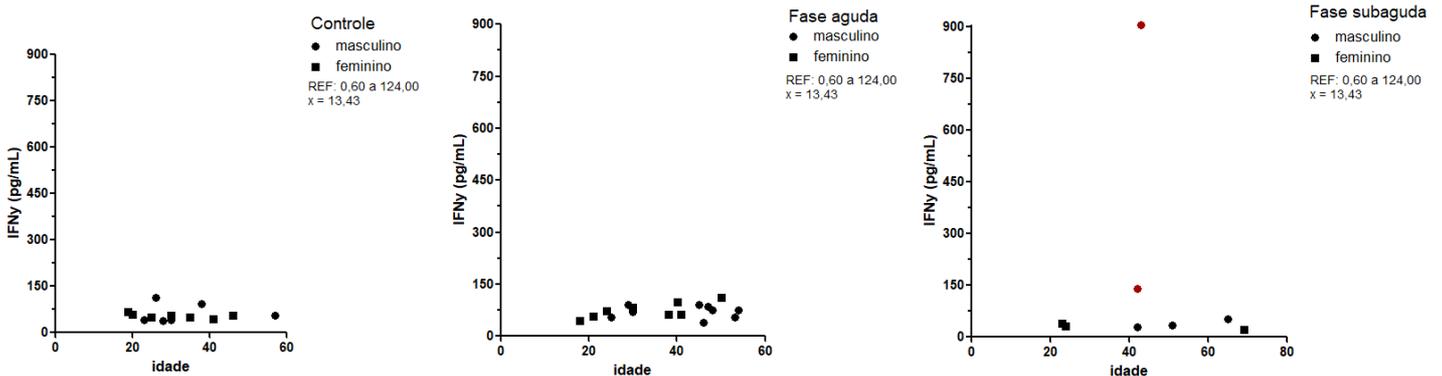
Legenda: Limites de referência: dentro da faixa = preto, acima = vermelho, abaixo = verde, m = masculino, f = feminino.

Algumas amostras de fase subaguda apresentaram uma expressão elevada dos mediadores IFN- γ , TNF- α , IL-17a, IL-5, IL-4, IL-1 β e IL-1ra. Tais amostras eram de pacientes do gênero masculino, que apresentavam idade de 42 e 43 anos (Figura 10A -10G).

Figura 10. Expressão elevada dos mediadores inflamatórios IFN- γ , TNF- α , IL-17a, IL-5, IL-4, IL-1 β e IL1ra por gênero e idade, das amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.

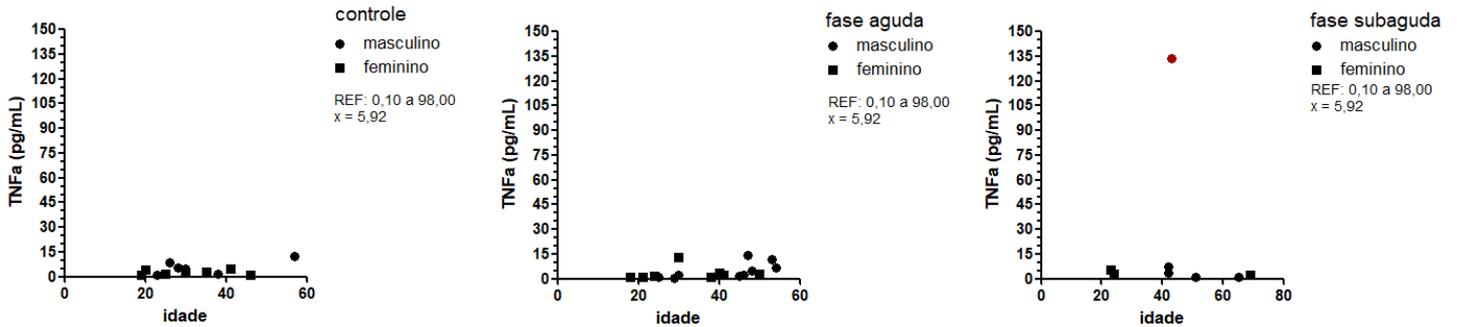
A

<i>IFN-γ</i>	<i>Valor ref.</i>	<i>Controle</i>	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 124.0	-	-	2 (2m)
Normal	0.6 a 124.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	6 (3m+3f)
Baixo	< 0.6	-	-	-



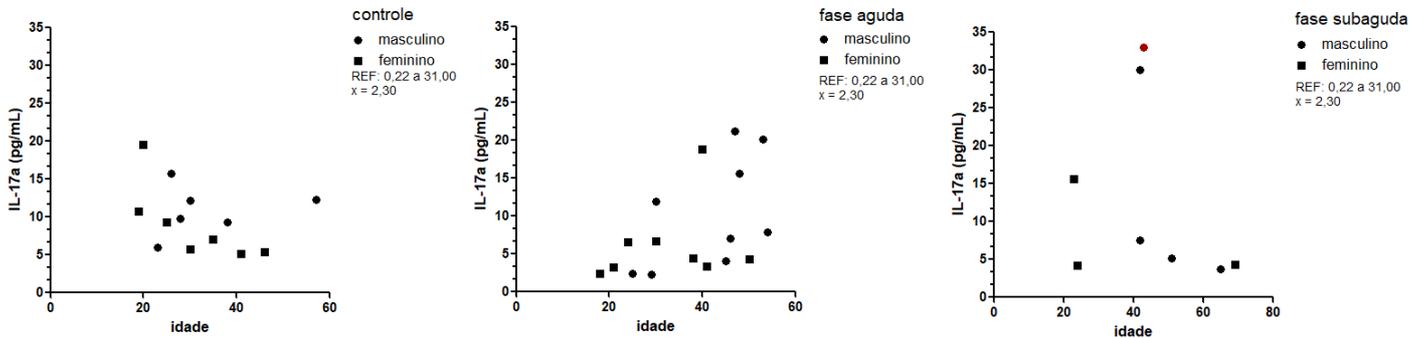
B

<i>TNF-α</i>	Valor ref.	Controle	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 98.0			1 (1m)
Normal	0.10 a 98.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	7 (4m+3f)
Baixo	< 0.10			



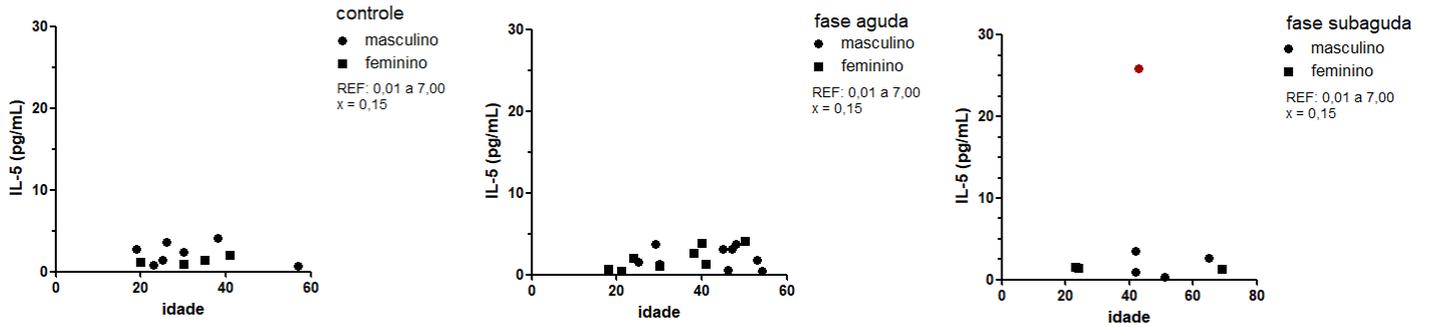
C

<i>IL-17a</i>	Valor ref.	Controle	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 31.0			1 (1m)
Normal	0.22 a 31.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	7 (4m+3f)
Baixo	< 0.22			



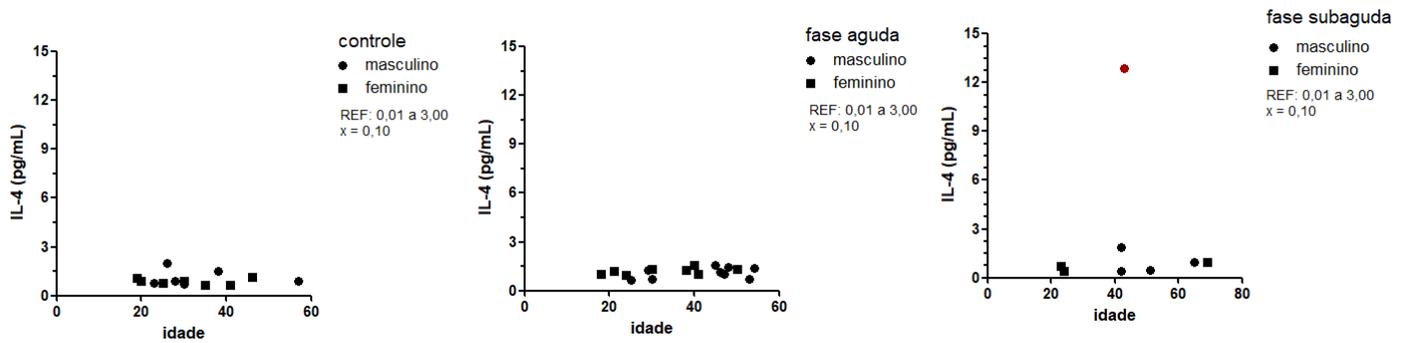
D

<i>IL-5</i>	Valor ref.	Controle	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 7.0			1 (1m)
Normal	0.01 a 7.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	7 (4m+3f)
Baixo	< 0.01			



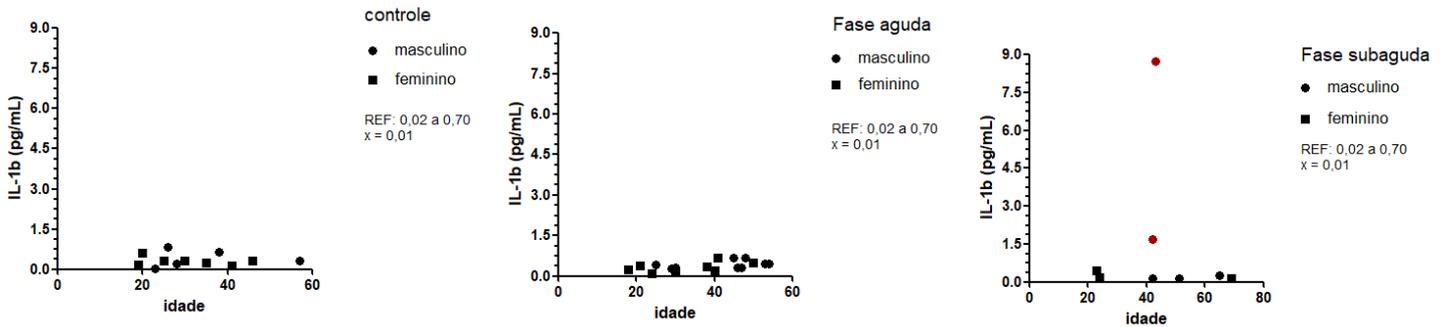
E

<i>IL-4</i>	Valor ref.	Controle	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 3.0			1 (1m)
Normal	0.01 a 3.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	7 (4m+3f)
Baixo	< 0.01			



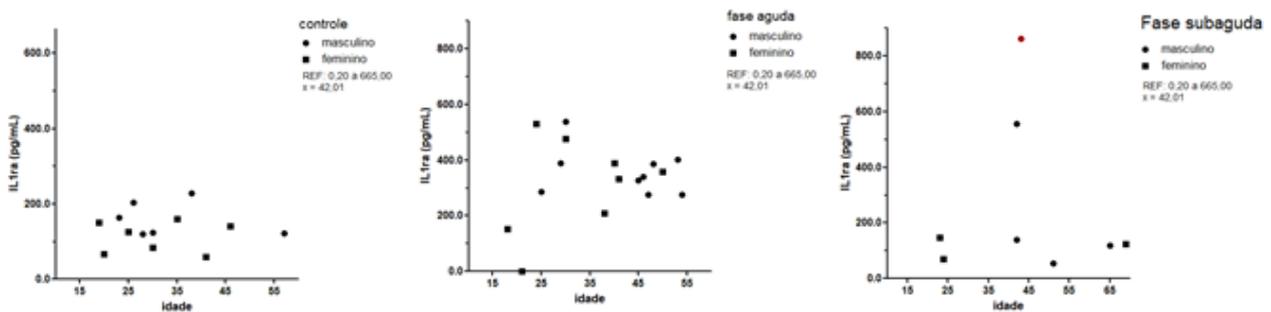
F

<i>IL-1β</i>	Valor ref.	Controle	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 0.7			2 (2m)
Normal	0.02 a 0.7	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	6 (3m+3f)
Baixo	< 0.02			



G

<i>IL-1ra</i>	Valor ref.	Controle	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 665.0			1 (1m)
Normal	0.2 a 665.0	13 (6m+7f)	17 (9m+8f)	7 (4m+3f)
Baixo	< 0.2			



Legenda: Limites de referência: dentro da faixa = preto, acima = vermelho, abaixo = verde, m = masculino, f = feminino.

