

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**QUIMIOCINAS E CITOCINAS COMO BIOMARCADORES DE ARTRALGIA
CRÔNICA PÓS INFECÇÃO PELO VIRUS CHIKUNGUNYA**

LEILE CAMILA JACOB NASCIMENTO

**Salvador – Bahia
2020**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**QUIMIOCINAS E CITOCINAS COMO BIOMARCADORES DE ARTRALGIA
CRÔNICA PÓS INFECÇÃO PELO VIRUS CHIKUNGUNYA**

LEILE CAMILA JACOB NASCIMENTO

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão Reis
Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme de Sousa Ribeiro

Dissertação apresentada ao Instituto
Gonçalo Moniz como requisito para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa.

**Salvador-Bahia
2020**

"AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELO VIRUS CHIKUNGUNYA EM SALVADOR-BA".

LEILE CAMILA JACOB NASCIMENTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 01 de outubro de 2020.

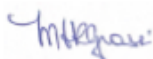
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Antonio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

“Ciência é conhecimento organizado. Sabedoria é vida organizada.”

“Pensamentos sem conteúdo são vazios; intuições sem conceitos são cegas.”

“Sapere aude!”

Immanuel Kant

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus por me dar uma família maravilhosa, que me dá o apoio e incentivo necessário para seguir em frente. Ao meu filho, Ulissinho, ele sem dúvida é minha força motriz. Sou feliz por ter uma família incrível, meu pai Eliel, minhas “mães” Lene e Adina, meu esposo Ulisses, avós Edna e Célia, tios e tias, primos, sogros... agradeço por ter uma família imensa, amorosa e unida porque sem eles não seria possível traçar o meu caminho até aqui.

Quero deixar aqui registrada a minha eterna gratidão ao Dr. Mitermayer por todos os ensinamentos, correções, incentivo e auxílio nas mais adversas situações. Ao Dr. Guilherme Ribeiro pela paciência, orientação, por acreditar no meu trabalho e me proporcionar a oportunidade de fazer parte da equipe de arboviroses todos estes anos. Me sinto feliz e inspirada por trabalhar com pesquisadores do gabarito de vocês.

Ao Dr. Olindo, Dra Caroline Campi, Jordana e aos demais parceiros da Fiocruz-MG que foram de fundamental importância na construção, análises e na qualidade deste trabalho. À coordenação de ensino do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, pelo trabalho e suporte nas questões administrativas, documentos e afins. À todos os professores e professoras do programa de pós graduação pelo excelente trabalho e também à CAPES pela bolsa de estudos neste período. À bibliotecária, Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pela sua colaboração na formatação deste trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) da Fiocruz-BA, por toda ajuda e suporte sempre que precisei e também por me ensinarem o mais genuíno conceito de trabalho em equipe. Ao amigo e administrador do nosso LPBM, Cleiton Carneiro, pela generosidade e trabalho incessante em ajudar o próximo. Agradeço ainda a todos do Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística, famosíssimo NEB, que sempre contribuíram e torceram por mim. Agradeço a Renan Rosa pelo gerenciamento de banco de dados e biorrepositório. Durante esses anos contruí amizades que foram verdadeiros raios de luz no meu caminho (Crislaine Gomes, Daiana Santos, Fernanda McAllister, Maysa Pelizzaro, Moyra Portilho, Raquel Souza). Às minhas amigas e “meninas do laboratório” Patrícia Moreira, Paula Barbosa, Edileuza Passos pela amizade, pelo apoio que me foi dado durante a minha gestação além do suporte técnico durante todo o período do mestrado. Nunca vou esquecer o que vocês fizeram por mim e meu baby. Foram muitas histórias, sorrisos, lutas e conquistas com vocês. Poderia escrever o nome de muitas pessoas aqui, num imenso texto mas saibam que guardo todos no coração. Obrigada!

NASCIMENTO, Leile Camila Jacob. Quimiocinas e citocinas como biomarcadores de artralgia crônica pós infecção pelo vírus Chikungunya. 2020. 74 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Nos últimos anos, o vírus chikungunya (CHIKV) foi responsável por vários surtos em todo o mundo e continua sendo um problema de saúde pública nas Américas e no Brasil. A infecção por CHIKV em humanos pode causar doença leve a moderada caracterizada por febre, erupção cutânea, mialgia e poliartralgia, entretanto, alguns pacientes desenvolvem poliartralgia crônica após infecção por CHIKV que pode durar de meses a anos. Embora seja objeto de vários estudos, a imunopatogênese da infecção pelo CHIKV não é totalmente compreendida. **MÉTODOS:** Este estudo avaliou o perfil de citocinas e quimiocinas séricas de pacientes infectados com CHIKV no estágio inicial da doença em comparação com pacientes com outras doenças febris agudas (OAFD) e controles saudáveis (CS), identificados durante um estudo de vigilância projetado para monitorar infecções por arbovírus entre pacientes com doenças febris agudas entre 2014 e 2016. Os níveis de biomarcadores séricos foram medidos por citometria de fluxo utilizando Cytometric Bead Array (CBA). Os níveis de biomarcadores de pacientes com infecção por CHIKV foram categorizados de acordo com a duração da artralgia (≤ 3 meses vs > 3 meses), diagnóstico concomitante de infecção por vírus da dengue (DENV), de acordo com o status de CHIKV IgM na amostra de fase aguda e número de dias de sintomas na coleta da amostra (1 vs 2-3 vs ≥ 4). O último foi usado como um proxy para a cinética das citocinas durante a fase aguda da doença. **RESULTADOS:** Pacientes com infecção aguda por CHIKV com níveis estatisticamente mais altos de CXCL8, CCL2, CCL9, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-10 em comparação com HC. As quimiocinas CCL2, CCL5, CXCL10 também foram estatisticamente maiores na infecção por CHIKV em comparação com OADF. Os níveis de CXCL8 também foram maiores ($p < 0,05$) em pacientes cuja artralgia durou > 3 meses em comparação com ≤ 3 meses. As análises multivariadas indicaram ainda que CXCL8 e sexo feminino foram associados de forma independente a artralgia com duração > 3 meses. Não foi observada diferença estatística nos níveis de citocinas entre os pacientes CHIKV-positivos em relação à coinfeção por DENV. A detecção do CHIKV por RT-PCR e/ou soroconversão de IgM na amostra de fase aguda foi correlacionada com maior frequência de artralgia maiores níveis de IL-6, CXCL8, CCL2 E CXCL10. Pacientes com CHIKV e OADF apresentaram proxy cinética de citocinas semelhantes para IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-2 e IL-4, embora os níveis estivessem em menor magnitude para pacientes com CHIKV. A análise de assinatura de biomarcadores corroborou com esses achados. **CONCLUSÃO:** De modo geral, foi encontrado um perfil de quimiocinas e citocinas Th1 nos pacientes com CHIKV, independentemente dos dias de sintomas. A caracterização clínica dos pacientes com infecção por CHIKV foi, como esperado, diferencial em relação ao grupo controle com ODFA. Na comparação por dia de início dos sintomas foi observado aumento de biomarcadores pró-inflamatórios já no primeiro dia de sintoma em comparação ao controle com ODFA e CS. Pacientes com artralgia persistente (> 3 meses) apresentaram diferenças nas características clínicas e nos níveis e perfil de biomarcadores. Juntos, esses achados trazem importantes aspectos imunológicos que podem ser úteis como ferramentas para a compreensão da imunopatogênese da infecção por CHIKV.

Palavras-chave: Chikungunya, Quimiocinas, Citocinas, Biomarcadores, Artralgia persistente

NASCIMENTO, Leile Camila Jacob. Chemokines and Cytokines as biomarkers of chronic arthralgia post Chikungunya virus infection. 2020. 74 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: In recent years, chikungunya virus (CHIKV) has been responsible for several outbreaks worldwide, and remains a public health issue in Americas and Brazil. CHIKV infection in humans can cause mild to moderate illness characterized by fever, rash, myalgia and polyarthralgia, however, some patients develop chronic polyarthralgia post CHIKV infection that may last from months to years. Although the subject of various studies, the immunopathogenesis of CHIKV infection is not fully understood. **METHOD:** This study evaluated serum cytokine and chemokine profile of CHIKV-infected patients at the initial stage of the disease compared to patients with other acute febrile diseases (OAFD) and healthy controls (HC), identified during surveillance designed to monitor arboviral infections among acute febrile patients between 2014 and 2016. Serum biomarkers were measured by flow cytometry using Cytometric Bead Array (CBA). Biomarkers levels of patients with CHIKV infection were further categorized according to: duration of arthralgia (≤ 3 months vs >3 months); concomitant diagnostic of dengue virus (DENV) infection; according to CHIKV IgM status at acute-phase sample; and number of days of symptoms at sample collection (1 vs 2-3 vs ≥ 4). The last was used as a proxy for the cytokine kinetics during the acute phase of disease. **RESULTS:** Patients with acute CHIKV infection with statistically higher levels of CXCL8, CCL2, CCL9, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12 and IL-10 as compared to HC. The chemokines CCL2, CCL5 and CXCL10 were also statistically higher in CHIKV infection compared to OADF. CXCL8 levels were also higher ($p < 0.05$) in patients whose arthralgia lasted >3 months compared ≤ 3 months. Multivariable analyses further indicated that CXCL8 and female sex were associated with arthralgia lasting >3 months. No statistical difference in the cytokine levels was observed between CHIKV-positive patients regarding DENV co-infection. The detection of CHIKV by RT-PCR and/or IgM seroconversion in the acute phase sample was correlated with a higher frequency of arthralgia, higher levels of IL-6, CXCL8, CCL2 AND CXCL10. Patients with CHIKV and OADF presented similar cytokine kinetics proxy for IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-2, and IL-4, although the levels were in lower magnitude for CHIKV patients. Biomarker signature analysis further corroborates these findings. **CONCLUSION:** In general, a Th1 profile of chemokines and cytokines was found in patients with CHIKV infection regardless of the days of symptoms. The clinical characterization of patients with CHIKV infection was, as expected, different from the control group with OADF. In the comparison by days of symptoms onset, an increase in pro-inflammatory biomarkers was observed on the first day of symptom compared to control groups with OADF and CS. In patients with persistent arthralgia (> 3 months) were observed differences in clinical characteristics and in the levels and profile of biomarkers. Together, these findings bring important immunological aspects that can be useful as tools for understanding the immunopathogenesis of CHIKV infection.