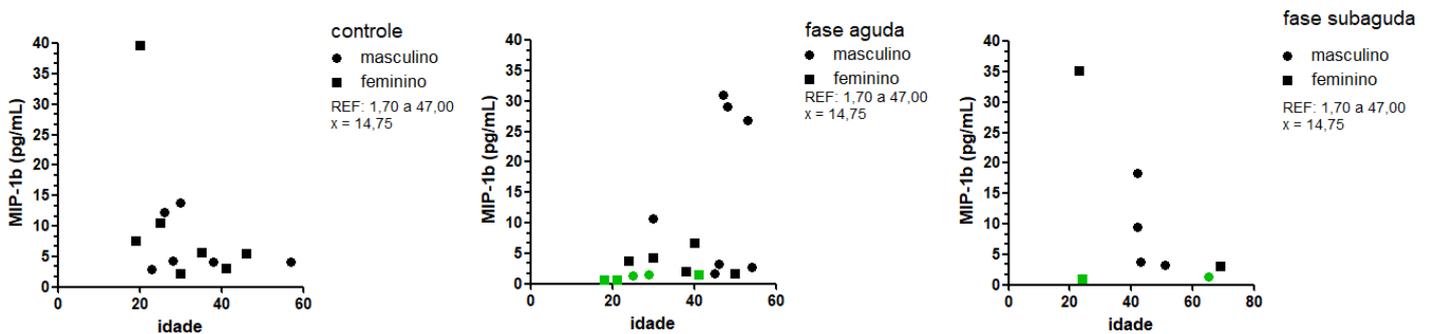
Não foram encontradas expressões abaixo do valor de referência para amostras de fase subaguda, com exceção do mediador MIP1- β , que apresentou, para algumas amostras, níveis inferiores aos valores referenciais, tanto em fase aguda, quanto em fase subaguda (Figura 11).

Nas amostras testadas de fase aguda, cinco apontaram resultados abaixo do valor de

referência para MIP-1 β , sendo três do gênero feminino, com idades de 18, 21 e 41 anos, e duas do gênero masculino, com 25 e 29 anos. Todos sofriam de artralgia intensa e cefaleia. Já em amostras de fase subaguda, apenas dois pacientes apresentaram expressões também abaixo dos limites de referência para este mediador inflamatório, sendo um do gênero masculino com 65 anos de idade, e um do gênero feminino com 24 anos de idade. Ambos apresentaram artralgia leve e cefaleia. Estas duas amostras apresentaram anticorpos anti IgM e anti IgG reagentes.

Figura 11. Expressão do mediador inflamatório MIP-1 β , por gênero e idade, para amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.

MIP-1 β	Valor ref.	Controle	F. aguda	F. subaguda
Alto	> 47.0			
Normal	1.7 a 47.0	13 (6m+7f)	12 (7m+5f)	6 (4m+2f)
Baixo	< 1.7		5 (2m+3f)	2 (1m+1f)



Legenda: Limites de referência: dentro da faixa = preto, acima = vermelho, abaixo = verde, m = masculino, f = feminino.

Algumas amostras de pacientes de fase aguda e subaguda apresentaram expressão aumentada dos mediadores inflamatórios CXCL10/IP10 e IL6 (Figura 12A – 12B).

A elevada expressão da CXCL10/IP-10 esteve presente em oito amostras de fase aguda, sendo seis do gênero masculino e duas do gênero feminino, com idades entre 25 e 54 anos. Todos relataram artralgia intensa e artrite. Na fase subaguda foram cinco amostras que apresentaram expressão elevada, sendo quatro de gênero masculino e uma do gênero feminino, com idades entre 23 e 65 anos. Artralgia leve e intensa foram observadas em todos os pacientes (Figura 12A).

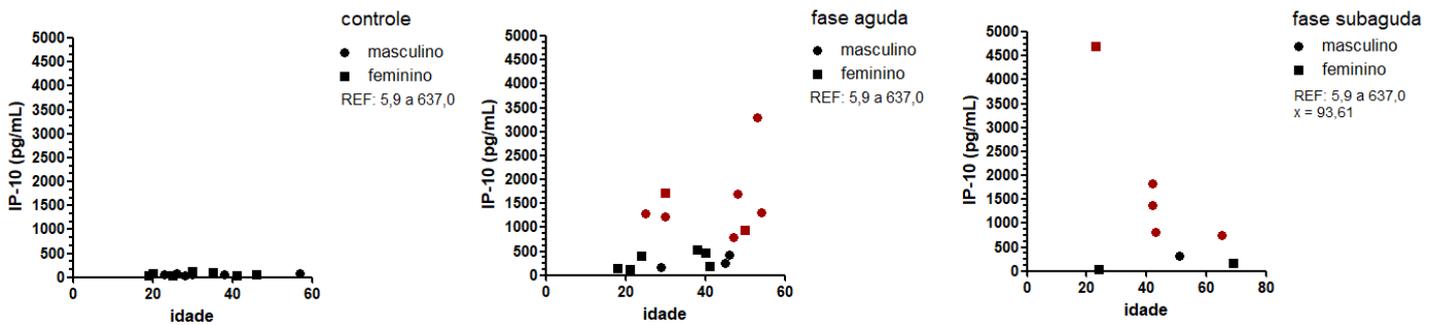
Os resultados revelam que a expressão de IL-6 foi mais elevada em sete amostras de fase aguda, sendo cinco do gênero masculino, com idades entre 30 e 54 anos, e duas do gênero

feminino, com 30 e 50 anos de idade. No que tange a avaliação dos sintomas destas amostras, todos apresentaram artralgia intensa, cefaleia e artrite. Sobre os pacientes de fase subaguda, registrou-se dois do gênero masculino, ambos apresentaram mialgia, artralgia intensa, artrite e edema de membros (Figura 12B).

Figura 12. Expressão dos mediadores inflamatórios CXCL10/IP10 e IL6, por gênero e idade, para amostras de pacientes dos grupos controle e experimentais de fase aguda e subaguda.

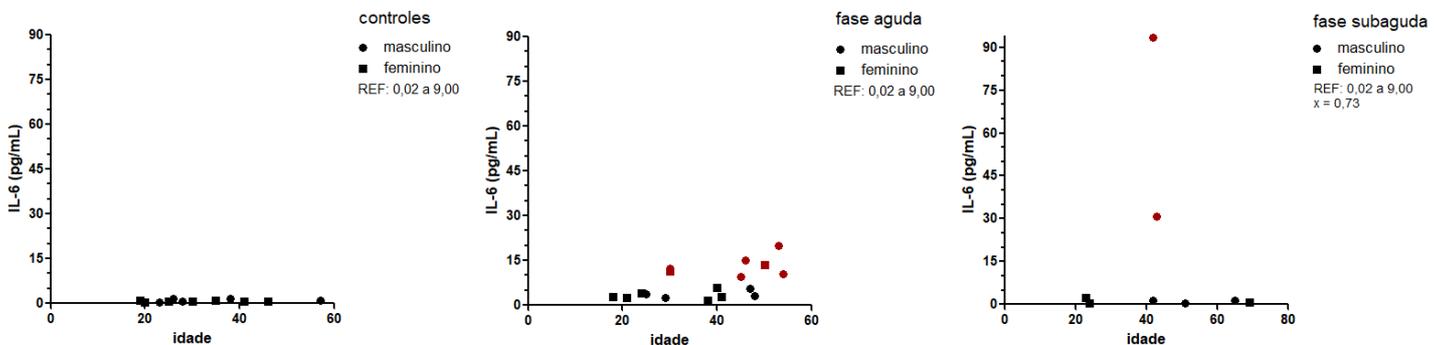
A

<i>IP-10</i>	<i>Valor ref.</i>	<i>Controle</i>	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 637.0		8 (6m+2f)	5 (4m+1f)
Normal	5.9 a 637.0	13 (6m+7f)	9 (3m+6f)	3 (1m+2f)
Baixo	< 5.9			



B

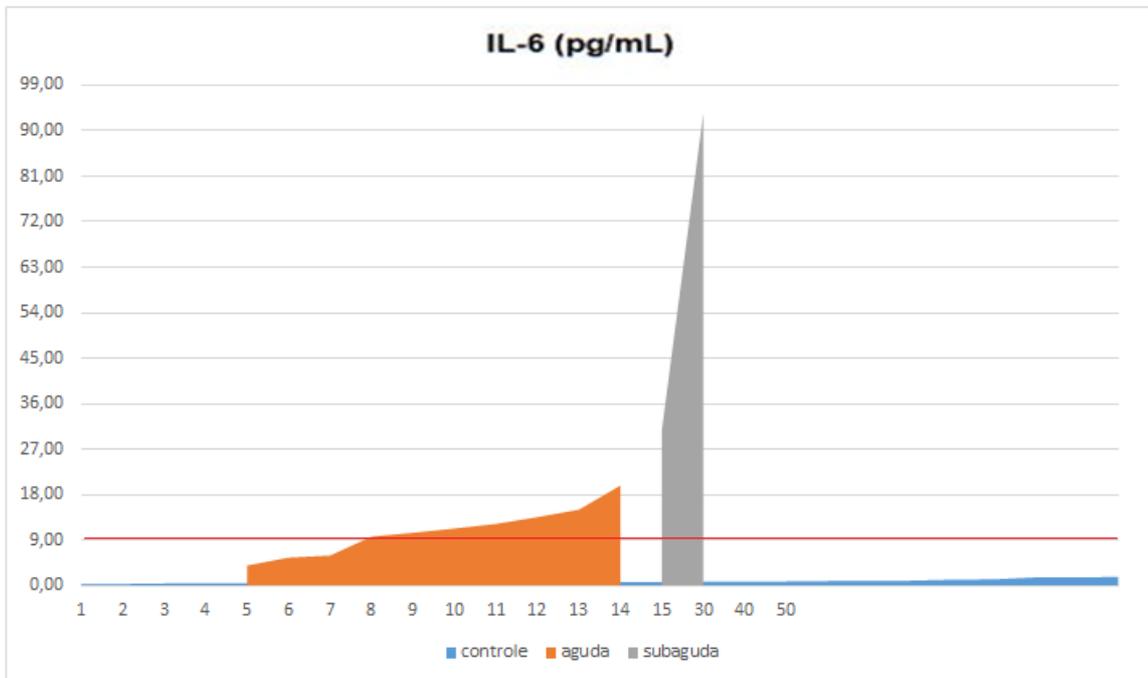
<i>IL-6</i>	<i>Valor ref.</i>	<i>Controle</i>	<i>F. aguda</i>	<i>F. subaguda</i>
Alto	> 9.0		7 (5m+2f)	2 (2m)
Normal	0.02 a 9.0	13 (6m+7f)	10 (4m+6f)	6 (3m+3f)
Baixo	< 0.02			



Legenda: Limites de referência: dentro da faixa = preto, acima = vermelho, abaixo = verde, m = masculino, f = feminino.

Verificou-se ainda um aumento na expressão do mediador IL-6, comparando-se as amostras do grupo experimental de fase aguda com as amostras de fase subaguda como visto na figura 13.

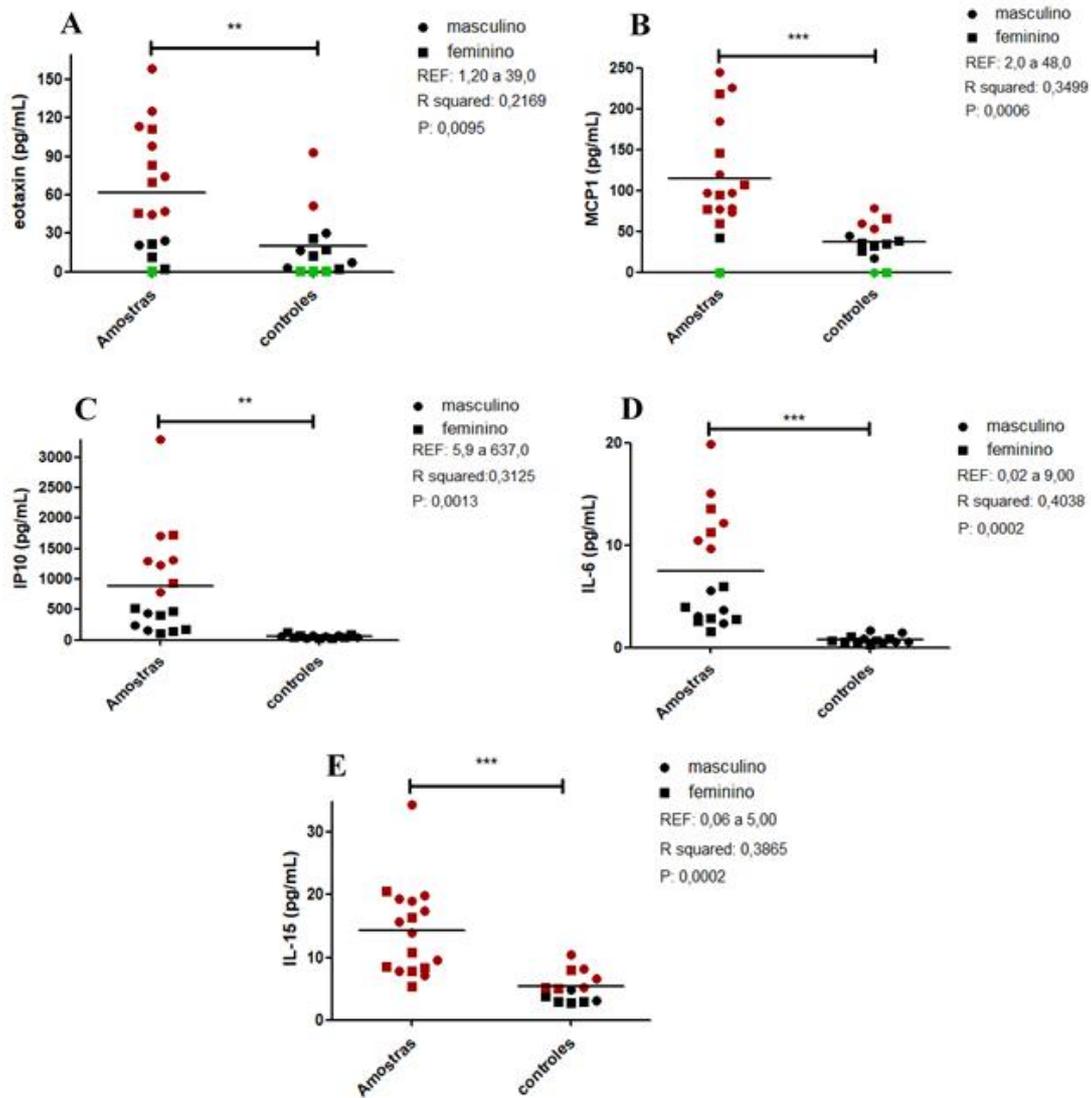
Figura 13. Níveis encontrados da IL-6 em amostras do grupo experimental de fase aguda e subaguda



Legenda: Comparação dos níveis da IL-6 nas amostras de controle, fase aguda e fase subaguda, mostrando aumento da expressão entre as fases da CHIK.

Sob análise estatística, os mediadores inflamatórios que apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais e controle foram as quimiocinas eotaxina, MCP-1, CXCL10/IP-10 e interleucinas IL-6 e IL-15, independente de gênero e idade (Figura 14A – 14E). As análises que não confirmaram esta diferença se encontram no anexo V.

Figura 14. Expressão dos mediadores inflamatórios eotaxina, MCP-1, CXCL10/IP-10, IL-6 e IL-15 em amostras de pacientes dos grupos controle e experimental de fase aguda.



Legenda: Limites de referência: dentro da faixa = preto, acima = vermelho, abaixo = verde, m = masculino, f = feminino.

6. DISCUSSÃO

O CHIKV é um *Alfavirus* transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* que, após o repasto sanguíneo, causa uma doença febril aguda, cujas principais características são febre acima de 38°C, artrite e artralgia grave debilitante, muitas vezes acompanhada de edema (WEAVER, 2014; SHARMA & JAIN, 2018).

A enfermidade causa redução na economia, transtornos na saúde pública e, principalmente, redução na qualidade de vida do paciente, quando evoluída para a forma crônica, a doença é acompanhada por sintomas de dor e inchaço que perdura por meses e até alguns anos (WEAVER, 2014; RAAD et al., 2016; TANABE et al., 2018; SHARMA & JAIN, 2018).

Embora haja muitos estudos relacionados ao CHIKV, pouco se sabe sobre quais mecanismos associados ao vírus levam à inflamação que causa tamanha debilidade nos pacientes infectados (TANABE et al., 2018; SHARMA & JAIN, 2018). O que se tem descrito na literatura é que o próprio sistema imunológico promove as respostas inflamatórias graves induzidas por mediadores inflamatórios (NAYAK et al., 2019).

No presente estudo, para avaliar os mediadores inflamatórios de pacientes acometidos pela CHIK, as amostras coletadas foram separadas em dois grupos: 17 amostras, de pacientes de fase aguda de infecção, com tempo de início de sintomas de 05 dias, confirmados pelo RT-qPCR e com um CT < 22.01 configurando uma alta carga viral; um grupo de fase subaguda, composto por 08 amostras, com tempo de início de sintomas de 14 dias confirmados por imunodiagnóstico (ELISA), IgG positivo com ou sem a presença de IgM.

As amostras analisadas pelo Luminex® 200™ (*Bio-Rad® Bio Plex®*) apresentaram a expressão dos mediadores PDGF-BB, IL-13 e IL-8 dentro dos níveis de normalidade nos grupos controle e fase aguda, corroborando com os estudos de Lohachanakul et al. (2012), e sendo observado também em amostras de fase subaguda. A IL-8, um quimioatraente para macrófagos e neutrófilos, teve sua expressão elevada, como visto em outros trabalhos de fase aguda por Reddy et al. (2014) e aguda e subaguda por Chow et al. (2011). Em outras pesquisas, foi observada uma expressão suprimida dos valores da IL-8, durante a fase aguda da doença, voltando à normalidade no período de convalescença (HORAU et al., 2010; KELVIN et al., 2011). Alguns autores acreditam que essa regulação suprimida, se deve a uma lenta taxa de diminuição da carga viral (CHAAITHANYA et al., 2011). Aguilar-Briseño et al. (2020), utilizando mRNA em amostras de monócitos, competentes e inativados por radiação ultravioleta (UV), de pacientes infectados por CHIKV, concluíram que a expressão da IL-8 se encontrava duas vezes

mais elevada em amostras de monócitos inativados do que nas amostras de monócitos competentes, que se encontravam, por sua vez, diminuídas.

O aumento nos valores de IFN- γ e TNF- α estão relacionados com a ativação de células imunes, como monócitos e macrófagos nos pacientes infectados com CHIKV (VERMA et al., 2018; SUHRBIER, 2019). Essas células também possuem atividade antiviral e estão diretamente relacionadas à imunopatologia do CHIKV (SUHRBIER, 2019). O IFN- γ é secretado exclusivamente por células T e *natural killer* (NK), tendo como função, a estimulação de macrófagos, monócitos (VENUGOPALAN et al., 2014; SUHRBIER, 2019), fibroblastos e células dendríticas (VENUGOPALAN et al., 2014). Durante a infecção, as células T CD4+ (específicas para o CHIKV) secretoras de IFN- γ , e as células Th1 estimuladas podem promover uma produção distorcida de anticorpos IgG2 pelas células B em resposta ao IFN- γ (VENUGOPALAN et al., 2014).

A partir da elevação dos níveis de IFN- γ , é possível verificar o envolvimento do sistema imunológico adaptativo, com a intenção de silenciar a forte resposta inflamatória e de impedir a instalação da doença de forma crônica (WAUQUIER et al., 2011; CAGLIOTI et al., 2013).

As duas amostras de fase subaguda tinham como sintomas artralgia moderada a intensa, corroborando com trabalho de Rulli et al. (2011), onde a dosagem de mediadores em pacientes infectados com CHIK, revelou que a expressão do IFN- γ se mostrava elevada em amostras de pacientes com sintomas persistentes de poliartralgia/poliartrite.

A TNF- α é uma citocina pró-inflamatória osteoclastogênica potente, e tem seu papel patogênico encontrado nos desfechos artríticos, sugerindo em alguns trabalhos, ser apresentada como marcador de doenças artríticas crônicas, já estudados em modelos com camundongos anteriormente (THANAPATI et al., 2017), como em outras artrites alfavirais (VERMA et al., 2018), na artrite psoriática e em também em humanos com CHIKV (VENUGOPALAN et al., 2014). Com relação a esse mediador, foi observado no presente estudo, que uma amostra de fase subaguda apresentou elevação na expressão, em comparação com o grupo controle.

Esta mesma amostra de fase subaguda também se mostrou elevada para os mediadores IL-1 α e IL-1 β . Outro estudo observou que a superprodução de IL-1 e TNF- α leva à estimulação de sinoviócitos, contribuindo ainda mais para a destruição das articulações (RAMÓN et al., 2011). Na Índia, o estudo de Tripathy et al. (2019), utilizando IL1RN alelos e genótipos, apontou que o mediador IL-1 α , em níveis elevados, pode estar associado ao risco de desenvolvimento da fase crônica de CHIK.

Já a elevação dos níveis da IL-1 β pode também mediar o desenvolvimento da artralgia abrupta e persistente, cujo mediador inflamatório está envolvido na imunopatogenia de outras

enfermidades artríticas, inclusive a artrite reumatoide (NG et al., 2009).

Nayak et al. (2019), com base em um estudo *in vitro* com células RAW264 (uma linha celular de macrófagos camundongos), sugeriram que os macrófagos infectados com CHIKV sejam uma fonte de citocinas artritogênicas, como TNF- α e IL-6. O mediador pró-inflamatório TNF- α é secretado por macrófagos ativados. Junto ao tecido, este mediador causa a inflamação artrítica (SUHRBIER, 2019).

Ainda se referindo a esta mesma amostra de fase subaguda, foi observada expressão elevada do mediador IL-17a, quando comparada ao grupo controle. Em alguns estudos, a artrite crônica por CHIKV tem sido associada aos altos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-17, que é importante na artrite reumatoide e também na artrite crônica causada pelo CHIKV, capaz de nortear uma destruição da matriz óssea (CHIRATHAWORN et al., 2020; AMARAL et al., 2020), juntamente com os mediadores IL-6, TNF- α IL-1 β (AMARAL et al., 2020). As células da membrana sinovial inflamada produzem essas citocinas e também a IL-23. Todo o conjunto auxilia o processo inflamatório, afetando diretamente os ossos. A IL-17 ainda estimula a diferenciação dos osteoclastos e também a degradação dos proteoglicanos da cartilagem (RAMÓN et al., 2011). Em outras investigações, a IL-17 tem sido relacionada à gravidade da doença, a artralgia crônica e elevação da carga viral (CHOW et al., 2011; CHANG et al., 2017), assim como a edemas (CHIRATHAWORN et al., 2020). Chow et al. (2011), em estudos com 30 amostras de pacientes admitidos no Centro de Doenças Transmissíveis do Hospital Tan Tock Seng, em Singapura, 2008, mostraram que na fase crônica da infecção, houve elevação dos níveis da IL-17.

Vale ressaltar que este paciente de fase subaguda, nesse trabalho, relatou a presença de artralgia intensa, artrite e edema de membros, possuindo sintomatologia compatível com possível cronicidade da doença.

A neutrofilia em pacientes com artrite reumatoide, excita a produção de IL-17, que por sua vez, danifica a matriz extracelular causando reabsorção óssea, induzindo a produção de IL-6 (CHOW et al., 2011).