Keywords: Chikungunya, Chemokines, Cytokines, Serum biomarkers, Persistent arthralgia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	VÍRUS E TRANSMISSÃO	12
2.2	EPIDEMIOLOGIA	13
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	15
2.4	DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA	16
2.5	IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA.....	17
2.6	O PAPEL DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS COMO BIOMARCADORES NA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	23
4.2	LOCAL DO ESTUDO	23
4.3	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	24
4.4	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	24
4.5	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
4.6	DOSAGEM DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS	26
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
4.8	ASPECTOS ÉTICOS.....	28
5	RESULTADOS	29
5.1	MANUSCRITO 1	30
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXOS	72

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIKV	Vírus Chikungunya
CHIKD	Doença Causada pelo Vírus Chikungunya
CCL2	Proteína quimiotática de monócitos 1
CCL5	Proteína secretada e regulada pela ativação de linfócitos T
CCL9	Monocina induzida por interferon gama
CXCL8	Interleucina-8
CXCL10	Proteína induzida por interferon gama
DENV	Vírus Dengue
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ou ensaio de imunoabsorção enzimática
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
LPBM	Laboratório de Patologia e Biologia Molecular
MS	Ministério da Saúde
PAC-pCHIKV	Poliartralgia Crônica Pós Infecção pelo Vírus Chikungunya
PgBSMI	Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
SESAB	Secretaria Estadual de Saúde do Estado da Bahia
TALE	Termo de Assentimento Livre e esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th1	Resposta de Linfócitos T auxiliares (<i>helpers</i>) do tipo 1
Th2	Resposta de Linfócitos T auxiliares (<i>helpers</i>) do tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UESM	Unidade De Emergência De São Marcos
UFBA	Universidade Federal da Bahia
ZIKV	Vírus

1 INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus que pertence ao gênero *Alphavirus*, Família *Togaviridae* e foi identificado pela primeira vez em 1952 na fronteira entre Tanzânia e Moçambique, na África (MASON; HADDOW, 1957). Na língua Makonde, falada em várias regiões da África Oriental, a palavra Chikungunya significa "aquele que se curva", descrevendo a posição que alguns pacientes adquirem durante o período de doença devido à intensa artralgia característica da infecção por este arbovírus (ROUGERON et al., 2015). O termo arbovírus define os vírus zoonóticos, que são transmitidos aos seres humanos e outros animais essencialmente através da picada de mosquitos hematófagos (KUNO; CHANG, 2005). O CHIKV é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em regiões tropicais e subtropicais (BURT et al., 2017) embora outras espécies como *Eretmapodites chrysogaster*, *Culex annulirostris*, *Mansonia uniformis*, *Anopheles stephensi*, e *Opifex fuscus* já tenham sido identificadas como vetores deste arbovírus (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014).

CHIKV é um vírus envelopado de genoma do RNA fita-simples, sentido positivo com aproximadamente 12 KB de comprimento, e possui duas fases abertas de leitura. A primeira compreende as quatro proteínas não estruturais que são responsáveis pela replicação viral dentro do citoplasma da célula hospedeira (ns1-ns4) e o segundo codifica as proteínas estruturais: capsídeo, envelope 1 (E1), envelope 2 (E2), envelope 3 (E3) e 6K (SNYDER et al., 2013).

Em humanos, a infecção por CHIKV pode causar doença febril aguda (CHIKD) que representa uma significativa carga de doença para as populações afetadas. As manifestações clínicas da doença podem incluir artralgia e mialgia intensa que podem se estender por períodos prolongados e causar, em alguns pacientes, limitação de movimentos e consequente incapacidade para o trabalho afetando diretamente a renda familiar e gerando custos adicionais para os sistemas de saúde (CARDONA-OSPINA et al., 2015; HONÓRIO et al., 2015; LIMA MARTINS et al., 2016). Somente até o ano de 2017, foram registrados mais de 2.6 milhões de casos de infecção pelo CHIKV nas Américas (PAHO, 2018). Considerando o alto número de casos reportados e as complicações decorrentes da infecção por CHIKV, o planejamento e ações em saúde pública deve ser uma prioridade para os sistemas de saúde (PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2018).

Embora a investigação da imunopatogênese da CHIKD seja tema de diversos estudos nos últimos anos, a maneira com que fatores clínicos, genéticos e imunológicos contribuem para a persistência da artralgia e manifestações atípicas ainda não está totalmente esclarecida (MATUSALI et al., 2019). A resposta inflamatória ao CHIKV coincide com níveis elevados de mediadores imunológicos além da infiltração de células imunes em articulações infectadas e tecidos adjacentes. Estes eventos podem estar associados tanto à inflamação e cronificação da doença, quanto na eliminação viral e resolução dos sintomas. (SINGH; UNNI, 2011; KULKARNI et al., 2017).

A avaliação do perfil de citocinas, caracterização clínica e informações sobre a evolução da CHIKD em pacientes infectados, contribuem para a identificação de biomarcadores relacionados à progressão da doença e resposta terapêutica. Ademais, a comparação destes achados a estudos de diferentes localidades do mundo, além de contribuir para o entendimento da evolução clínica dos pacientes infectados, pode auxiliar no entendimento dos aspectos imunológicos relacionados à infecção além de fatores associados à artralgia persistente na CHIKD.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VÍRUS E TRANSMISSÃO

O CHIKV tem se tornado um problema de saúde pública em todo o mundo (MUSSO et al., 2018). Nos últimos 15 anos, após décadas de surtos pouco frequentes e esporádicos, o vírus causou grandes epidemias na África, Ásia, Oceano Índico, Caribe, Américas e, mais recentemente, na Europa (POWERS, 2010; PAHO, 2014; DONALISIO et al., 2017; ECDC, 2017; WHO, 2017) .

A infecção em humanos pode causar a CHIKD, que é caracterizada principalmente por febre e artralgia, mas pode vir acompanhada de outras manifestações clínicas, algumas atípicas e graves podendo causar óbitos (QUEYRIAUX et al., 2008; LO PRESTI et al., 2016; BRITO, 2017; BARR; VAIDHYANATHAN, 2019). A maior parte dos óbitos está relacionada à descompensação de comorbidades, embora alguns casos fatais já tenham sido registrados em indivíduos sem comorbidades prévias, demonstrando a gravidade da doença independente de doenças associadas (BRASIL, 2015b; SIMIÃO et al., 2019).

Nos ambientes urbanos e periféricos os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são os responsáveis pelos ciclos de transmissão de CHIKV. Em neonatos a transmissão vertical, seja intrauterina ou durante o parto, pode ser ainda uma forma de transmissão embora seja menos frequente (MISHRA; RATHO, 2006; AZEVEDO et al., 2015; WEAVER; FORRESTER, 2015; CONTOPOULOS-IOANNIDIS et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Em países como o Brasil situados em regiões tropicais e infestados por vetores de arbovírus, principalmente *Aedes spp.*, condições como desmatamento, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas, saneamento básico precário e fornecimento de água inadequado favorecem o contato entre humanos e mosquitos gerando oportunidades mais frequentes de transmissão viral de forma que a emergência e reemergência de arbovírus é um fenômeno esperado no Brasil (LIANG; GAO; GOULD, 2015; RODRIGUES et al., 2016)

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Casos de infecção por CHIKV foram identificados pela primeira vez nas Américas na região do Caribe em 2013 (LEPARC-GOFFART et al., 2014). No Brasil, os primeiros casos foram registrados a partir de junho de 2014 e confirmados pelo Ministério da Saúde (MS) em setembro do mesmo ano (BRASIL, 2014; MOTA et al., 2016), embora estudos mais recentes sugiram que a introdução do CHIKV no Brasil pode ter ocorrido num período anterior a 2014 (SOUZA et al., 2019).

Até o momento, quatro genótipos distintos do CHIKV foram identificados: Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Asiático e Oceano Índico (LEPARC-GOFFART et al., 2014). Os primeiros casos autóctones de CHIKV no Brasil foram confirmado pelo MS em setembro de 2014 no município de Oiapoque, estado do Amapá. No mesmo mês, 7 dias depois, casos também foram registrados na cidade de Feira de Santana, estado da Bahia (BRASIL, 2014; NUNES et al., 2015b). Em Salvador, os primeiros casos foram confirmados pouco mais de um mês depois, em outubro de 2014 (BAHIA, 2014). Estudos do genoma viral encontrado nas amostras de pacientes identificaram o genótipo asiático circulando no estado do Amapá, região norte do Brasil, e genótipo ECSA na Bahia e outros estados da região nordeste e sudeste (NUNES et al., 2015b; TEIXEIRA et al., 2015; FARIA et al., 2016; SOUZA et al., 2019). De setembro a dezembro de 2014 foram notificados pelo MS 3.657 casos autóctones suspeitos de infecção por CHIKV nos estados do Amapá, Bahia, Roraima e Distrito Federal e destes, 2.772 foram confirmados (BRASIL, 2015). Do total de casos suspeitos registrados pelo MS em todo Brasil no ano de 2014, 1898 (51%) foram na Bahia, já os dados da Secretaria Estadual de Saúde da Bahia (SESAB) relataram 2073 casos suspeitos notificados no estado neste mesmo ano, demonstrando o impacto na saúde pública para o estado (BAHIA, 2014; BRASIL, 2015b). Essa divergência poderia ser explicada pela subnotificação de casos suspeitos a nível federal e a fragilidade do sistema de vigilância no momento da epidemia. Tanto no estado da Bahia, quanto na cidade de Salvador, apesar dos primeiros casos terem sido confirmados em setembro e outubro de 2014, respectivamente, o maior número de casos no estado ocorreu segunda metade de 2015 e durante o ano de 2016 (CARDOSO et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018; SALVADOR, 2018).

Em 2017 e 2018 foi observada uma queda no número de casos notificados à SESAB, no entanto em 2019 o número de casos voltou a aumentar, chegando a 134% em relação ao ano de 2018. Em 2020, até a semana epidemiológica 30 (29/12/2019 a 25/07/2020), já foram notificados 29.762 casos, o que representa um aumento quase 3 vezes no número de casos

quando comparado com o todo o ano de 2019 (BAHIA, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020).

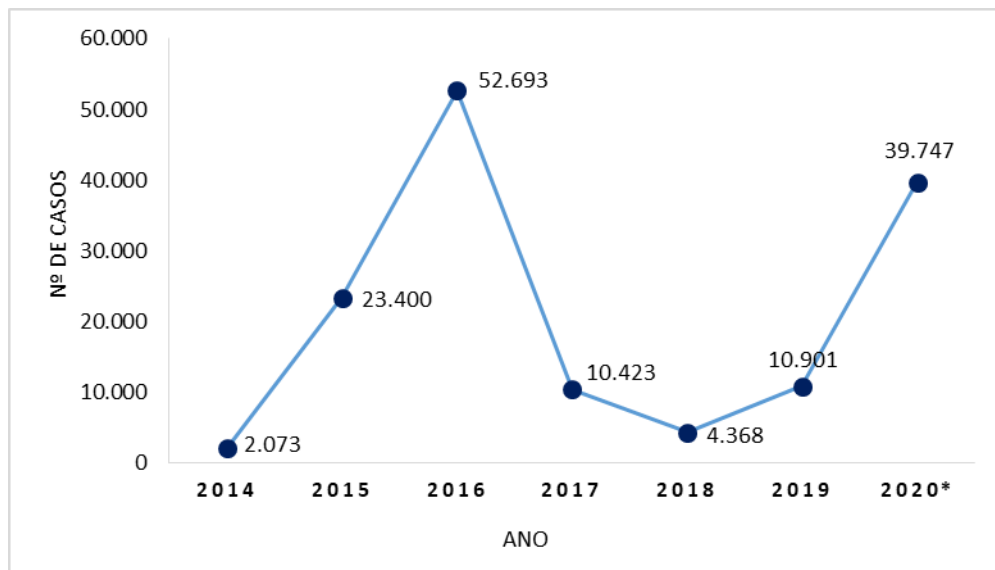


Figura 1 - Número de Casos Suspeitos de CHIKV notificados pela Secretaria de Saúde do Estado da Bahia de 2014 a 2020 (* Até a semana epidemiológica 38).