Essa mesma amostra deste paciente de fase subaguda apresentou ainda valores superiores das IL-4 e IL-5, quando comparada ao grupo controle. Corroborando com trabalho de Venugopalan et al. (2014), onde as citocinas Th2 atingiram o pico em indivíduos com fase sintomática prolongada, entre 15 a 30 dias (fase subaguda). A produção de citocinas Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, promove a função das células B na CHIK, semelhante ao que ocorre na autoimunidade do lúpus eritematoso sistêmico (AMARAL et al., 2020). Portanto, podem iniciar uma produção de altos níveis de anticorpos IgG anti-CHIKV, de forma persistente (NG

et al., 2009; WAUQUIER et al., 2011).

Essa resposta Th2 ocorre de maneira oposta quando testada em camundongos, acontecendo durante a fase aguda. É vista mais ainda de forma aprimorada quando os camundongos são infectados pelo CHIKV por meio do repasto sanguíneo do mosquito, conferindo a importância tanto da escolha do modelo animal, quanto a maneira utilizada para a transmissão do CHIKV por vias experimentais (TANABE et al., 2018).

No presente estudo, cinco amostras de fase aguda e duas de fase subaguda revelaram resultados abaixo dos limites de referência e também mais baixos quando se comparados ao grupo controle para o mediador MIP-1 β , diferente ao encontrado em outras pesquisas, que observaram níveis elevados, tanto em amostras de soro ou plasma, de fases aguda ou crônica da infecção (HOARAU et al., 2010; CHAAITHANYA et al., 2011; SCHILTE et al., 2013; CHANG et al., 2017). A IL-8 induz neutrófilos a migrarem para a área inflamada, enquanto os monócitos são induzidos pelas proteínas quimiotáticas de monócitos (MCP-1) (TAUB, 1993) e pelas proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1 α e MIP- β) (NATH et al., 2006).

Os neutrófilos e monócitos mobilizados por mediadores participam de reações inflamatórias imunológicas agudas e crônicas, podendo migrar para outras regiões onde ocorre replicação viral, já demonstrado em trabalhos com primatas não humanos (CHOW et al., 2011). Dairaghi et al. (1998) demonstraram que as células T CD4⁺ que possuem atividades auxiliares migram para o local de inflamação em resposta à quimiocina MIP-1 β .

Her et al. (2010), em amostras de fase aguda de um surto de Singapura, realizaram um estudo com perfis de 16 citocinas e quimiocinas secretadas por monócitos, por meio do ensaio multiplex em esferas flexíveis Luminex[®]. Foi utilizado o sobrenadante de culturas de monócitos coletadas durante a infecção ao longo do tempo. Em seus resultados, os monócitos infectados com CHIKV, 48 horas após a inoculação do vírus, diminuíram significativamente seus níveis de IL-8, MIP-1 β e RANTES, em comparação com culturas infectadas por simulação.

Teo et al. (2013) avaliaram o papel das células T na infecção primária por CHIKV utilizando camundongos, cujos resultados indicaram que as células T CD4⁺ específicas para CHIKV, mas não as CD8⁺, são essenciais para o desenvolvimento de edema nas articulações, sem nenhum efeito na replicação e disseminação do vírus.

Curiosamente, seis amostras de fase aguda e duas de fase subaguda desse estudo possuíam edema de membros e não tiveram resultados de MIP-1 β elevado, corroborando com o trabalho de Her et al. (2010), onde esses níveis começam a diminuir após 48 horas.

Na média, o mediador inflamatório CXCL10/IP10 apresentou valores significativamente elevados, quando comparados ao grupo controle com valor de $p < 0.01$, em

oito amostras de fase aguda, mostrando-se acima dos valores de referência em cinco amostras de fase subaguda, corroborando com vários estudos, cujo valores também se mostraram elevados em fase aguda (KELVIN et al., 2011; WAUQUIER et al., 2011; REDDY et al., 2014; SUHRBIER, 2019; CHIRATHAWORN, 2020) e em fases aguda e subaguda (VENUGOPALAN et al., 2014). O aumento desse mediador também foi relacionado à gravidade da doença (KELVIN et al., 2011) e carga viral elevada (CHOW et al., 2011).

Quando as células T auxiliar tipo I (Th1) são recrutadas, há também envolvimento do receptor CXCR3, ligante da quimiocina CXCL-10 / IP-10 (NATH et al., 2006), quimiocina pró-inflamatória de resposta Th1 (VENUGOPALAN et al., 2014). Essa citocina é induzida por outra citocina, a IFN- γ , e foi relacionada com a gravidade da doença, em estudo recente, com amostras de fase subaguda (CHIRATHAWORN et al., 2020). Essa citocina estimula monócitos e macrófagos, podendo também recrutar células NK, estando monócitos e macrófagos implicados na imunopatologia artrítica do CHIK (NATH et al., 2006). Durante a fase aguda, essa resposta imune pode levar a eliminação do vírus num período de 7 a 10 dias após início dos sintomas (PATHAK et al., 2019).

No conjunto das amostras, a IL-6 está significativamente mais elevada quando comparada com o grupo controle, com valor de $p = 0.0002$, em sete amostras de fase aguda e, em fase subaguda, duas amostras tiveram níveis acima do valor de referência. Estudos anteriores citaram a IL-6 elevada em fases iniciais da infecção pelo CHIKV (NG et al., 2009; WAUQUIER et al., 2011; LOHACHANAKUL et al., 2012; VENUGOPALAN et al., 2014; CHOW et al., 2011; REDDY et al., 2014; CHIRATHAWORN et al., 2020) e durante a fase crônica (KELVIN et al., 2011; CHOPRA et al., 2011).

A IL-6 é uma citocina pirógena relacionada com a febre elevada nos pacientes com CHIK (NG et al., 2009; CHOW et al., 2011). Nesse estudo, 66.6 % dos pacientes, apresentaram febre $> 38.5^{\circ}\text{C}$ em seu prontuário e a IL-6 se mostrou significativamente elevada. A expressão da IL-6 é realizada por uma variedade de células e essa citocina é capaz de induzir a expressão de MCP-1, atraindo monócitos e macrófagos para o sítio de infecção (NORET et al., 2012).

A IL-6 foi associada à gravidade de sintomas (NG et al., 2009; NAYAK et al., 2017; THANAPATI et al., 2017) em conjunto com a elevação do mediador IL-1 β (NG et al., 2009) e com o mediador MCP-1 (LOHACHANAKUL et al., 2012). Duas amostras de fase subaguda que tiveram os mediadores IL-6, MCP-1 e IL-1 β elevados apresentaram sintomas como febre, artralgia intensa, artrite e edema de membros, se relacionando com a gravidade de sintomas citados nos referidos estudos.

A IL-6 é elevada em amostras humanas, em primatas e em outras infecções alfavirais

(VENUGOPALAN et al., 2014), e também foi verificada nos estudos por Lentscher et al. (2020), utilizando camundongos, onde a replicação do CHIKV em células do músculo esquelético, promoveu a liberação da IL-6. No presente estudo, na fase aguda, sete amostras tiveram resultados elevados do mediador IL-6, o que coincide com os valores encontrados em processos inflamatórios amplamente referenciados (CHAAITHANYA et al., 2008; CHOW et al., 2011; KELVIN et al., 2011; LOHACHANAKUL et al., 2012). Os pacientes associados com essas amostras possuíam, descritos em seus prontuários, os sintomas de artralgia intensa, artrite, sendo que quatro tiveram febre > 38.5°C e dois ainda relataram a presença de edema de membros.

A IL-6 também se correlacionou, em outros estudos, com uma alta carga viral (CHOW et al., 2011; TENG et al., 2015) e esteve presente em níveis elevados até por mais de 18 meses em pacientes com sintomas artríticos persistentes (CHOPRA et al., 2011).

Nesse trabalho, verificou-se que a expressão da IL-6, além de elevada, demonstrou uma curva de elevação da expressão entre as fases aguda e subaguda, respectivamente, nas amostras analisadas. O mediador IFN- γ também teve o aumento nessas mesmas amostras quando comparado ao grupo controle, como relatado em outros estudos. O aumento dessa expressão pode estar relacionado com uma tentativa imunológica do vírus instalar uma fase crônica da CHIK (NG et al., 2009; THANAPATI et al., 2017).

Em estudos de Rulli et al. (2011), foram dosados os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro de pacientes que sofrem de poliartralgia aguda e poliartrite induzida por CHIKV. Os resultados apresentaram níveis significativamente mais altos de IFN- γ .

As mesmas amostras também apresentaram um valor suprimido de RANTES e elevação do nível do mediador IL-1 β , como ocorrido nos estudos de Ng et al. (2009).

Portanto, a IL-6 pode ser sugerida como biomarcador de cronicidade e gravidade da infecção por CHIKV, com o envolvimento de manifestações articulares, já relatado em outros estudos (NG et al., 2009; REDDY et al., 2014; SEPÚLVEDA-DELGADO et al., 2017; CHIRATHAWORN et al., 2020; LENTSCHER et al., 2020).

A expressão do mediador inflamatório IL-15 em amostras de fase aguda desse estudo, se mostrou significativamente elevada ($p = 0.0002$) quando comparada com amostras do grupo controle. A IL-15 é uma citocina estimuladora de células NK (TANABE et al., 2018) que faz parte da primeira linha defensiva contra patógenos, assim como neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, mastócitos e macrófagos no sistema imune inato (PERERA et al., 2012). Tem ainda ação no sistema imune adaptativo, com efeito imunomodulador e papel relevante no mecanismo de defesa contra antígenos (PERERA et al., 2012). A IL-15 também foi associada

ao desenvolvimento inflamatório articular (NG et al., 2009).

Os resultados das amostras de fase aguda para o mediador MCP-1 obtiveram aumento significativo em 15 amostras do estudo em comparação com amostras controle ($p < 0.001$). Em outros trabalhos com CHIKV, o MCP-1 também se mostrou elevada (VENUGOPALAN et al., 2014; REDDY et al., 2014; CHIRATHAWORN et al., 2020), atingindo níveis máximos entre os dias 0 e 05 após o início dos sintomas (VENUGOPALAN et al., 2014). Das 15 amostras com nível elevado para MCP-1, 13 tinham histórico sintomático de artralgia intensa e a presença de artrite como sintoma, corroborando com estudos de Chirathaworn et al. (2020), que acompanhou os níveis de citocinas, incluindo MCP-1, em quatro pacientes com artralgia persistente, tendo como resultado valores muito altos quando se comparados ao grupo saudável. Destas amostras, sete também tiveram os níveis de IL-6 significativamente aumentados ($p < 0.001$). Lohachanakul et al. (2012), em seu estudo na Tailândia, que avaliou o comportamento dos mediadores inflamatórios em amostras de um surto entre 2009 e 2010, associou a gravidade da CHIK aos altos níveis de IL-6 e MCP-1. A carga viral elevada também é correlacionada com níveis elevados da quimiocina MCP-1 (CHOW et al., 2011; REDDY et al., 2014; TENG et al., 2015). A IL-6 induz a expressão da MCP-1, que, por ser um quimioatrativo, induz a monócitos e macrófagos (REDDY et al., 2014; LUM & NG, 2015). As células NK e T específicas secretam IFN- γ (SUHRBIER, 2019), que por sua vez, ativam os macrófagos, resultando no acúmulo dessas células na região articular (NORET et al., 2012; SUHRBIER, 2019). Chow et al. (2012) verificou que os níveis elevados de MCP-1 retornaram aos níveis normais após a resolução da doença, o que indicaria essa quimiocina estar relacionada com pacientes que desenvolvem artrite crônica pós CHIK.

Das 17 amostras estudadas, 11 tiveram aumento significativo da CCL-11/eotaxin ($p < 0,01$). A eotaxina é uma quimiocina Th2 que provoca uma reação local anti-inflamatória (CHOW et al., 2011).

Há poucos relatos sobre a eotaxina em pesquisas sobre o CHIKV, necessitando esse marcador ser mais avaliado em pesquisas futuras. Ela é antagonista natural do CCR2, mesmo receptor da MCP-1. Sendo assim, uma superprodução dos mediadores eotaxina e o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que é um inibidor da MCP-1, podem diminuir sua concentração via CCR2. Concomitantemente, ocorreria uma diminuição no número de monócitos/macrófagos, efeito que poderia ser benéfico, como apontado em estudo realizado em camundongos (MAGUIRAGA et al., 2012).

As divergências encontradas na literatura a respeito da expressão dos mediadores inflamatórios em indivíduos infectados pelo CHIKV, podem estar relacionadas a fatores como

genótipo viral, a extensão da infiltração de células causadoras de inflamação, tempo de coleta e fonte da amostra, o tamanho do coorte de amostragem e a intensidade da resposta inflamatória por parte das citocinas envolvidas.

Apesar de não ter havido uma pesquisa mais aprofundada neste trabalho sobre sequenciamento do genoma viral, avaliação da carga viral e de outros temas que possam ser perseguidos numa etapa posterior, os resultados aqui obtidos podem contribuir para uma melhor compreensão da resposta imune do CHIKV (Anexo VI). No contexto do monitoramento terapêutico ou diagnóstico desta arbovirose tão negligenciada, podem também colaborar na descoberta e validação de marcadores de fase aguda e subaguda.

7. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que:

- a. das 175 amostras sanguíneas de pacientes atendidos na UPA Beira Mar, com base no diagnóstico clínico de arboviroses, 45 (25.71%) foram classificadas como DEN, 30 (17.10%) como ZIK e 94 (53.71%) tiveram diagnóstico clínico de CHIK, o que sugeriu um quadro epidêmico de CHIK no período estudado;
- b. a maioria dos casos de diagnóstico positivo para as arboviroses se apresentou em pacientes do gênero feminino (88/169; 52.07%), dentre os quais chama-se atenção para o quantitativo de casos suspeitos de ZIK, de mesmo gênero, na faixa etária de 20 a 39 anos (11/22; 50%);
- c. nos pacientes considerados suspeitos de CHIK, foram observados quadros de artralgia, variando de moderada a intensa (91/94; 96.8%), e de artrite (77/94; 81.9%), verificados como sintomas claramente mais frequentes;
- d. a expressão elevada de IL-1 (β e ra), TNF- α , INF- γ , IL-17a, IL-4 e IL-5, em uma amostra de fase subaguda, indica uma transição à cronicidade, que é corroborada com o tempo de evolução e sintomas de CHIK, apresentados pelo paciente;
- e. o aumento da expressão do mediador inflamatório CXCL10/IP-10 foi associado a uma carga viral elevada, em pacientes de fase aguda, e ao agravamento do quadro clínico, em pacientes de fase aguda e subaguda de CHIK;
- f. a IL-6 foi relacionada com a fase aguda da infecção por CHIK, em pacientes com febre alta (ação pirógena) e carga viral elevada. Entretanto, sua expressão aumentada, também teve relação com a gravidade da doença em pacientes de fase subaguda, especialmente, quando níveis elevados dos mediadores MCP-1 e IL-1 β estavam associados. Sua significativa expressão elevada em relação aos controles e altos níveis em fase aguda e fase subaguda, sugere ser um bom marcador de cronicidade para a CHIK;
- g. a expressão elevada da IL-15 e da quimiocina MCP-1 foi observada em amostras de fase aguda de infecção, sendo associada a uma resposta imune inata em pacientes com inflamação artrítica em fase inicial da doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, J.K.; BILSBORROW, J.B.; SCHOEN, R.T. Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid Arthritis: What They Have in Common. **The American Journal of Medicine**, v.133, ed.3, p.e91-e97, 2020.

AZEVEDO, R.S.S.; OLIVEIRA, C.S.; VASCONCELOS, P.F.C. Chikungunya risk for Brazil. **Rev. Saude Pública**, Sep, v.49, 58, 2015.

ARTAL, F. J. C.; ARAUJO, A.Q.C. Neurological complications in adults with Zika and chikungunya virus infection. **The Lancet Neurology**, v.19, n.10, p. 799-801, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 47. **Boletim Epidemiológico**, v. 45, n. 31, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 12. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 12, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 44, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 49. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 38, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 2, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção Básica Chikungunya: Manejo Clínico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Atenção Básica. – **Brasília: Ministério da Saúde**, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 15. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n.59, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 11. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n.13, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas (dengue, chikungunya e Zika) Semanas Epidemiológicas 1 a 52. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n.2, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas (dengue, chikungunya e Zika) Semanas Epidemiológicas 1 a 22. **Boletim Epidemiológico**, v. 51, n.23, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC). **Brasília: Ministério da Saúde**, 2015.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Panorama Duque de Caxias**. Disponível em <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rj/duque-de-caxias/panorama>. Acesso em 10/04/2019.

BRISEÑO, J.A.A.; SILVA, M.R.; MOSER J.; PAUZUOLIS, M.; SMIT, J.M.; ZYBERT, I.A.R. Rewiring PBMC responses to prevent CHIKV infection-specific monocyte subset redistribution and cytokine responses. **bioRxiv**, doi:<https://doi.org/10.1101/2020.06.04.132340>, 2020.

BROECKEL, R.; HAESE, N.; MESSAOUDI, I.; STREBLOW, D.N. Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model). **Pathogens**, v. 4, p.662-681, 2015.

BURT, J. F.; CHEN, W.; MINER, J.J.; LENSCHOW, D.J.; MERITS, A.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A.; RUDD, P.A.; TAYLOR, A.; HERRERO, L.; ZAID, A.; NG, L.F.P.; MAHALINGAM, S. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **Infectious Diseases**, v.17, ed.4, p.107-117, 2017.

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

CAMPOS, G.S.; BANDEIRA, A.C.; SARDI, S.I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 1885-6, 2015.

CASTRO, A.P.C.R.; LIMA, R.A.; NASCIMENTO, J.S. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Rev.Dor**, v.17, n.4, p.299-302, 2016.

CHAHAR, H.S.; BHARAJ, P.; DAR, L.; GULERIA, R.; KABRA, S.K.; BROOR, S. Co-infections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.7, p.1077-1080, 2009.

CORREIA, F.S.A.; FILGUEIRAS, I.M.L.; LIMA, F.J. Biomarcadores salivares no diagnóstico de câncer oral. **Revista Multidisciplinar e Psicologia**, v.12, n.40, 2018.

CHANG, A.Y.; MARTINS, K.A.O.; ENCINALES, L.; REID, P.; ACUÑA, M.; ENCINALES, C.; MATRANGA, C.B.; PACHECO, N.; CURE, C.; SHUKLA, B.; ARTETA, T.R.; AMDUR, R.; CAZARES, L.H.; GREGORY, M.; WARD, M.D.; PORRAS, A.;

MENDOZA, A.R.; DONG, L.; KENNY, T.; BRUEGGEMANN, E.; DOWNEY, L.G.; KAMALAPATHY, P.; FALLS, O.; CHAAITHANYA, I.K.; MURUGANANDAM, N.; SUNDARAM, S.G.; KAWALEKAR, O.; SUGUNAN, A.P.; MANIMUNDA, S.P.; GHOSAL, S.R.; MUTHUMANI, K.; VIJAYACHARI, P. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. **Viral Immunology**, v.24, n.4, p.265-271, 2011.

CHIRATHAWORN, C.; CHANSAENROJ, J.; POOVORAWAN, Y. Cytokines and Chemokines in Chikungunya Virus Infection: Protection or Induction of Pathology. **Pathogens**, n.9, p.415, 2020.

CHOPRA, A.; ANURADHA, V.; GHORPADE, R.; SALUJA, M. Acute Chikungunya and persistent musculoskeletal pain following the 2006 Indian epidemic: A 2-year prospective rural community study. **Epidemiology and Infection**, v.140, n.5, p.842-850, 2012.

CHOW, A.; HER, Z.; ONG, E.K.S.; CHEN, J.M.; DIMATATAC, F.; KWEK, D.J.C.; BARKHAM, T.; YANG, H.; RÉNIA, L.; LEO, Y.S.; NG, L.F.P. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v.203, n.2, p. 149-157, 2011.

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

DEEBA, F.; ISLAM, A.; KAZIM, S.N.; NAQVI, I.H.; BROOR, S.; AHMED, A.; PARVEEN, S. Chikungunya virus: recente advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. **FEMS Pathogens and Disease**, n.74, ftv.119, 2016.

DIAS, J.P.; COSTA, M.C.N.; CAMPOS, G.S.; PAIXÃO, E.S.; NATIVIDADE, M.S.; BARRETO, F.R.; ITAPARICA, M.S.C.; GOES, C.S.B.; OLIVEIRA, F.L.S.; SANTANA, E.B.; SILVA, N.S.J.; BRITO, C.A.A.; RODRIGUES, L.C.; SARDI, S.I. SAAVEDRA, R.C.; TEIXEIRA, M.G. Seroprevalence of Chikungunya Virus in 2 Urban Areas of Brazil 1 Year after Emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v.24, n. 4, 2018.

DAIRAGHI, D.J.; BACON, K.F.; CALLAS, E.; CUPP, J.; SCHALL, T.J.; TAMRAZ, S.A.; BOEHME, S.A.; TAYLOR, N.; BACON, K.B. Macrophage Inflammatory Protein-1b Induces Migration and Activation of Human Thymocytes. **Blood**, v.91, n.8, p.2905–2913, 1998.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18 n.1, 2015.

FAYE, O.; FAYE, O.; DIALLO, D.; DIALLO, M.; WEIDMANN, M.; SALL, A.A. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, v. 10, p.311, 2013.

GRANDADAM, M.; CARO, V.; PLUMET, S.; THIBERGE, J.M.; SOUARÈS, Y.; FAILLOUX, A.B.; TOLOU, H.J.; BUDELLOT, M.; COSSERAT, D.; GOFFART, I.L.; DESPRÈS, P. Chikungunya virus, Southeastern France. **Emerg. Infect. Disease**, v.17, n.5, p. 910–913, 2011.

GRIFFIN, D.E. Alphaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. **Fields virology**, ed.5, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

GÓMEZ, M.Z.; ISAZA, D.V. El virus Chikungunya en Colombia: **aspectos clínicos y epidemiológicos y revisión de la literature**. **Iatreia**, v.29, n.1, p.65-74, 2016.

HONÓRIO, N.A., CÂMARA, D.C.P.; CALVET, G.A.; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.

HER, Z.; MALLERET, B.; CHAN, M.; RÉNIA, E.K.S.; NG, L.F.P.; LIN, R.T.P.; TAMBYAH, P.A.; ONG, L.; WONG, S.C.; KWEK, D. J.C.; TOLOU, H. Active infection of human blood monocytes by chikungunya virus triggers an innate immune response. **J. Immunology**, v.184, p.5903-5913, 2010.

HOARAU, J.J.; BANDJEE, M.C. J.; TROTOT, P.K.; YUEN, G.L.P.; DASSA, B.; DENIZOT, M.; GUICHARD, E.; RIBERA, A.; HENNI, T.; TALLET, F.; MOITON, M.P.; GAUZÈRE, B.A.; BRUNIQUET, S.; BANDJEE, Z.J.; MORBIDELLI, P.; MARTIGNY, G.; JOLIVET, M.; GAY, F.; GRANDADAM, M.; TOLOU, H.; VIEILLARD, V.; DEBRÉ, P.; AUTRAN, B.; GASQUE, P. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **J. Immunology**, v.184, p.5914–27, 2010.

HUA, C.; COMBE, B. Chikungunya vírus-associated Disease. **Curr. Rheumatology reports**, v.16, n.69 DOI 10.1007/s11926-017-0694-0, 2017.

JOHNSTON, R. E.; PETERS, C. J. Alphaviruses. **Fields virology**, Lippincott-Raven Publishers. ed.3, v: 1, p. 843-898, 1996.

KELVIN, A.A.; BANNER, D.; SILVI, G.; MORO, M.L.; SPATARO, N.; GAIBANI, P.; CAVRINNI, F.; PIERRO, A.; ROSSINI, G.; CAMERON, A.J.; BERMEJO-MARTIN, J.F.; PAQUETTE, S.G.; XU, L.; DANESH, A.; FAROOQUI, A.; BORGUETTO, I.; KELVIN, D.J.; SAMBRI, V.; RUBINO, S. Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity. **PLoS One**, v.5, n.8, e1279, 2011.

LESCAR, J., ROUSSEL, A.; WIEN, M.W.; NAVAZA, J.; FULLER, S.D.; WEGLER, G.; WENGLER, G.; REY, F.A.. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. **Cell**, v.105, p.137–48, 2001.