Alguns fatores como susceptibilidade da população, competição vetorial e o cenário epidemiológico de co-circulação de outros arbovírus como Dengue (DENV) e Zika (ZIKV) poderiam explicar porque o número de casos de CHIKV vem oscilando ao longo dos anos (NUCKOLS et al., 2015; CHAVES et al., 2018). Além disso, os arbovírus possuem como característica ondas de transmissão ao longo dos anos e, portanto, embora a transmissão continue a níveis basais, surtos podem acometer periodicamente a população (FARIA et al., 2016).

2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Após a infecção, os indivíduos podem apresentar um quadro clínico assintomático ou sintomático. As taxas de infecção assintomática pelo CHIKV mostraram incidências variando de 3% a 47% e casos sintomáticos de 53 a 97%, dependendo da área geográfica do estudo, do tempo de coleta das amostras, e dos critérios usados para definir a infecção pelo CHIKV (APPASSAKIJ et al., 2013, 2020; STAPLES, E.J; HILLS, 2016).

Os indivíduos com quadro clínico sintomático são classificados em três fases: aguda, sub-aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por poliartralgia bilateral intensa, edema nas articulações, mialgia, febre, cefaléia, fadiga e exantema que podem durar cerca de 10 dias. A fase sub-aguda é definida pela ausência de febre e persistência das dores articulares após o período da fase aguda e pode durar até 3 meses após a infecção. A fase crônica se caracteriza por poliartralgia persistente observada a partir de três meses pós infecção por CHIKV (PAC-pCHIKV) (SISSOKO et al., 2009; BRASIL, 2015b; MANIERO et al., 2016).

Em um estudo realizado por Rodriguez-Moralez *et al* (2015) utilizando modelo estatístico a partir de dados de estudos observacionais estimou que 47,6% dos indivíduos que se infectarem com CHIKV na América Latina desenvolverão PAC-pCHIKV. A depender do cenário epidemiológico e local de estudo foi observado que a prevalência de manifestações articulares crônicas pode variar entre 14.4% a 87.2%. Essa variabilidade pode também ser decorrente de questões metodológicas como tamanho amostral, duração do acompanhamento, medidas de avaliação da cronificação da artralgia e métodos de coleta de dados (MARQUES et al., 2017a).

As manifestações crônicas observadas em pacientes infectados pelo CHIKV podem permanecer por períodos de meses até anos e provocar, além de artralgia, outros transtornos ao longo do tempo, como prostração, desordem do sono, depressão, distúrbio de memória e concentração (GOUPIL; MORES, 2016; LAGOS-GALLEGO et al., 2018). Por exemplo, um estudo de coorte prospectiva realizado durante 3 anos com pacientes com e sem PAC-pCHIKV observou uma frequência de depressão em 56% dos participantes acompanhados com doença crônica e em 6% dos que não cronificaram (SCHILTE et al., 2013).

Em alguns casos, a infecção por CHIKV pode causar manifestações clínicas graves e óbitos, especialmente em pacientes com comorbidades, crianças e idosos (BRITO, 2017). Vale destacar ainda os quadros clínicos considerados atípicos com manifestações neurológicas, renais, cardíacas, dermatológicas e oculares como: Síndrome de Guillain-Barré; encefalites; paralisia flácida; neuropatias; miocardites; insuficiência renal aguda; retinite;

iridociclite; extantema vesico-bolhoso; edema facial; úlceras na mucosa oral; petéquias; gengivorragias entre outras (ECONOMOPOULOU et al., 2009; RAJAPAKSE, 2010; AZEVEDO et al., 2015).

A infecção por CHIKV em mulheres grávidas no primeiro e segundo trimestres pode causar parto pré-maturo, porém, em sua maioria, sem sequelas para o neonato. Já infecções recentes nas mães, por volta de 7 dias antes do parto, podem causar nos recém nascidos quadros de febre, fraqueza, queda de plaquetas e, em alguns casos pode causar sequelas graves para as crianças tais como: hipertrofia miocárdica, disfunção ventricular, pericardite, encefalopatias entre outras manifestações (RAMFUL et al., 2007; GÉRARDIN et al., 2008; WILMER VILLAMIL-GÓMEZ et al., 2015; LYRA et al., 2016).

2.4 DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA

O diagnóstico de infecção por CHIKV é baseado em critérios clínicos, dados epidemiológicos e sorológicos na maioria dos casos, além da análise a nível molecular, quando disponível. Ensaio Imunoenzimático (ELISAs) podem confirmar a presença de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV no soro de pacientes. Anticorpos IgM são encontrados cerca de 4 a 7 dias após o início dos sintomas e podem permanecer na corrente sanguínea do paciente por cerca de 2 meses, já os anticorpos IgG podem ser detectados entre uma a duas semanas após o início dos sintomas e, após esse período podem ser detectáveis por toda a vida do indivíduo (MARQUES et al., 2017a). Neste contexto, o ELISA exerce importante contribuição no diagnóstico tanto na fase aguda da doença quanto na fase convalescente.

Por outro lado, a biologia molecular é aplicada ao diagnóstico na fase aguda, apenas em amostras de pacientes coletadas até 7 dias após o início dos sintomas, que compreende o período médio de viremia do CHIKV variando entre 1 a 12 dias em alguns casos. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa (RT-PCR) é a mais utilizada neste cenário sendo um método fundamental para a detecção de material genético do CHIKV e, adicionalmente, seus produtos podem ser utilizados para genotipagem viral permitindo ainda comparações e análises filogenéticas (BRASIL, 2015; CABRAL-CASTRO et al., 2016; WHO, 2017).

2.5 IMUNOPATOGÊNESE DA INFECCÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA

Em humanos, a partir da picada de um mosquito infectado, o CHIKV pode causar uma infecção a nível local infectando células suscetíveis na pele, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. O CHIKV também pode ser inoculado diretamente em capilares subcutâneos e disseminados pela corrente sanguínea (BERNARD et al., 2015; GASQUE et al., 2015, 2016).

Diversos fatores tem sido descritos para a adesão e entrada do CHIKV em células humanas. Entre os fatores centrais estão a ligação de proteínas da superfície do vírus a receptores celulares, endocitose mediada por clatrina e macropinocitose (VAN DUIJL- RICHTER et al., 2015).

Os principais receptores celulares descritos associados à adesão do CHIKV são as glicosaminoglicanas (GAGs). As GAGs são grandes moléculas complexas de carboidratos e parte essencial da matriz extracelular e são amplamente expressas na superfície de diversos tipos celulares de mamíferos. A adesão do CHIKV pode ocorrer por ligação das proteínas virais E1 e E2 às GAGs, que por estar presente na superfície de vários tipos celulares amplia a capacidade de infecção do CHIKV a diferentes tecidos. Entretanto, as GAGs não são necessariamente as únicas proteínas necessárias para a entrada e replicação viral nas células. Os domínios mucina e imunoglobulina 1 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain – TIM-1*) são também expressos em diversos tipos celulares e tem sido demonstrado como um receptor para múltiplos vírus, incluindo alfavírus. O CHIKV pode portanto utilizar TIM-1 como fator de adesão mas não como um fator específico para entrada em células. Os detalhes de como os alfavírus, incluindo CHIKV, entram nas células-alvo não estão totalmente esclarecidos, o que sugere que diversas vias podem ser utilizadas pelo CHIKV para facilitar a sua entrada em células. (SCHNIERLE, 2019)

A replicação viral e manifestações cutâneas a nível local parecem ser limitadas e de curta duração. Manifestações cutâneas incluindo erupção eritematosa maculopapular ou morbiforme, costumam desaparecer após cinco a sete dias (KUMAR et al., 2017). Logo após à inoculação, o CHIKV entra em contato com componentes da resposta imune inata como monócitos e macrófagos e em seguida é transportado para órgãos linfóides secundários próximos ao local da inoculação. A partir de então o CHIKV é disseminado via circulação

sanguínea permitindo seu avanço para vários sítios de replicação (GASQUE et al., 2016; GUERRERO-ARGUERO et al., 2020).

As partículas virais do CHIKV são transportadas na corrente sanguínea para os órgãos-alvo como vírions livres ou em monócitos infectados. Os sítios mais comuns de replicação do CHIKV são pele, órgãos linfóides, e principalmente, os tecidos onde ocorrem os sintomas mais relevantes da doença como músculo e articulações periféricas, podendo acometer cérebro, rins, coração e fígado em casos mais graves (Figura 2) (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012; SILVA; DERMODY, 2017). Nestes órgãos, a infecção está associada a uma infiltração acentuada de células mononucleares, incluindo macrófagos, particularmente quando ocorre replicação viral. Os eventos patológicos associados à infecção tecidual do CHIKV nos músculos e articulações estão associadas às intensas dores características das manifestações clínicas da infecção pelo CHIKV. Já nos demais órgãos, as manifestações são em geral subclínicas, caracterizada por apoptose de hepatócitos e adenopatias (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012).