LENTSCHER, A.J.; MORRISON, T.E.; DERMODY, T.S. Chikungunya virus replication in skeletal muscle cells is required for disease development. **J. Clin Invest**, v.130, n.3, p.1466-1478, 2020.

LINGER, B. R.; KUNOVSKA, L.; KUHN, R. J. Sindbis virus nucleocapsid assembly: RNA folding promotes capsid protein dimerization. **RNA**, v.10, p.128–38, 2004.

LOHACHANAKUL, J.; PHUKLIA, W.; THANNAGITH, M.; THANNAGITH, T.; UBOL, S. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 with

low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009–2010 outbreak in Thailand. **Microbiol Immunol**, v.56, p. 134-138, 2012.

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

MAGALHÃES, J.L.; HARTZ, Z.; MENEZES, M.S.; QUONIAM, L. Big data e a saúde negligenciada em dengue, zika e chikungunya: uma ameaça do século 21. **Ci. Inf. Brasília**, DF. V.45, n.3, p. 234-250, 2016.

MAGUIRAGA, L.D.; NORET, M.; BRUN, S.; LE GRAND, R.; GRAS, G.; ROQUES, P. Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.3, 2012.

MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIC, M.; RUS, K.R.; VIPOTINIK, T.V.; VODUSEK, V.F.; VIZJAK, A.; PIZEM, J.; PETROVEC, M.; ZUPANC, T.A. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v.374, n.10, p.951-958, 2016.

MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed Research International**, v. 2015, Article ID 834371.

MATOS, D.A.; PAROLINI, M.A.; FAUSTINO, W.R.; JÚNIOR, M.A.H.F.; TAKEUTI, T.D. Haematological changes found in aroviruses dengue, zika and Chikungunya. **Revista da Saúde da AJES**, v.6, n.11, 2020.

MORCERFI, C.C.P.; BENETTE, M.M.; MORAES, T.M.C.; SIQUEIRA, A.A.; SILVA, A.C.G.; IMPAGLIAZZO, S.P. Chikungunya: arbovirose como problema de saúde em expansão – uma revisão bibliográfica. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v.9 n.2, 2015.

MOHAN, A.; KIRAN, D.; MANOHAR, C.; KUMAR, D.P. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian J Dermatol.**, v.55, p.54-63, 2010.

NAYAK, T.K.; MAMIDI, P.; KUMAR, A.; SINGH, L.P.K.; SAHOO, S.S.; CHATTOPADHYAY, S. Regulation of viral replication, apoptosis and pro-inflammatory responses by 17-AAG during chikungunya vírus infection in macrophages. **Viruses**, v.9, n.3, 2017.

NAYAK, T.K.; MAMIDI, P.; SAHOO, S.S.S; KUMAR, P.S; MAHISH, C; CHATTERJEE, S; SUBUDHI, B.B; CHATTOPADHYAY, S; CHATTOPADHYAY, S. P38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases Interact With Chikungunya Virus Non-structural Protein-2 and Regulate TNF Induction During Viral Infection in Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v.10 | Article 786, 2019.

NATH, A.; CHATTOPADHYA, S.; CHATTOPADHYAY, U.; SHARMA, N.K. Macrophage inflammatory protein (MIP)1a and MIP1b differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. **Cancer Immunol Immunother**, v.55, p.1534–1541, 2006.

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

NG, L.F.P.; CHOW, A.; SUN, Y.J.; KWEK, D.J.C.; LIM, P.L.; DIMATATAC, F.; NG, L.C.; OOI, E.E.; CHOO, K.H.; HER, Z.; KOURILSKY, P.; LEO, Y.S. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. **PLoS One**, v.4, issue 1, e4261, 2009.

PAHO. Pan American Health Organization. Case Definitions. **Zika virus**, 2017
Disponível:https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=427&Itemid=41484&lang=en >. Acesso em: 02 maio 2018.

PATHAK, H.; MOHAN, M.C.; RAVINDRAN, V. Chikungunya arthritis. **Clin Med (Lond)**, v.19, n.5, p.381-385, 2019.

PERERA, P.Y.; LICHY, J.H.; WALDMANN, T.A.; PERERA, L.P. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. **Microbes and Infection**, v.4, p.247-261, 2012.

RAAD, J. J.; RINCONES, W.S.; MARTÍNEZ, A.S.; HERNANDÉZ, A.S.; ESTRADA, Y.F.; PARODY, A.; RAMÍRES, J.L.B.; ROSERO, A.S.; CHAR, J.J.; Caracterización clínica de sujetos infectados con virus chikungunya, en una población del Caribe colombiano. **Rev.Colomb. Reumatol.**, n.23, v.3, p.170-176, 2016.

RAMÓN, S.S.; LONGO, F.J.L.; CARREÑO, L. Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. **Reumatología Clínica**, v.6, s.3, p. 20-24, 2011.

REDDY, V.; MANI, R.S.; DESAI, A.; RAVI, V. Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. **J. Med. Virology**, n.86, v.1393, p.1401, 2014.

REZZA, G.; ANGELINI, R.; ROMI, R.; FINARELLI, A.C.; PANNING, M.; CORDIOLI, P.; FORTUNA, P.; BOROS, S.; MAGURANO, F.; SILVI, G.; ANGELINI, P.; DOTTORI, M.; CIUFOLINI, M.G.; MAJORI, G.C.; CASSONE, A. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **The Lancet**, v.370, p.1840–1846, 2007.

ROBINSON, M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.49, p. 33-57, 1955.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J. No era suficiente con dengue y chikungunya: llegó también Zika. **Archivos de Medicina**, v. 11, n. 2-3, p. 1-4, 2015.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J., et al. Would be IL-6 a missing link between chronic inflammatory rheumatism and depression after chikungunya infection? **Rheumatology Int.**, v.37: 1149-1151, 2017.

RIOS, M.L.A.; LIMA, H.M.L.; LIMA, M.M.; FALCÃO, M.; CERQUEIRA, E.M. Intensidade da arthralgia de indivíduos acometidos por chikungunya. **Convencion Internacional de Salud**. Cuba, 2018.

RULLI, N.E.; ROLPH, M.S.; SRIKIATKHACHORN, A.; ANANTAPREECHA, A.; GUGLIELMOTTI, A.; MAHALINGAM, S. Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.204, n.7, p.1026–1030, 2011.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Boletim Epidemiológico arboviroses. Cenário Epidemiológico: Dengue, Chikungunya e Zika no Estado RJ. **SES**, n.3, 2019.

SEPÚLVEDA-DELGADO, J.; LASTRA, V.O.L.; MURILLO, K.T.; ÁVILA, L.M.C.; GONZALEZ, R.A.S.; CRUZ, O.G.; TRAMPE, A.L.; SALAS, I.F.; LOZANO, R.D.; CONTRERAS, A.C.; TORRES, A.M.; ARREVILLAGA, S.D.; VELA, B.A.M.; SIBILLA, M.O.; VALDESPINO, J.C.R.; JARA, L.J. Inflammatory biomarkers, disease activity index, and self-reported disability may be predictors of chronic arthritis after chikungunya infection: brief report. **Clin. Rheumatology**, v.36, p.695-699, 2017.

SCHILTE, C.; STAIKOVSKY, F.; COUDERC, T.; MADEC, Y.; CARPENTIER, F.; KASSAB, S.; CARPENTIER, F.; ALBERT, M.L.; LECUIT, M.; MICHAULT, A. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Negl Trop Disease**, v.7, n.3, p.10.1371, 2013.

SHARMA, S.K.; JAIN, S. Chikungunya: A rheumatologist's perspective. **Int. J. Rheum. Disease**, v.21, p.584-601, 2018.

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

SMITH, T.J.; CHENG, R.H.; OLSON, N.H.; PETERSON, P.; CHASE, E.; KUHN, R.J.; BAKER, T.S. Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. **Proc Natl Acad Sci USA**, 92:10648–52, 1995.

SOLIGNAT, M.; GAY, B.; HIGGS, S.; BRIANT, S.; DEVAUX, C. Replication cycle of Chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v.393, p.183–97, 2009.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nat. Rev. Rheumatology**, v.15, p.597–611, 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41584-019-0276-9>

TANABE, I.S.B.; TANABE, E.L.L.; SANTOS, E.C.; MARTINS, W.V.; ARAUJO, I.M.T.C.; CAVALCANTE, M.C.A.; LIMA, A.R.V.; CÂMARA, N.O.S.; ANDERSON, L.; YUNUSOV, D.; BASSI, E.J. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.8, article 345, 2018.

TEO, T.H.; LUM, F.; CLASER, C.; LULLA, V.; LULLA, A.; MERITS, A.; RÉNIA, L.; NG, L.F.P. A Pathogenic Role for CD4⁺ T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice. **The Journal of Immunology**, v.190, n.1, p.259-269, 2013.

THANAPATI, S.; SUDEEP, A.B.; KULKARNI, S.P.; TRIPATHY, A.S. Regulation of the chikungunya-virus-induced innate inflammatory response by protein tyrosine phosphatase non-receptor 6 in muscle cells. **Arch.Virology**, v.163, p. 243, 2017.

THANAPATI, S.; GANU, M.; GIRI, P.; KULKARNI, S.; SHARMA, M.; BABAR, P.; GANU, A.; TRIPATHY, A.S. Impaired NK cell functionality and increased TNF- α production as biomarkers of chronic chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis. **Human Immunology**, v.78, p.370-374, 2017.

TAUB, D.D.; CONLON, K.; LLOYD, A.R.; OPPENHEIM, J, J.; KELVIN, D.J. Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science**, p.355-358, 1993.

TEIXEIRA, M.G.; ANDRADE, A.M.S.; COSTA, M.C.N.; CASTRO, J.S.M.; OLIVEIRA, F.L.S.; GOES, C.S.B.; MAIA, M.; SANTANA, E.B.; NUNES, B.T.D.; VASCONCELOS, P.F.C. East/Central/ South African genotype Chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerg. Infect. Disease**, 21:906-7, 2015.

TELLINGHUISEN, T.L.; HAMBURGER, A.E.; FISHER, B.R.; OSTENDORP, R.; KUHN, R.J. In vitro assembly of alphavirus cores by using nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. **J. Virology**, 73:5309–19, 1999.

TELLINGHUISEN, T.L.; KUHN, R.J. Nucleic acid-dependent cross-linking of the nucleocapsid protein of Sindbis virus. **J. Virology**, 74:4302–9, 2000.

TENG, T.S.; KAM, Y.W.; LEE, B.; HAPUARACHCHI, H.C.; WIMAL, A.; NG, N.C.; NG, L.F.P. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.211, n.12, p.1925–1935, 2015.

TRIPATHY, A.S.; GANU, M.A.; SONAM, L.; ALAGARASU, K.; WALIMBE, A.M.; THANAPATI, S.; GUPTA, P.; PURANIK, S. Association of IL1RN VNTR polymorphism with chikungunya infection: A study from Western India. **J. Med. Virology**, v.91, p.1901-1908, 2019.

VENUGOPALAN, A.; GHORPADE, R.P.; CHOPRA, A. Cytokines in Acute Chikungunya. **PLoS ONE**, v.9 n.10, e111305, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111305>.

VERMA, P.; SHARMA, A.; SHANKAR, H.; RAO, D.N. Chikungunya Infection and Immunity: An Overview. **Current. Immunology Reviews**, v.14, n.1, p.31-39, 2018.

VU, D.M.; JUNGKIND, D.; LABEAUND, A.D. Chikungunya virus. **Clin. Lab. Med.**, v.37, n.2, p.371-382, jun, 2017.

WAUQUIER, N.; BECQUART, P.; NKOGHE, D.; PADILLA, C.; MBIGUINO, A.N.; LEROY, E.M. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activatio. **The Journal of Infectious Diseases**,

v.204, ed.1, p.115–123, 2011.

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

WEAVER, S.C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 372, p. 1231-1239, 2015.

ZHANG, W.; HEIL, M.; KUHN, R.J.; BAKER, T.S. Heparin binding sites on Ross River virus revealed by electron cryo-microscopy. **Virology**, 332:511–8. 10.1016/j.virol.2004.11.043, 2005.

ZAID, A.; GÉRARDIN, P.; TAYLOR, A.; MOSTAFAVI, H.; MALVY, D.; MAHALINGAM, S. Chikungunya arthritis: implications of acute and chronic inflammation mechanisms on disease management. **Arthritis & Rheumatology**, v.70, n.4, p. 484-495, 2018.

WHO. Diretrizes da OMS para a tiragem de sangue: **boas práticas em flebotomia**, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/infection-prevention/publications/Phlebotomy-portuges_web.pdf>. Acesso em: 12 de junho de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**. <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 26/05/2018.

9. ANEXOS

ANEXO I: Formulário estruturado para investigação de arbovírus.


 ESTADO DO RIO DE JANEIRO
 PREFEITURA MUNICIPAL DE DUQUE DE CAXIAS
 SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE
 DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE -Coordenadoria de Epidemiologia

Ficha de Investigação para Flavivírus - Duque de Caxias

Nº SINAN Data início dos sintomas Data da notificação
 Nome do Paciente
 Sexo Data de Nascimento Idade Gestante
 Endereço
 Número Complemento Telefone de contato
 Ponto de referência
 Bairro Município
 Data de início dos sintomas
Sinais e Sintomas
 Febre
 Artralgia
 Exantema
 Cefaléia
 Hiperemia conjuntival
 Prurido
 Diarréia
 Mialgia
 Poliartrite
 Manifestações hemorrágicas
 Sintomas respiratórios
 Edemas de membros
 Outros

Dados de atendimento
 Data de atendimento
 Local de atendimento
 Município de atendimento
 UF

Contato com casos semelhantes
 Ação Endereço Telefone

Deslocamento (30 dias antes) do início dos sintomas

Data	Município	UF	País	Meio de transporte

ANEXO II: Questionário sobre estado de saúde passado e atual, doenças pré-existentes, uso de medicamentos e histórico familiar de doenças autoimunes para o grupo controle.

Questionário para pacientes controle do Projeto:

Candidato incluído no projeto:

Sim não

Nome candidato:

Data de nascimento: / / Sexo: M F

Endereço:

Contato: CPF:

Viagem recente: sim não

Data: / / a / /

Local:

Hemotransfusão: sim não Gestante: sim não Dengue: sim não
 Ano:

Zika: sim não Chikungunya: sim não Diabetes: sim não

Hepatite: sim não Herpes: sim não AIDS: sim não

Hipertensão arterial: sim não Rinite: sim não Asma: sim não

Vacina recente: sim não Uso de álcool: sim não Fumante: sim não

Qual:

ANEXO III: Adendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (CEP-Unigranrio) sob CAAE 70324417.1.0000.528.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Duque de Caxias, 03 de maio de 2019

Do: Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO

Para Pesquisadores: Raphael Rangel das Chagas

André Federico Martins

Hury Hellen Souza de Paula

Para Orientador: Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO, após avaliação considerou **aprovado** o projeto de pesquisa "PEPTÍDEOS E LIPOSSOMAS FUNCIONALIZADOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO PARA ZIKA VÍRUS", protocolado sob o **número de CAAE 70324417.1.0000.5283**, encontrando-se a referida pesquisa e o Termo de consentimento Livre e Esclarecido em conformidade com a Resolução N.º 466, de 12 de Dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos. A referida pesquisa inclui um **ADENDO** para constituição de grupo controle em uma nova vertente, que é a avaliação de mediadores químicos inflamatórios de pacientes com arboviroses. Além da avaliação dos aspectos clínicos e laboratoriais dos pacientes diagnosticados com arboviroses.

Os pesquisadores deverão informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética em Pesquisa solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa, conforme cronograma apresentado, encaminhe a este comitê um sumário dos resultados do projeto, a fim de que seja expedido o certificado de aprovação final.

Prof. Renato C. Zambrotti
Coordenador do CEP-UNIGRANRIO

Andreia Peter Christo
Secretária do CEP/UNIGRANRIO

ANEXO IV: Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) referente à pesquisa proposta.



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Adendo ao Projeto intitulado: **Peptídeos e lipossomas funcionalizados para o desenvolvimento de sistemas de diagnóstico sorológico para Zika vírus**
Pesquisadores Responsáveis: **André Frederico Martins; Raphael Rangel das Chagas; Hury Hellen de Paula e Sergian Vianna Cardozo**

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo ou com um membro da equipe desta pesquisa para esclarecê-los. A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do Estudo

O objetivo geral do estudo é: **Propor o desenvolvimento em laboratório de um teste sorológico, de alta especificidade e sensibilidade, para o diagnóstico de Zika vírus.**

Motivo do adendo: **Inclusão de grupo controle em uma nova vertente do Projeto, que é a avaliação de mediadores químicos inflamatórios de pacientes com arboviroses.**

Duração do Estudo

A duração total do estudo é de 12 meses (02/2018 – 06/2019).

Descrição do Estudo

Este estudo será realizado na **UPA Beira Mar – Hospital Moacir do Carmo/PMDC**

O (a) Senhor (a) foi escolhido (a) a participar do estudo porque foi diagnosticado, pelos seus sinais e sintomas, com suspeita de dengue, Chikungunya, febre amarela ou Zika vírus.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, será realizada a coleta de sangue total (10 - 15 mL) através de venopuntura da veia braquial pelo método a vácuo, após antissepsia com álcool etílico diluído a 70%, colocadas em tubo de ensaio sem anticoagulante e em seguida centrifugado para retirada do soro, de acordo com as diretrizes de coleta sanguínea determinadas pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010). Os resultados dos exames serão disponibilizados à UPA Beira Mar assim que foram processados no laboratório.

Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto

Os riscos associados com a coleta de sangue incluem: dor, hematoma, ou outro desconforto no local de coleta. Raramente desmaio ou infecções no local da punção podem ocorrer. Serão tomados os cuidados cabíveis para minimizar estes riscos.

Você pode experimentar efeitos colaterais que não são conhecidos até o momento ou não foram relatados.

Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante desse estudo. Trata-se de estudo experimental em laboratório que busca um método diagnóstico eficiente para a rápida detecção de Zika vírus em pacientes que apresentam sintomatologia compatível com esta virose.

Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar a na detecção de um teste diagnóstico eficiente para o Zika Vírus.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe médica com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidos a você por escrito. Se você decidir continuar nesse estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento para documentar seu conhecimento sobre novas informações.



Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

Você terá acesso ao profissional responsável pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são os Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo; André Frederico Martins (mestrando); Raphael Rangel das Chagas (mestrando) e Hury Hellen de Paula (mestranda) que poderão ser encontrado no Núcleo de Pesquisa em Doenças Infecciosas da Universidade do Grande Rio (Unigranrio) ou nos respectivos telefones: 21 2672-7714 ou 21 98737-3532.

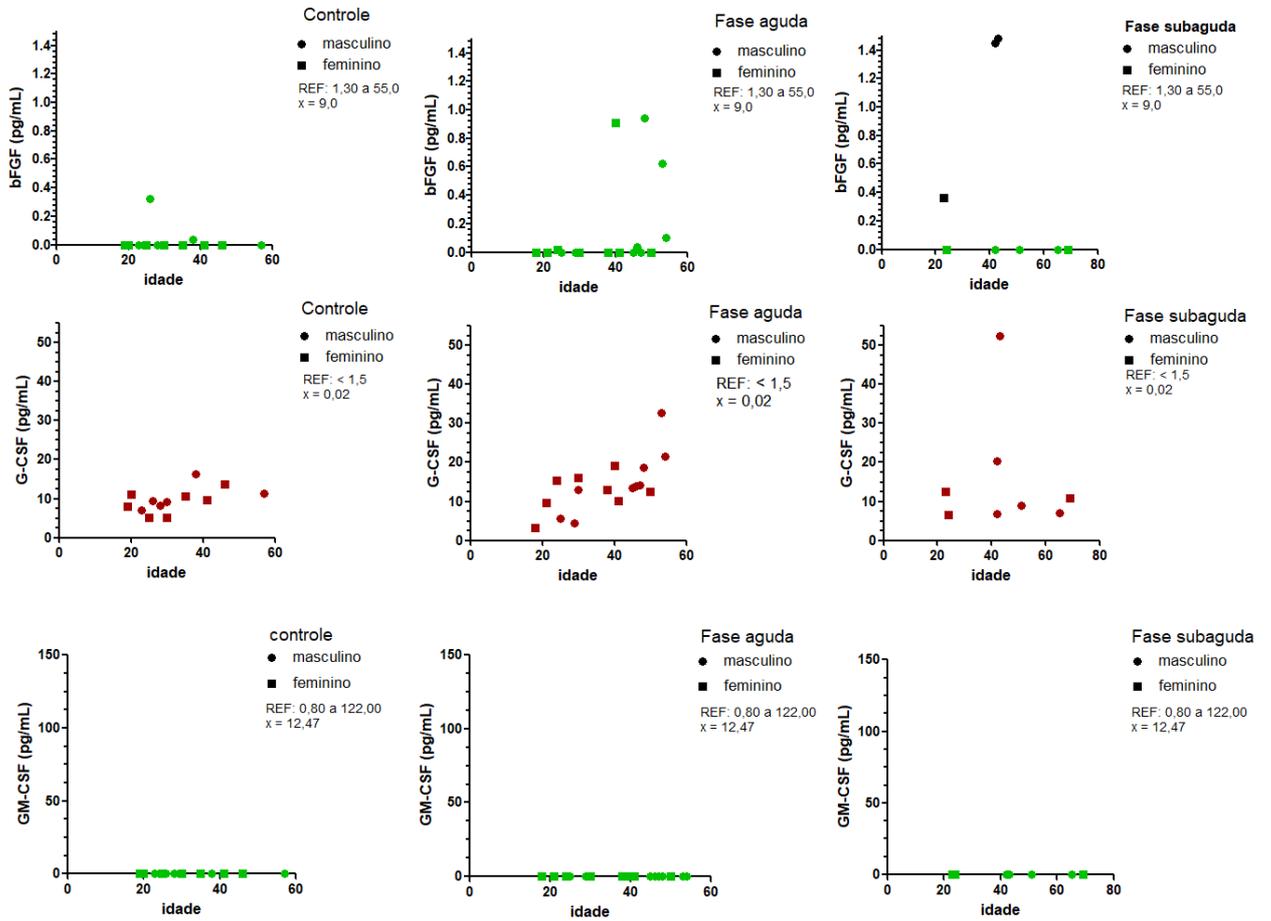
Declaração de Consentimento

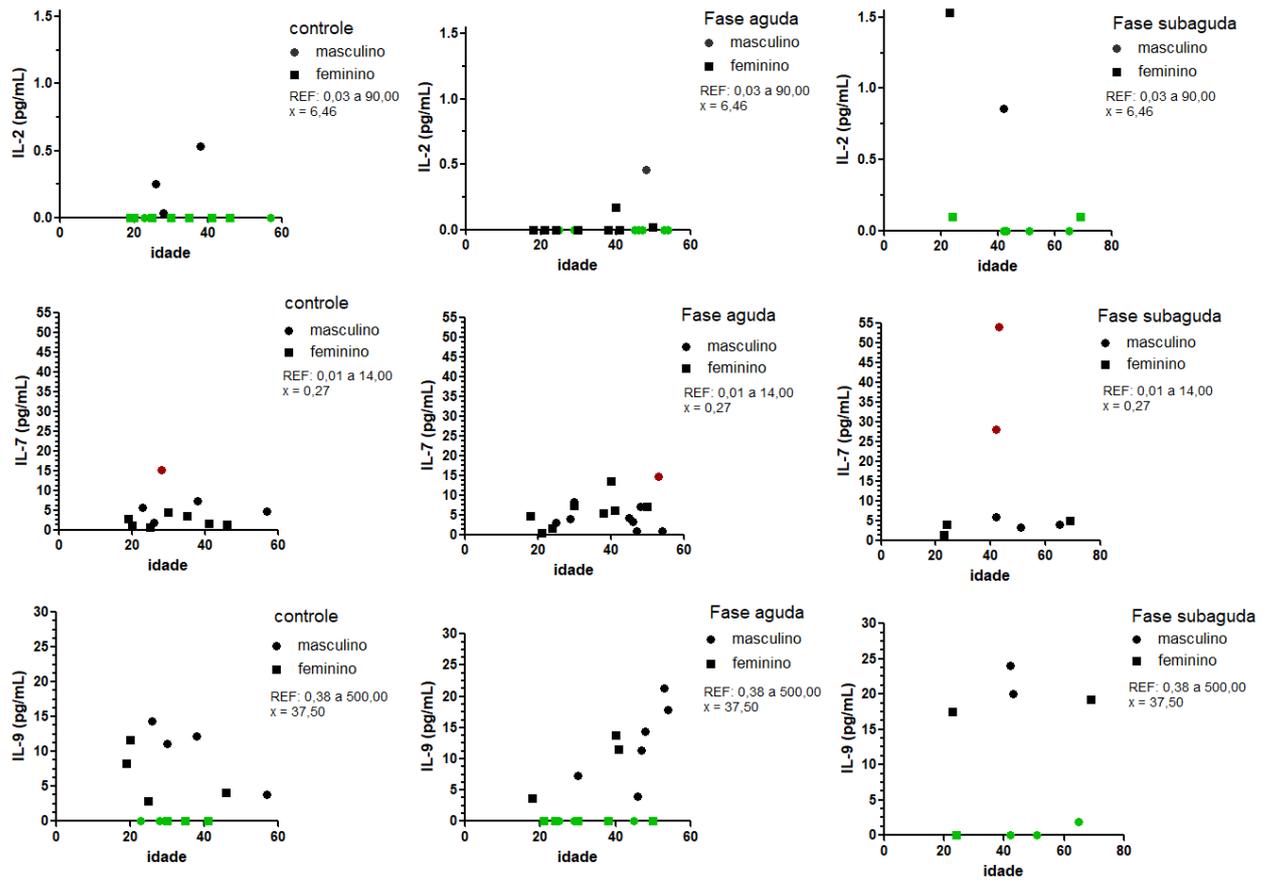
Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