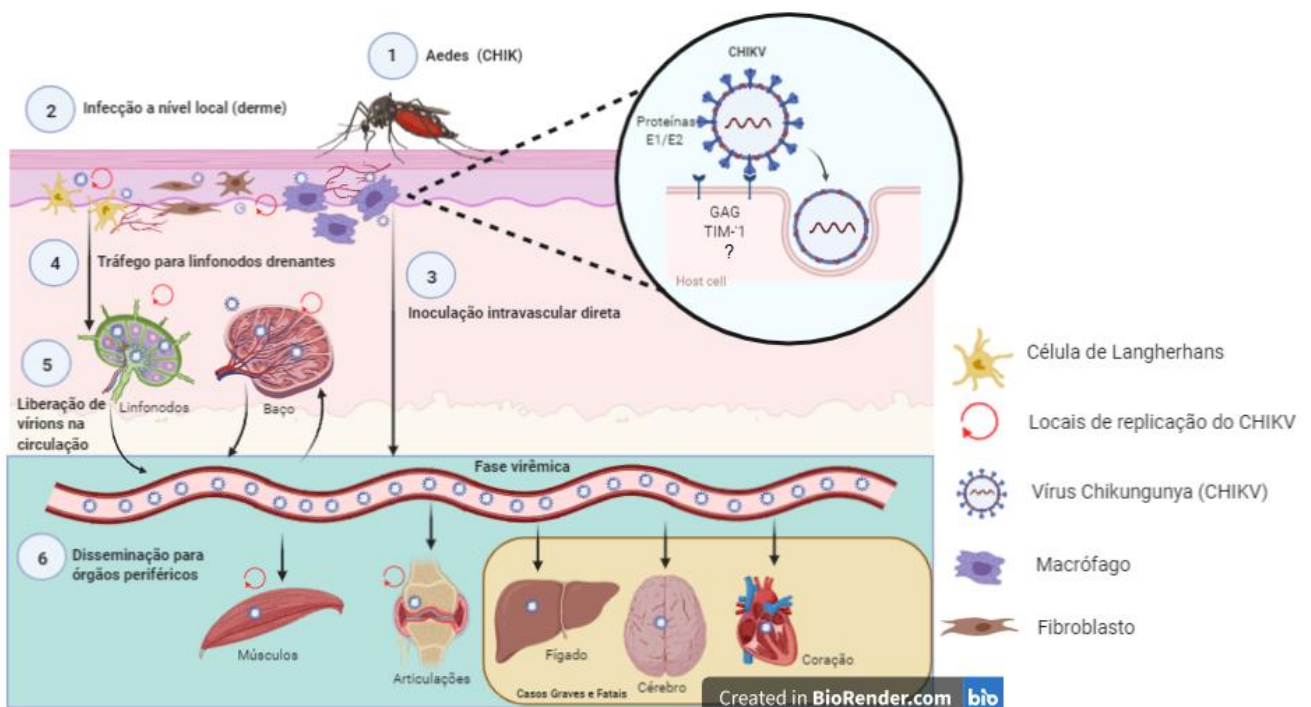


Figura 2 - Patogênese da infecção pelo CHIKV: disseminação viral para células e órgãos-alvo e receptores envolvidos na adesão celular. (1) A infecção pelo CHIKV ocorre através da picada de um mosquito infectado, resultando em (2) fase de infecção dérmica. O CHIKV se liga principalmente à glicosaminoglicanas (GAGs) e domínios mucina e imunoglobulina 1 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain* – TIM-1) presentes nas células residentes da pele que são infectadas permitindo nas rodadas iniciais de replicação, outros receptores podem estar envolvidos. (3) A inoculação direta do vírus na circulação também pode ocorrer através de picadas de mosquito. (4) Posteriormente, o vírus se espalha para a drenagem dos linfonodos, onde se replica antes de ser (5) liberado na circulação. (6) Em seguida, CHIKV é disseminado para órgãos periféricos, como o baço e os músculos, onde ocorrem mais ciclos de replicação. A figura é adaptada de (LUM; NG, 2015; GASQUE et al., 2016; SCHNIERLE, 2019)

A fase aguda da CHIKD é caracterizada por elevada carga viral detectável no sangue nos primeiros dias de sintomas, ativação da resposta imune inata, aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de células T e *Natural Killers* (NK) (CHOW et al., 2011a). A resposta imune inata é seguida pela ativação da resposta imune adaptativa mediada por linfócitos B e T, a geração subsequente de células de memória leva a uma resposta específica à infecção viral e protege contra a reinfeção (TANABE et al., 2018).

Nos indivíduos que evoluem para fase crônica, monócitos, células T e células NK podem ser ativadas e atraídas para as articulações inflamadas meses após a infecção aguda (HAWMAN et al., 2013; DEEBA et al., 2016). Acredita-se que esses sintomas sejam decorrentes do escape precoce do CHIKV do interior dos monócitos e de sua relocação nos macrófagos sinoviais (HAWMAN et al., 2016). A infecção de macrófagos nas articulações está associada à inflamação local e à produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Além disto, a fagocitose de corpos apoptóticos de células infectadas pode contribuir para a persistência viral. Essa hipótese tem sido reforçada pela observação da presença do CHIKV por tempo prolongado em “santuários”, protegidos do sistema imune e provocando uma resposta inflamatória crônica em tecidos musculares, hepático, linfóide e principalmente articulares (OZDEN et al., 2007; CHUA et al., 2010; DE ARAUJO EYER-SILVA et al., 2016; GASQUE et al., 2016; KRUTIKOV; MANSON, 2016; SÁ et al., 2017).

Os achados descritos no parágrafo anterior, sugerem que o CHIKV pode manter a infecção no hospedeiro mesmo após uma resposta imune adaptativa robusta e que pode escapar ao sistema imune sem viremia detectável na corrente sanguínea dos pacientes. Curiosamente, altos níveis de anticorpos IgG contra CHIKV e citocinas pró-inflamatórias são encontradas em pacientes com PAC-pCHIKV (NG et al., 2009; KELVIN et al., 2011). Entretanto, é importante salientar que a correlação entre a inflamação articular e um estado de ativação sistêmica, como demonstrado pela presença de marcadores de inflamação no plasma, como por exemplo citocinas e quimiocinas, ainda permanece incerta. Não está claro se a artralgia crônica decorrente da infecção pelo CHIKV é devido à presença viral em articulações e tecidos, se estes eventos são decorrentes da resposta imune do hospedeiro à infecção ou da associação desses eventos. De forma que a fisiopatologia da CHIKD e grande parte da interação molecular entre vírus e hospedeiro necessita ainda ser melhor compreendida (CASTRO et al., 2016).

2.6 O PAPEL DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS COMO BIOMARCADORES NA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA

O quadro de cronificação da artralgia decorrente da infecção por CHIKV é debilitante e impacta diretamente na qualidade de vida e rotina dos indivíduos. As dores causadas pela PAC-pCHIKV podem limitar ou até impedir completamente as atividades laborais e conseqüentemente afetar a renda familiar. Além da poliartralgia persistente, alguns podem ainda desenvolver depressão, distúrbios de memória e concentração (BHATIA; GAUTAM; JHANJEE, 2015; LIMA MARTINS et al., 2016; LAGOS-GALLEGO et al., 2018).

Embora a etiologia da PAC-pCHIKV não esteja completamente elucidada, é sabido que níveis elevados de viremia e tipo de resposta imune do hospedeiro ao CHIKV durante a fase aguda pode determinar aumento de citocinas pró-inflamatórias associadas à gravidade da doença (SIMARMATA et al., 2016). Estudos sugerem que a persistência da artralgia pode estar associada à desregulação da inflamação tanto na fase aguda quanto na fase convalescente, com diminuição de citocinas Th2 e aumento das citocinas Th1 em pacientes com sintomas persistentes (HOARAU et al., 2010; CHOW et al., 2011a).

O primeiro estudo realizado avaliando citocinas como biomarcadores foi realizado em 2009, por NG e colaboradores em Cingapura. Neste estudo foram observados níveis plasmáticos de IL-1 β e IL-6 aumentados e níveis reduzidos de proteína secretada e regulada pela ativação de linfócitos T (CCL5) associados com gravidade de CHIKD, definida no estudo como temperatura $>38,5^{\circ}\text{C}$ ou frequência de pulso >100 batimentos por minuto ou contagem de plaquetas $<100 \times 10^9/\text{L}$. Níveis elevados de IL-1 β e IL-6 e foram associados á febre alta nos casos graves, além disso, o aumento da produção de IL-1 β também pode mediar o desenvolvimento de artralgia abrupta e persistente, uma vez que esta citocina está envolvida na imunopatogênese de artropatias, como a artrite reumatoide. Por outro lado, os níveis da quimiocina CCL5 foram significativamente reduzidos em pacientes com CHIKD grave. Uma das definições desse estudo para classificação de casos graves foi trombocitopenia e, como as plaquetas são um importante reservatório da RANTES na circulação periférica, isso poderia explicar os baixos níveis encontrados desta quimiocina nos pacientes graves (NG et al., 2009).

Estudos posteriores também demonstram níveis elevados de IL-6, IL-1 β , CCL9, CXCL10, CCL2, e CCL3 na fase aguda da doença, parecem estar associados à PACpCHIKV (CHAAITHANYA et al., 2011; KELVIN et al., 2011; LOHACHANAKUL et al., 2012).

Desde então diversos estudos para avaliação da resposta imune ao CHIKV foram realizados em diferentes países na Ásia e Europa. Em 2015, um estudo de revisão sistemática analisou pela primeira vez os perfis de mediadores imunes em pacientes com CHIKD de 14 coortes realizadas entre 2007 e 2010 em diferentes localidades. A comparação dos níveis de mediadores imunológicos em pacientes infectados com CHIKV positivos para PCR com controles saudáveis demonstrou níveis significativamente elevados de diversas citocinas (IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-1Ra, IL-4 e IL-10), quimiocinas (CXCL10, CCL2, CCL9, CCL3) e do fator de crescimento básico de fibroblastos (FGF- β) (TENG et al., 2015).

Mais recentemente, um estudo de Chang e colaboradores (2018), identificou que uma resposta robusta de citocinas durante a infecção pelo CHIKV estava associada à diminuição da incidência PAC-pCHIK e que baixos níveis TNF- α , IL-13, IL-2 e IL-4 durante a infecção aguda foram marcadores de dor articular crônica. Esses dados sugerem que uma resposta robusta de citocinas é necessária para a eliminação viral e que as citocinas relacionadas à tolerância imunológica durante a infecção aguda podem ser protetoras para a patogênese da PAC-pCHIK. Por outro lado, uma resposta antiviral ineficiente devido a alterações nas funções de células do sistema imune pode levar a uma incapacidade do hospedeiro de erradicar o patógeno e pode ser uma possível explicação para persistência do CHIKV e/ou artralgia crônica (AMARAL et al., 2019).

Apesar de existirem diversos estudos avaliando o perfil de citocinas em pacientes infectados pelo CHIKV, para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a realizar estudos na cidade de Salvador com amostras clínicas bem caracterizadas de uma população de indivíduos com elevado grau de miscigenação racial.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar perfis de quimiocinas e citocinas na fase aguda da doença em pacientes infectados pelo vírus Chikungunya que possam estar associados ao desenvolvimento de artralgia persistente (por um período maior que 3 meses).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o perfil de citocinas e quimiocinas no de soro de pacientes infectados por CHIKV em comparação a outras doenças febris agudas.
2. Identificar biomarcadores de cronificação da artralgia no soro de pacientes na fase aguda de infecção por CHIKV.
3. Verificar se existe diferença nos níveis séricos de quimiocinas, citocinas e na frequência de manifestações clínicas dos pacientes na fase aguda de infecção por CHIKV de acordo com:
 - Diagnóstico laboratorial concomitante de DENV
 - Presença de anticorpos IgM contra CHIKV na amostra de fase aguda
 - Dias de sintomas

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente trabalho é um estudo de corte transversal em pacientes com confirmação laboratorial de infecção por CHIKV atendidos na Unidade de Emergência de São Marcos (UESM) e recrutados para o estudo de vigilância no período de 2014 a 2016.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas amostras de pacientes previamente coletadas e armazenadas em biorrepositório com confirmação laboratorial de infecção por CHIKV identificados durante um estudo de vigilância estabelecido na UESM na cidade de Salvador, projetado para monitorar infecções por arbovirais entre pacientes febris agudos.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

Durante 2014 a 2016 nossa equipe de pesquisa conduziu um estudo de vigilância para doenças febris agudas na UESM, no bairro de Pau da Lima, Salvador-Ba. Em colaboração com a direção da unidade, foi criada uma infra-estrutura de pesquisa no local para o estudo clínico-epidemiológico de doenças febris agudas, em especial arbovírus. Foram incluídos neste estudo pacientes atendidos nesta unidade de saúde que apresentaram febre até 7 dias antes da data de atendimento e tinham idade maior ou igual a 6 meses. Após a compreensão e assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) ou TALE (Termo de Assentimento Livre e esclarecido) e, no caso de menores de idade, a autorização dos pais ou responsáveis os foi realizada coleta de sangue e entrevista para obtenção de dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e sintomatológicos. Todas as entrevistas realizadas foram inseridas em banco de dados digital *Research Electronic Data Capture* (REDCap).

Os participantes do estudo eram convidados a realizar uma segunda coleta de sangue entre 15 a 40 dias após a primeira coleta. As amostras de sangue dos pacientes foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM), onde foi realizada a aliquotagem do soro e armazenamento em -70°C até o momento da análise laboratorial. Todas as amostras coletadas, com volume de soro suficiente foram submetidas a realização de testes de biologia molecular (extração de RNA e RT-PCR convencional para detecção dos vírus CHIKV, DENV e ZIKV) e ensaio imunoenzimáticos (ELISA) para

diagnóstico de infecções por DENV e CHIKV. Não foram realizados testes sorológicos para diagnóstico de ZIKV devido à baixa precisão dos testes disponíveis (L'HUILLIER et al., 2017; KIKUTI et al., 2018). Os pacientes que tiveram diagnóstico confirmado de infecção por CHIKV (por ELISA e/ou RT-PCR), foram seguidos por contato telefônico no período entre 2014 e 2016. Nestes contatos telefônicos foram coletados dados sobre a duração da artralgia.

4.3 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

As amostras coletadas neste projeto foram submetidas à diagnóstico molecular e sorológico para DENV, ZIKV e CHIKV. O diagnóstico molecular foi realizado no Laboratório de Virologia da Universidade Federal da Bahia, onde foram executadas as etapas de extração de RNA, RT-PCR convencional, eletroforese e fotodocumentação dos resultados. O RNA viral foi extraído a partir do soro dos pacientes armazenado em freezer -80°C, utilizando o kit comercial Maxwell® 16 Total RNA Purification kit (Promega, Wisconsin, USA) ou kit comercial QIAmp® Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Os ciclos de desnaturação, anelamento e extensão em termocicladores para cada um dos vírus foram realizados de acordo com protocolos específicos amplamente utilizados no diagnóstico de DENV, ZIKV, e CHIKV (LANCIOTTI et al., 1992; EDWARDS et al., 2007; BALM et al., 2012). Os produtos obtidos das reações foram submetidos a corrida em gel de agarose a 2% em Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X sob 120V por 1 hora aproximadamente. Ao final da corrida, o gel foi corado em brometo de etídio. A visualização das bandas e comparação ao padrão de 100 pares de bases foi realizada em fotodocumentador Transiluminador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia, Brasil) sob luz UV.

4.4 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

O diagnóstico sorológico baseado na detecção de anticorpos IgM específicos para CHIKV e DENV foi realizado no LPBM entre 2014 a 2016 a partir de amostras de soro na fase aguda e convalescente, armazenadas em freezer -20°C, utilizando os kits CHIKjj Detect™ IgM ELISA (InBios International, Seattle, WA) e Dengue IgM Capture ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Austrália) respectivamente, de acordo com as especificações

do fabricante. Além disso, para a detecção de antígeno NS1 específico para DENV foi utilizado o kit Dengue Early ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Austrália).

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para fazer parte do estudo de avaliação do perfil de citocinas e quimiocinas, foram selecionados participantes recrutados para o estudo de vigilância no período de 2014 a 2016, com informações em banco de dados, diagnóstico laboratorial de infecção por CHIKV confirmado por RT-PCR e/ou ELISA (seja detecção de anticorpos IgM contra CHIKV na amostra aguda ou soroconversão de anticorpos IgM CHIKV) e que, após a realização dos testes diagnósticos, ainda tinham amostra de fase aguda disponível em biorrepositório armazenadas em freezer -80°C para a realização de dosagem de citocinas. Além do grupo de indivíduos positivos para CHIKV, foram selecionados como controle e de forma randomizada, 81 amostras de pacientes também com disponibilidade em biorrepositório mas com outras doenças febris agudas que não arboviroses (testadas e negativas em todos os testes descritos no item 4.3 e 4.4). (Figura 3)

Pacientes que não preencheram os critérios acima descritos ou que recusaram a participação no estudo conforme aspectos éticos (conforme item 4.9) não foram incluídos no estudo.

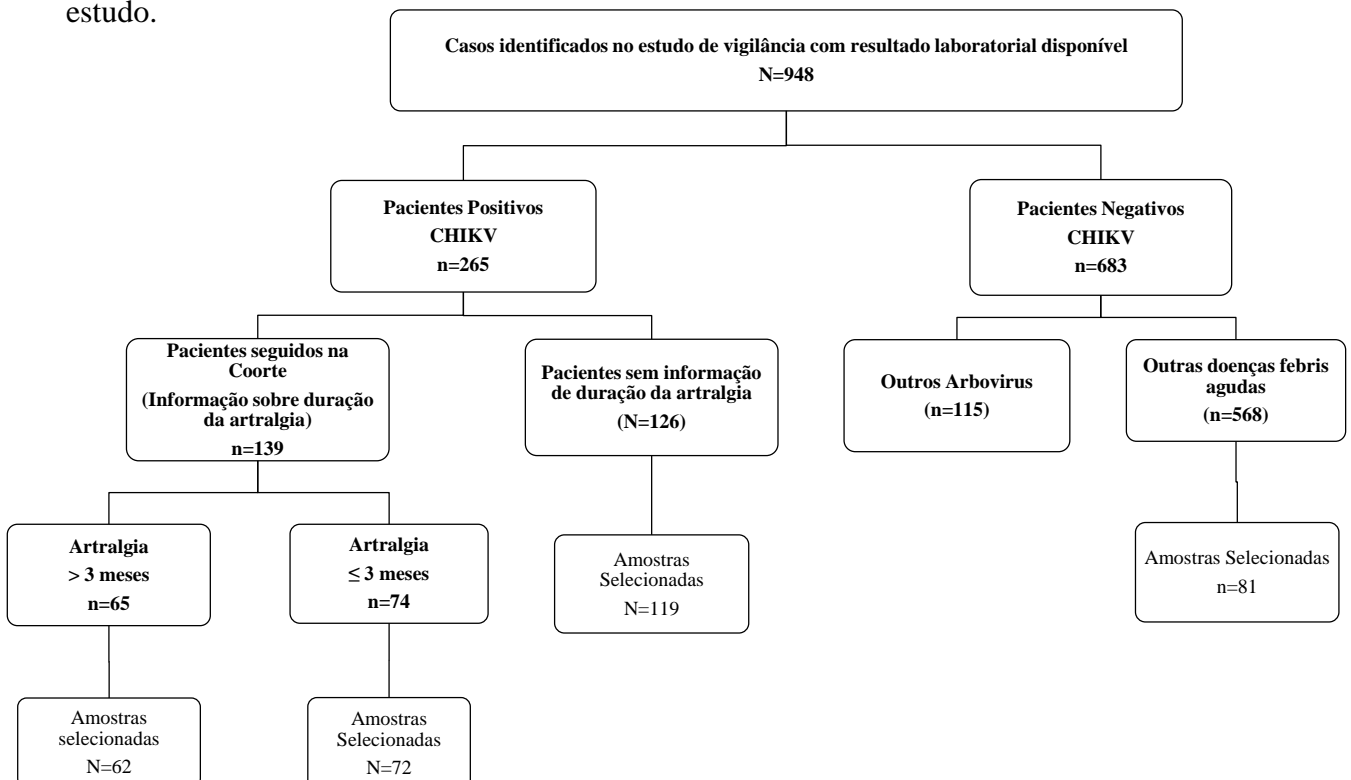


Figura 3 - População do estudo e número de casos selecionados que preencheram os critérios de inclusão

4.6 DOSAGEM DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Os níveis de diferentes citocinas e quimiocinas foram obtidos entre 2018 e 2019 a partir de amostras de soro dos pacientes com infecção por CHIKV, bem como de outros grupos controle: pacientes com outras doenças febris agudas que não arboviroses e controles saudáveis. Todas as amostras selecionadas foram submetidas a dosagem citocinas e quimiocinas por Citometria de Fluxo no equipamento BD FACSAria™ utilizando BD Cytometric Bead Array™ Human Th1, Th2, Th17 kit, Human Inflammatory Cytokine Kit e Human Chemokine Kit de acordo com as especificações do fabricante. Ao todo foram obtidas os níveis de 14 citocinas e quimiocinas: IL-1B, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8/CXCL8, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IP-10/CXCL10, MCP-1/CCL2, MIG, RANTES/CCL5, Interferon gama (INF- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Os mediadores séricos IL-6, IL-8, TNF e IL-10 se repetem entre os kits. Como critério de decisão para a utilização nas análises selecionamos o valor obtido do kit que foi mais sensível.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para descrever o perfil geral de quimiocinas e citocinas em pacientes infectados por CHIKV comparado aos controles conforme objetivo específico 1, foi realizada uma análise comparativa geral do perfil de citocinas e quimiocinas utilizando três grupos:

- **Pacientes com diagnóstico de infecção por CHIKV** – amostras obtidas de pacientes infectados por CHIKV confirmadas através dos métodos descritos no tópico 3.5.
- **Controles de pacientes outras doenças debrís agudas (ODFA)** - amostras obtidas de pacientes que foram testadas e foram negativas para infecções por DENV, ZIKV e CHIKV pelos métodos descritos nos tópicos 4.3 e 4.4.
- **Controle de indivíduos saudáveis** – amostras obtidas de indivíduos saudáveis sem histórico de infecção prévia pelo CHIKV, e que não apresentavam nenhum sinal ou sintoma no momento da coleta de sangue. Todas as amostras dos indivíduos controle foram testadas e negativas pelo ensaio qRT-PCR para detecção de CHIKV (SANTIAGO et al., 2018), ELISA IgM DENV (Panbio Diagnostics, Brisbane, Austrália) IgM e IgG CHIKV (Euroimmun, Lubeck, Alemanha).