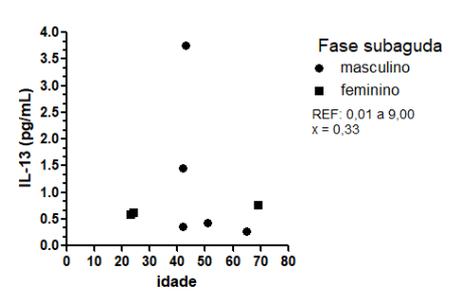
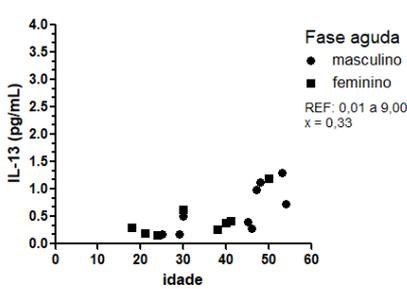
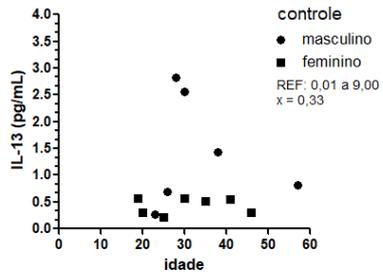
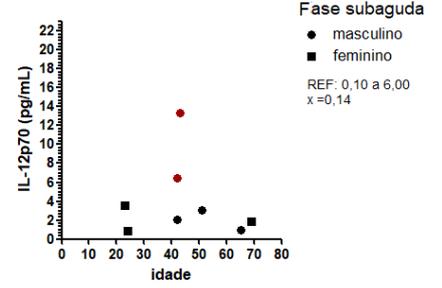
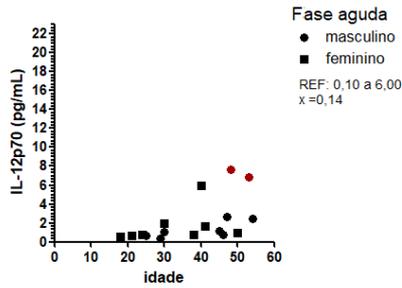
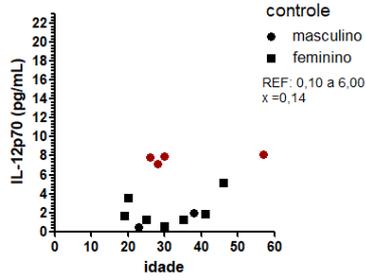
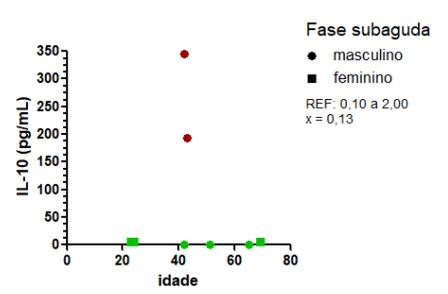
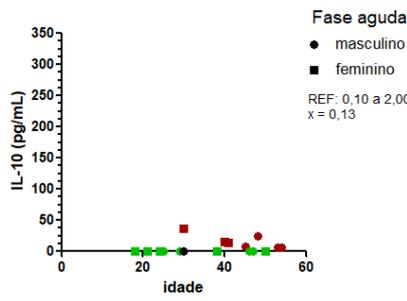
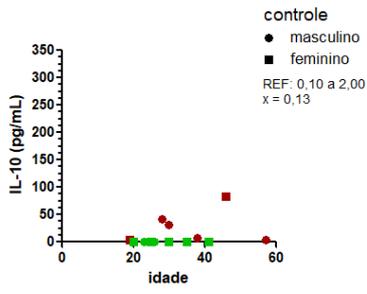
Eu autorizo a coleta de sangue e a utilização dos meus registros médicos (prontuários) pelo pesquisador, em prol desta pesquisa.

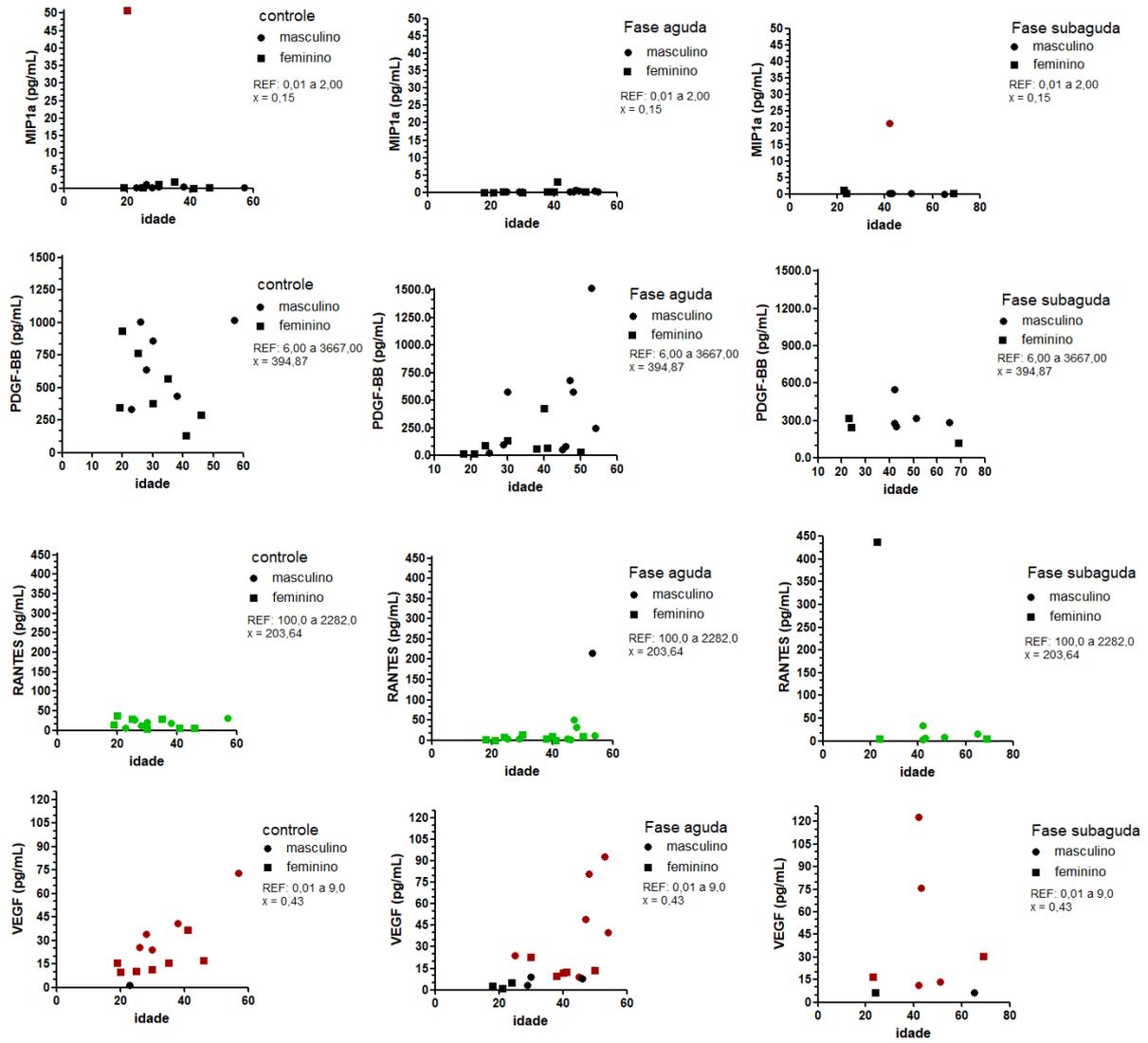
_____	_____
Sujeito de Pesquisa	Data
_____	_____
Representante Legal do Sujeito de Pesquisa	Data
_____	_____
Membro da equipe obtendo o Consentimento	Data
_____	_____
Pesquisador responsável	Data

ANEXO V: Mediadores onde não houve diferença significativa entre os grupos experimental e controle









ANEXO VI: Quadro com resultados encontrados após dosagem de mediadores por Luminex, avaliação clínica dos prontuários, resultados do valor de CT após RT-qPCR e valores dos resultados positivos para anticorpos anti IgG e anti IgM para CHIK.

Amostras	Resultados Luminex para mediadores	Avaliação clínica	Valor do CT / RT-qPCR	
Fase Aguda				
46	eotaxin ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, exantema, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, conjuntivite	20.31	
57	IL-6 ↑, eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia	18.97	
78	eotaxin ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia, edema	18.42	
79	MIP-1β ↓, eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, exantema, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, conjuntivite	17.08	
89	IL-6 ↑, IP10 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia, edema	20.08	
91	eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia, conjuntivite, edema	16.74	
97	MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, exantema, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia	19.35	
106	IL-6 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, exantema, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia, conjuntivite, edema	17.84	
110	MIP-1β ↓, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia, edema	20.46	
116	eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	< febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, conjuntivite	19.62	
120	IL-6 ↑, eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia	18.07	
163	MIP-1β ↓, eotaxin ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	< febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia	21.74	
164	IL-6 ↑, eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia	18.10	
165	MIP-1β ↓, eotaxin ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	< febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia, conjuntivite, edema	18.83	
166	MIP-1β ↓, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	< febre, exantema, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia	22.01	
167	IL-6 ↑, eotaxin ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	< febre, artralgia ++/+++, artrite, conjuntivite, cefaleia	16.27	
180	IL-6 ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	< febre, artralgia ++/+++, artrite, conjuntivite, cefaleia	15.64	
Fase Subaguda				
	Resultados Luminex para mediadores	Avaliação clínica	anti IgG	anti IgM
6	MIP-1β ↓, IP10 ↑	> febre, artralgia ++/+++, artrite, cefaleia	12.861	2.818
51	IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑	< febre, exantema, artralgia +, cefaleia	1.062	0.351
56	IP10 ↑, IL-15 ↑	> febre, mialgia, artralgia +, cefaleia	12.290	1.705
64	(N)	< febre, mialgia, artralgia +	12.369	2.186
98	IL-6 ↑, eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑, IL-17 ↑, IFN-γ ↑, TNF-α ↑, IL-5 ↑, IL-4 ↑, IL-1β ↑, IL-1ra ↑	> febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, edema	2.036	0.475
127	MIP-1β ↓	< febre, exantema, mialgia, artralgia +, cefaleia	12.267	2.481
131	(N)	< febre, exantema, mialgia, artralgia +, cefaleia	12.963	1.852
137	IL-6 ↑, eotaxin ↑, IP10 ↑, MCP-1 ↑, IL-15 ↑, IFN-γ ↑, IL-1β ↑	< febre, mialgia, artralgia ++/+++, artrite, conjuntivite, cefaleia	10.897	1.047