Para avaliação do perfil e biomarcadores de artralgia persistente conforme objetivo específico 2, os pacientes infectados por CHIKV foram estratificados em pacientes com artralgia por um período menor ou igual a 3 meses e com artralgia por mais de 3 meses. Para avaliação dos grupos descritos foram realizadas as seguintes análises:

- Perfil de quimiocinas e citocinas comparando as médias dos níveis de citocinas entre os grupos testes e controles, utilizando-se o limite inferior e superior do intervalo de confiança 95% como faixa cinza nos gráficos.
- Análises de assinatura de quimiocinas e citocinas de forma a buscar possíveis biomarcadores entre os grupos. Nesta análise o valor da média de biomarcadores por grupo teste foi transformado em valores categóricos utilizando como ponto de corte para cada citocina ou quimiocina a média + 2 duas vezes o desvio padrão dos controles saudáveis. Posteriormente foram calculados quantos indivíduos em cada grupo apresentavam valores acima e abaixo deste ponto de corte. As quimiocinas e/ou citocinas que apresentaram 50% das observações acima do ponto de corte foram submetidos a análise em Diagrama de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) para obtenção do gráfico de biomarcadores exclusivos e/ou comuns de cada grupo.

Para avaliar o perfil de quimiocinas e citocinas e de acordo com o objetivo específico 3, os grupos de pacientes infectados por CHIKV e de pacientes com ODFA foram adicionalmente subdivididos e comparados de acordo com a quantidade de dias de sintomas autorreferido que os mesmos apresentavam no momento da coleta de sangue (1 dia de sintomas, 2 a 3 dias de sintomas e ≥ 4 dias de sintomas). Ainda para atender o objetivo específico 3, foram realizadas análises de perfil de quimiocinas e citocinas em pacientes com RT-PCR negativo e presença de anticorpos IgM para CHIKV na amostra de fase aguda e pacientes com RT-PCR positivo na amostra aguda e/ou soroconversão de IgM e pacientes com diagnóstico adicional de infecção por DENV.

Para verificar diferenças na frequência de manifestações clínicas dos pacientes na fase aguda de infecção por CHIKV (objetivo específico 2 e 3), os indivíduos foram estratificados de acordo com o diagnóstico e a presença de diferentes sinais e sintomas clínicos. Foi utilizado teste de Kruskal Wallis para comparação de variáveis quantitativas entre grupos (Idade, dias de sintomas, etc) e qui quadrado para análise de variáveis categóricas de presença ou ausência de determinado sinal ou sintoma entre os grupos (artralgia, cefaleia, exantema etc). Em seguida, foi calculada a frequência com que as quimiocinas e citocinas estavam

presentes em cada grupo utilizando como significância o valor de $P < 0,05$. Indivíduos sem informação para alguma variável foram excluídos da análise.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto “Marcadores imunológicos durante infecções causadas por arbovírus” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM) em 14/11/2018 (CAAE: 90874818.5.0000.0040) como ementa do projeto de vigilância “Teste Rápido para Diagnóstico da Dengue: Avaliação Prospectiva do Desempenho e do Impacto no Manejo Clínico da Doença” (CAAE: 17840813.0.0000.0040) de 31/10/2013.

Como condição da aprovação do projeto, foi exigida a realização do re consentimento via telefone para todos os pacientes que se pretendia avaliar os níveis de biomarcadores imunológicos.

Para a realização das ligações, foram criados um protocolo de abordagem e um questionário de roteiro de contato (Anexo 1 e 2). As ligações foram realizadas em três rodadas em dias diferentes. Caso não fosse possível entrar em contato com o participante por algum motivo (número ocupado, participante ausente, número incorreto ou desativado etc), era realizada uma segunda tentativa e terceira tentativa, caso não fosse possível o contato. Se após três tentativas não conseguíssemos falar com o participante, a amostra era considerada aprovada para uso, de modo que as amostras só foram excluídas para a testagem caso o paciente fosse contatado e recusasse a participação.

Todas as amostras positivas para arbovírus que foram elegíveis após re consentimento de participantes e possuíam volume suficiente em biorrepositório foram retiradas para testagem. Para este trabalho serão consideradas para análises apenas pacientes com confirmação laboratorial de infecção por CHIKV (n=253) e as amostras de pacientes com outras doenças febris agudas, testados e negativos para os testes realizados no item anterior (n=81).

5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram contemplados no artigo intitulado “**Chemokine and Cytokine Profile in Patients with Acute Chikungunya Virus Infection and its Association with Duration of Arthralgia**” (página 29), que será submetido para publicação em periódico internacional.

5.1 MANUSCRITO I

**Chemokine and Cytokine Profile in Patients with Acute Chikungunya Virus Infection
and its Association with Duration of Arthralgia**

Leile Camila Jacob-Nascimento¹, Caroline Xavier Carvalho², Monaíse Madalena Oliveira Silva¹, Mariana Kikuti^{1,6}, Rosângela Oliveira Anjos¹, Jordana Rodrigues Barbosa Fradico³, Ana Carolina Campi-Azevedo³, Laura Beatriz Tauro⁴, Gúbio Soares Campos⁵, Patricia Sousa dos Santos Moreira¹, Moyra Machado Portilho¹, Olindo Assis Martins-Filho⁵, Guilherme Sousa Ribeiro^{1,6}, Mitermayer Galvão dos Reis^{1, 6, 7*}

¹Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil.

²Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

³Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil.

⁴Instituto Nacional de Medicina Tropical, CONICET, Puerto Iguazú, Argentina

⁵Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

⁶Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

⁷Yale School of Public Health, Yale University, CT, USA

*** Corresponding Author**

Laboratory of Pathology and Molecular Biology, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ-Bahia. Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Brazil. 40.296-710. Tel: (71)3176-2200. miter@bahia.fiocruz.br

ABSTRACT

Although the subject of various studies, the immunopathogenesis of chikungunya virus (CHIKV) infection is not fully understood. Serum chemokine and cytokine profile of CHIKV-infected patients at the initial stage of the disease were compared to patients with other acute febrile diseases (OAFD) and healthy controls (HC). Serum biomarkers were measured by flow Cytometric Bead Array. Patients with CHIKV infection were further categorized according to duration of arthralgia (≤ 3 months *vs* >3 months), presence of dengue virus (DENV) co-infection, according to anti-CHIKV IgM status at acute phase sample and number of days of symptoms at sample collection (1 *vs* 2-3 *vs* ≥ 4). The last was used as a proxy for the cytokine kinetics during the acute phase of the disease. Patients with acute CHIKV infection with statistically higher levels of CXCL8, CCL2, CCL9, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12 and IL-10 as compared to HC. CCL2, CCL5, and CXCL10 were also statistically higher in CHIKV infection compared to OADF. CXCL8 levels were also higher ($p < 0.05$) in patients whose arthralgia lasted > 3 months compared ≤ 3 months. Multivariable analyses further indicated that CXCL8 and female sex were associated with arthralgia lasting >3 months. No statistical difference in the cytokine levels was observed between CHIKV-positive patients regarding DENV co-infection. Patients with CHIKV and OADF presented similar cytokine kinetics proxy for IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-2, and IL-4, although the levels were in lower magnitude for CHIKV patients. Biomarker signature analysis further corroborates these findings. This study suggests that chemokines may have an important role in the immunopathogenesis of persistent arthralgia post CHIKV infection, although further studies are needed to confirm this hypothesis. Together, these findings bring about important immunological aspects that may be useful as tools for further understanding the immunopathogenesis of CHIKV infection.

Keywords: Chikungunya, chemokines, cytokines, serum biomarkers, persistent arthralgia

INTRODUCTION

In the last decade, chikungunya virus (CHIKV) has caused several outbreaks worldwide and became a serious public health issue in the South and Central Americas, mainly in Brazil (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017; VAIRO et al., 2019). The first autochthonous cases of CHIKV infection in Brazil were reported in September 2014, in the city of Oiapoque, and in the city of Feira de Santana, States of Amapá and Bahia, respectively (BRASIL, 2014; NUNES et al., 2015a; TEIXEIRA et al., 2015). The first case in Salvador, the capital of Bahia, was confirmed a month later (BAHIA, 2014).

CHIKV infection in humans may cause mild to moderate febrile disease (CHIKD). The acute phase of the disease is characterized by fever, rash, headache, myalgia, and intense polyarthralgia, affecting patients during 1-2 weeks after the onset of symptoms. Some individuals can progress to a chronic phase, characterized by intense polyarthralgia for more than months post-onset of symptoms and which can last for years (MCCARTHY; DAVENPORT; MORRISON, 2018).

Chronic arthralgia post-CHIKV infection also can lead to limitation of movements, incapacity for work, and even depression, directly affecting household incomes and representing a significant disease burden for affected populations (HONÓRIO et al., 2015; LIMA MARTINS et al., 2016). Therefore, it is necessary to elucidate the mechanisms for which the disease caused by CHIKV progresses to chronic articular pain in some patients to prevent this outcome.

Studies to determine the mechanisms of arthropathy associated with CHIKV infection have highlighted the role of the immune system in the pathogenesis of the disease (MOSTAFAVI et al., 2019). Previous studies have been described that a robust cytokine innate immune response can control CHIKV infection and protect against the chronic arthropathy as well as pro-inflammatory cytokines are involved in- and assigned as biomarkers of persistent arthralgia (CARPENTIER; MORRISON, 2018; AMARAL et al., 2019; POH; CHAN; NG, 2020).

The goal of the present study was to investigate the chemokine and cytokine profile in patients with acute CHIKV infection and its association with clinical and demographical features. Besides, the study intended to characterize the timeline kinetics of serum chemokines and cytokines and verify whether there are specific associations of serum biomarkers with the duration of arthralgia.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Study Design

This is a cross-sectional study carried out as part of a surveillance investigation designed to monitor arboviral infections among acute febrile patients at an emergency health center in Salvador, BA, Brazil, between September 2014 and July 2016. In this surveillance were included patients older than 6 months that presented fever until 7 days before the date of attendance, and consent to be part of this study. We performed blood collection and interviewed the patients to obtain demographic, epidemiological, and clinical data. All interviews were entered into a Research Electronic Data Capture (REDCap) digital database (HARRIS et al., 2009). Acute-phase samples (1 to 7 days after symptoms onset) and convalescent-phase (15-40 days after symptoms onset) blood samples were collected and freeze (-80°C and -20°C respectively) until analysis. Telephone follow-up was employed as from 3 months after recruitment (2014-2017) on surveillance study for all CHIKV positive patients to obtain self-reported data from disease evolution and duration of the arthralgia.

Samples were tested for molecular diagnosis of CHIKV, DENV, and ZIKV conventional RT-PCR according to specific protocols widely used in the diagnosis of arboviruses (LANCIOTTI et al., 1992; EDWARDS et al., 2007; BALM et al., 2012). The viral RNA was extracted from the patients' samples using Maxwell® 16 Total RNA Purification kit (Promega, Wisconsin, USA) or QIAmp® Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) assays according to the manufacturer's specifications.

The detection of specific IgM antibodies anti-CHIKV and DENV was performed using the CHIKjj Detect™ IgM ELISA kits (InBios International, Seattle, WA) and Dengue IgM Capture ELISA (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) respectively, according to the manufacturer's specifications. DENV-specific NS1 antigen was also accessed using Dengue Early ELISA kit (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia). We did not employ a ZIKV serological assay due to the low accuracy of the available tests (L'HUILLIER et al., 2017; KIKUTI et al., 2018).

During the surveillance, we enrolled 948 acute febrile illness patients with at least 1 sample available for laboratory testing. Among them, 265 (28%) had RT-PCR and/or IgM positive for CHIKV. Of the 683 CHIKV negative patients, 115 (12%) were positive for other arboviruses (DENV or ZIKV) and 568 (60%) had other acute febrile diseases without evidence of arboviral infection (OAFD). Data is more detailed described in our previous study (SILVA et al., 2019). Of the 265 CHIKV-infected patients, 12 were not submitted to cytokine and chemokine measurements due to the absence of serum in a biorepository -80°C.

Thus, the present investigation comprises 253 CHIKV positive patients that, after diagnostic tests, still had -80°C acute-phase samples available in biorepository for chemokine and cytokine profile evaluation. Based on the clinical and laboratorial records, the CHIKV group was further categorized into subgroups to evaluate duration of the arthralgia, presence of CHIKV IgM antibodies on acute sample, concomitant DENV diagnosis and days post symptoms onset (DPSO) at the blood collection date.

For duration of arthralgia analysis data were obtained via telephone contact and it was not possible to obtain this information for all patients, of the 253 patients with CHIKV infection in the study, only 134 had this data referred as Arthralgia \leq 3months (n=72) vs Arthralgia $>$ 3 months (n=62). Concomitant DENV diagnosis status based on method previous described patients were referred as: DENV(-) (n=176) vs DENV(+), (77). For CHIKV IgM status analysis, groups were defined by CHIKV RT-PCR negative and IgM positive on acute-phase samples (CHIKVIgM+) (n=81) and CHIKV IgM negative defined by RT-PCR positive and/or IgM seroconversion (CHIKVIgM-) (n=172). Based on the self-reported DPSO at the time of inclusion, patients were stratified into three subgroups as they presented 1, 2-3, or \geq 4 DPSO referred as D1, D2-3 and D \geq 4, respectively as a proxy of cytokine kinetics.

A group of patients with OAFD that were negative for all laboratory tests performed, as previously described, was also selected as a control group (n=81) as well as healthy individuals control (HC) (n=15). HC subjects samples were tested and negative by CHIKV qRT-PCR Assay (SANTIAGO et al., 2018), ELISA IgM DENV (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) IgM and IgG CHIKV (Euroimmun, Lubeck, Germany).

This study was approved by the Research Ethics Committee of Research Center Gonçalo Moniz - Oswaldo Cruz Foundation-Bahia (CAAE: 90874818.5.0000.0040)

Serum biomarkers measurement

Serum cytokines and chemokines concentrations of selected patients were measured by flow cytometry, using commercially available BD Cytometric Bead Array™ (CBA) kits. Human Th1, Th2, Th17, Human Inflammatory Cytokine and Human Chemokine (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) kits were used according to the manufacturer's instructions using BD FACSArray™ equipment (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A total of 14 serum biomarkers were analyzed: CXCL8, CCL9, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, INF- γ , IL-17, IL-2, IL-4 and IL-10. Data were analyzed using FCAP Array version 3.0 (BD Biosciences, USA) and the results were expressed in pg/mL for chemokines and in mean fluorescence intensity (MFI) for cytokines due to the low sensitivity detected in these last immunological markers in CBA tests.

Statistical analysis

One-way ANOVA followed by Tuckey test or Kruskal Wallis followed by Dunns Test were used for multiple comparisons amongst subgroups. Student t-Test or Mann-Whitney Test were used for comparison between two groups. Chi-square test was used for comparative analysis of categorical variables.

Among patients who had information for duration of arthralgia, additional comparisons of chemokine and cytokine concentrations were performed using univariate Poisson regression. Variables that were significant to $P < 0.20$, and variables for clinical characteristics which may influence patient outcome such as age, gender, and days of symptoms, were entered into a backward stepwise selection multivariable Poisson regression model. Results were expressed as 95% Confidence Interval (IC 95%) and risk ratio (RR) for arthralgia > 3 months development.

Biomarker signature analysis was carried out by converting the chemokine and cytokine measurements from continuous variables (pg/mL or MIF, respectively) into categorical variables indicating whether the biomarker levels were above the reference range cut-off (mean \pm 2 standard deviations of HC). Then, they were reported as the proportion (%) of subjects presenting each biomarker level above the reference range cut-off. Venn diagram analysis (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) was carried out to identify common and selective biomarkers between CHIKV positive patients group compared to OADF control and its subgroups.

Data were analyzed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) and STATA software version 13 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). In all cases, significance was considered at $p < 0.05$.

Graphics were prepared using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) and Excel 2007 for Windows (Microsoft, USA).

RESULTS

Participant's characteristics

No difference in age and sex was observed between CHIKV and OAFD groups, but concerning clinical features, CHIKV-positive patients presented significantly higher frequency of myalgia, arthralgia (including polyarthralgia and symmetric arthralgia) and swollen joints ($p < 0.05$). Patients with OAFD presented a higher frequency of cough and sore throat. These patients were also more delayed to present for care, with a median of 3 days of symptoms and interquartile range (IQR) of 2 to 4 days, compared to 2 days (IQR 1–3) for patients with CHIKV diagnosis ($p < 0.05$).

About OAFD patients' specific diagnosis, no record was registered in medical files but clinical suspicion. Therefore, of the 81 patients with OADF, 45% (37/81) had registered clinical suspicion, 38% (14/37) of arboviruses (DENV, ZIKV and CHIKV), 29% (11/37) unspecified viruses, 24% (9/37) respiratory infections, 3% (1/37) hernia, 3% (1/37) gastroenteritis and 3% (1/37) urinary tract infection.

Patients that had arthralgia for >3 months were older (39 [IQR 32-49]) and a higher percentage (68%) was female ($p < 0.05$) compared to 34 (IQR 23 - 42) and 44%, respectively. Patients that had arthralgia for >3 months also presented significantly higher frequency of swollen joints, symmetric arthralgia, and diarrhea at the acute phase of CHIKD compared with those that had a full recovery after 3 months.

In CHIKVIgM- group, the median of DPSO was 1 (IQR 1-3), significantly lower than the CHIKVIgM+ group that presented 4 days (IQR-2-6). CHIKVIgM+ patients had a higher frequency ($P > 0.02$) of rash (46%), cough (51%), sore throat (48%), and diarrhea (25%) compared to 25%, 16%, 27%, 17%, and 13% respectively for CHIKVIgM- group. Interestingly, arthralgia was significantly more frequent ($P > 0.01$) in CHIKVIgM- (94%) than CHIKVIgM+ patients (75%).

No statistical differences were observed in clinical characteristics when we evaluated DENV status (*Supplementary data -Table 1*).

A detailed description of demographical features and clinical records of the study population are provided in Table 1.

Table 1. Clinical characterization of patients with Chikungunya Virus infection, Brazil, 2014-2016

Characteristics	CHIKV (n=253)		OAFD (n=81)		p values	CHIKV Subgroups			
	% (numerator/denominator)	p values	Duration of Arthralgia * ≤ 3 months (n=72)	Duration of Arthralgia * > 3 months (n=62)		p values	CHIKV IgM Status		p values
							IgM (-) (n=172)	IgM (+) (n=81)	
Female sex	51 (128/253)	51 (41/81)	44 (32/72)	68 (42/62)	<0.01	51 (88/172)	49 (40/81)	0.06	
Age (years)	34 (22 - 44)	30 (14 - 50)	34 (23 - 42)	39 (32-49)	<0.01	32 (20 - 43.5)	35 (25-46)	0.18	
Days post symptoms onset	2 (1-3)	3 (2-4)	2 (1-3)	2 (1-4)	0.30	1 (1-3)	4 (2-6)	<0.01	
Myalgia	92 (234/253)	83 (67/81)	93 (161/172)	90 (73/81)	0.55	93 (161/172)	90 (73/81)	0.32	
Arthralgia	88 (224/253)	63 (51/81)	94 (163/172)	95 (59/62)	0.28	94 (163/172)	75 (61/81)	<0.01	
Polyarthralgia*	81 (205/253)	49 (40/81)	85 (61/72)	90 (56/62)	0.33	87 (150/172)	67 (55/81)	<0.01	
Symmetric Arthralgia**	82 (207/253)	58 (47/81)	81 (58/72)	95 (59/62)	<0.01	86 (148/172)	72 (59/81)	0.01	
Headache	92 (234/253)	94 (76/81)	94 (68/72)	92 (57/62)	0.68	92 (159/171)	92 (75/81)	0.96	
Retro-orbital pain	70 (176/252)	71 (57/80)	71 (51/72)	77 (48/62)	0.81	70 (120/172)	69 (56/81)	0.86	
Swollen Joints	41 (105/253)	13 (11/81)	33 (24/72)	58 (36/62)	<0.01	43 (74/172)	38 (21/81)	0.47	
Rash	32 (81/253)	33 (27/81)	22 (16/71)	38 (23/62)	0.85	25 (43/172)	46 (38/81)	<0.01	
Conjunctival Hyperemia	48 (98/204)	35 (14/40)	55 (32/58)	50 (26/52)	0.13	50 (78/155)	40 (20/49)	0.24	
Cough	34 (89/253)	62 (51/81)	34 (25/72)	32 (20/62)	0.76	27 (47/172)	51 (42/81)	<0.01	
Sore throat	27 (69/253)	54 (44/81)	23 (17/72)	24 (15/62)	<0.01	17 (30/172)	48 (39/81)	<0.01	
Diarrhea	17 (44/253)	26 (21/81)	10 (7/72)	22 (14/62)	0.09	13 (23/172)	25 (21/81)	0.01	
Nauseas/Vomiting	23 (59/253)	27 (21/80)	18 (13/71)	26 (16/62)	0.60	23 (40/172)	23 (19/81)	0.56	

CHIKV = patients with acute CHIKV infection detected by IgM ELISA and/or RT-PCR for CHIKV; OAFD = patients with other acute febrile disease with negative by IgM ELISA and RT-PCR for CHIKV, DENV and ZIKV; * > 1 joint involved; ** At least one pair of joints with arthralgia; CHIKV IgM (+) status was defined by positive CHIKV IgM ELISA and negative RT-PCR for CHIKV; CHIKV IgM (-) status was defined by positive RT-PCR for CHIKV and/or CHIKV IgM seroconversion. Significant difference between groups or subgroups at p<0.05 by Chi-square are highlighted by underline format. * Data obtained via telephone contact. It was not possible to obtain this information for all patients, of the 253 patients with CHIKV infection in the study, only 134 had this data.

Chemokines and cytokines profile in acute CHIKV infection

Serum levels of chemokines and cytokines observed in acute CHIKV compared to OADF patients are shown in Figure 1. The results showed that CHIKV patients group had almost all chemokines and cytokines evaluated with higher levels compared to the HC group, except for TNF, IFN- γ , IL-17, IL-2, and IL-4. Chemokines CCL2, CCL5, and CXCL10 were statistically higher while biomarkers CCL9, IL-1 β , IL-12, TNF, IFN- γ , IL-17, IL-2 and IL-4 were statistically lower in CHIKV group as compared to OADF control group. (Figure 1).

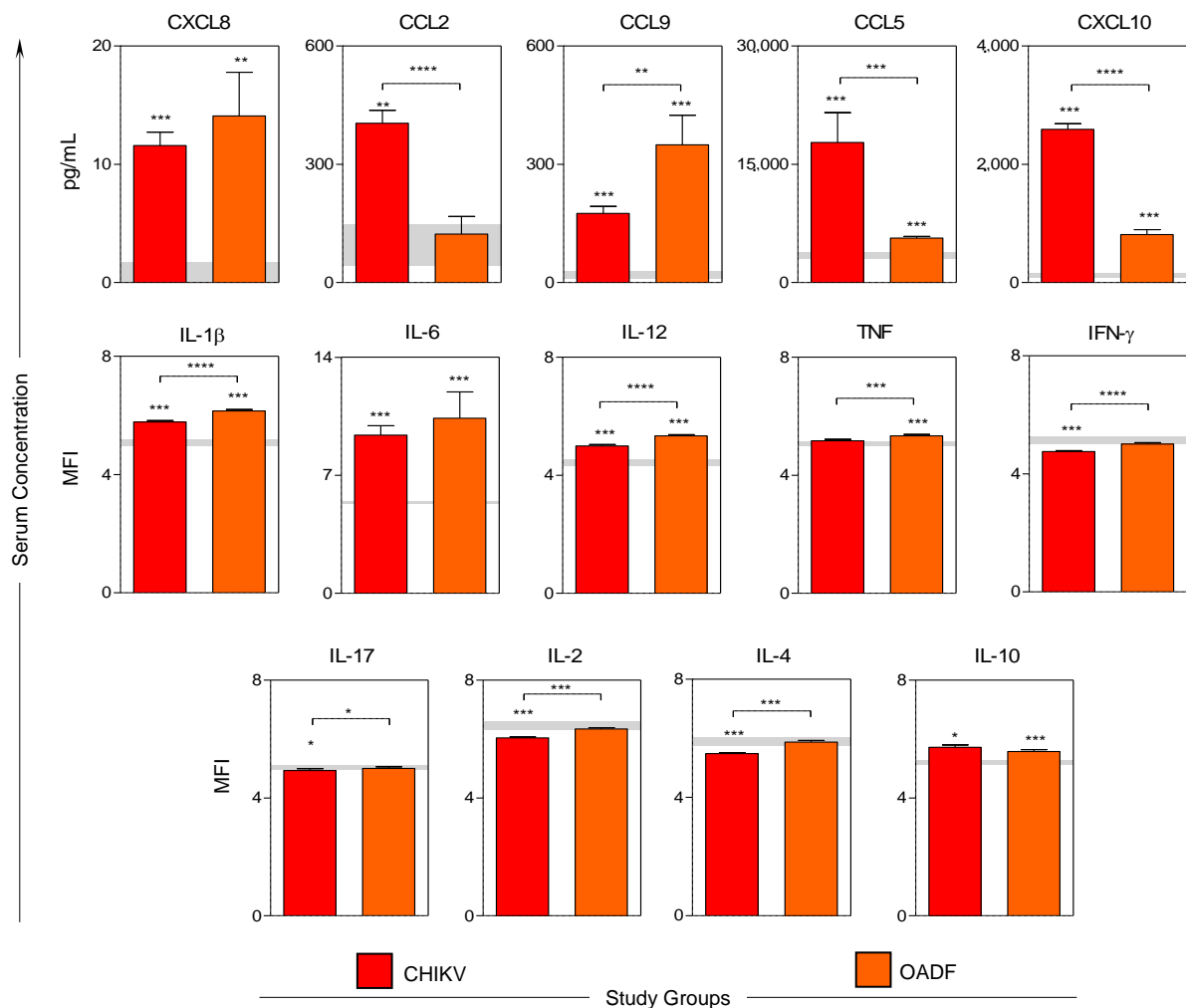


Figure 1. Serum levels of chemokines and cytokines in acute CHIKV infection and other acute febrile diseases. Quantitative analysis of chemokines and cytokines was carried out by BD Cytometric Bead Array™ (CBA) as described in Methods. A total of 14 soluble biomarkers (CXCL8, CCL9, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, INF- γ , IL-17, IL-2, IL-4 and IL-10) were measured in serum samples from patients with acute CHIKV infection and other acute febrile diseases (OADF) as well as healthy controls. The results are expressed in pg/mL for chemokines and in mean fluorescence intensity for cytokines. Data are presented as mean values and the reference range observed in healthy controls underscored by gray background (95% CI of mean values). Significant differences at $p < 0.05$ were identified by asterisks for comparisons with HC and by connecting lines for differences between CHIKV and OADF (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

Chemokines and cytokines profile in acute CHIKV infection according to the duration of arthralgia

Of 134 CHIKV-infected patients with information about the duration of arthralgia, we found that 46% (n=62) of the reported arthralgia for more than 3 months. Levels of CXCL8 was significantly higher in CHIKV patients whose arthralgia lasted > 3 months compared to those that arthralgia lasted \leq 3 months (Figure 2).

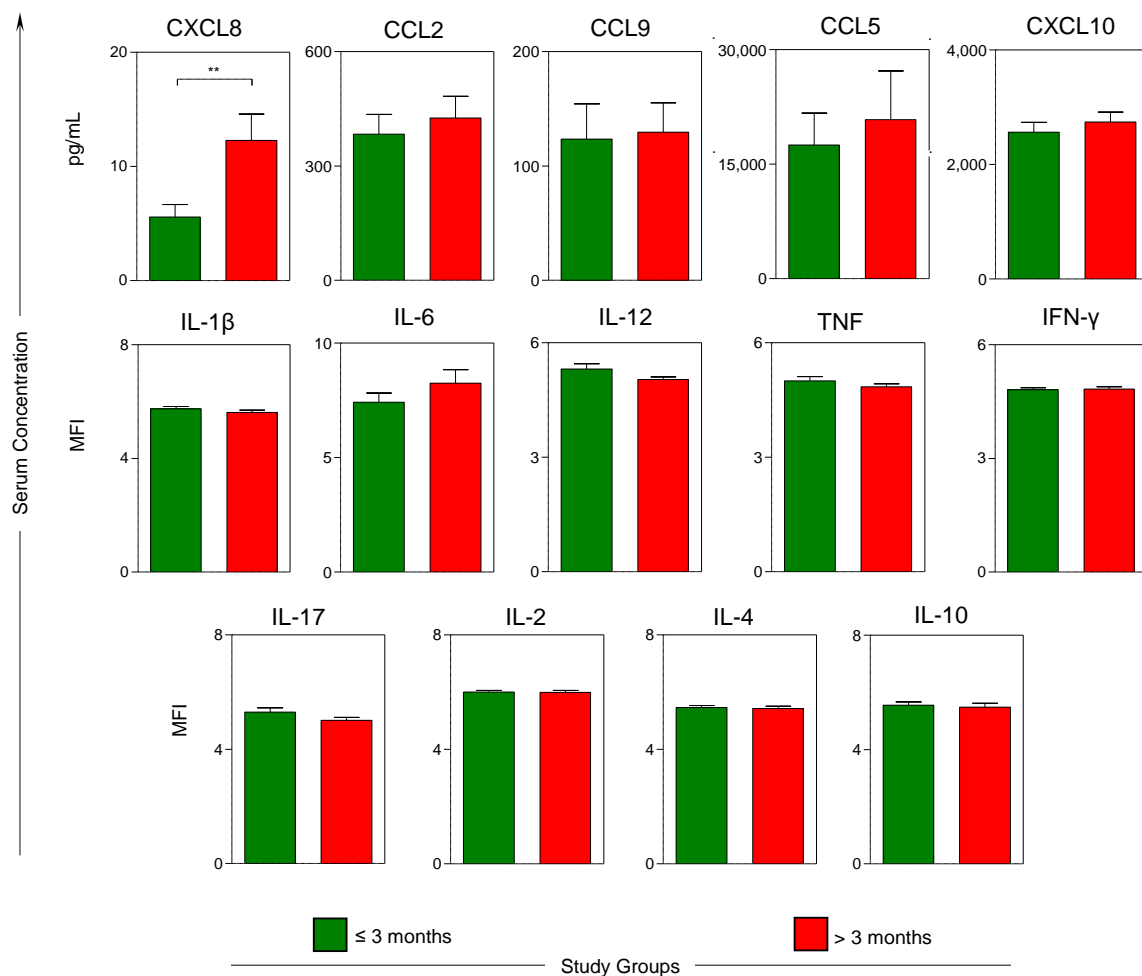


Figure 2. Serum levels of chemokines and cytokines in acute CHIKV infection according to the duration of arthralgia. Quantitative analysis of chemokines and cytokines was carried out by BD Cytometric Bead Array™ (CBA) as described in Methods. A total of 14 soluble biomarkers (CXCL8, CCL9, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1β, IL-6, IL-12, TNF, INF-γ, IL-17, IL-2, IL-4 and IL-10) were measured in serum samples from patients with acute CHIKV infection categorized according to the duration of arthralgia (\leq 3 months and > 3 months). The results are expressed in pg/mL for chemokines and in mean fluorescence intensity for cytokines. Data are presented as mean values. Significant differences at $p < 0.05$ were identified by asterisks and connecting lines for differences between “ \leq 3 months” and “> 3 months” (** $p < 0.005$).

Additional analysis, carried out by univariate Poisson regression, demonstrated that age, female sex, days of symptoms, higher levels of CXCL8 and lower levels of TNF were associated with arthralgia lasting >3 months. However, in the multivariable Poisson regression model, adjusting for age, sex, and days of symptoms, only CXCL8 (RR=1.03), 95%CI (1.00-1.06) and female sex (RR=3.72), 95%CI (1.59-8.96) remained associated with persistent arthralgia (Table 2).

Table 2. Predictors of longer duration of arthralgia among CHIKV positive patients, Brazil, 2014-2016

Factor	Risk Ratio for arthralgia > 3 months (95% CI)			
	Univariable model	<i>p</i> values	Multivariable model	<i>p</i> values
Demographics and clinical characteristics				
Female sex	1.72 (1.14-2.58)	0.01	3.72 (1.59-8.96)	<0.01
Age	1.01 (1.00-1.02)	0.01	1.01 (0.98-1.03)	0.32
Days of symptoms	1.02 (1.00-1.04)	<0.01	1.10 (0.98-1.24)	0.10
Serum chemokines and cytokine				
CXCL8	1.01 (1.00-1.01)	<0.01	1.03 (1.00-1.06)	0.03
CCL2	1.00 (0.99-1.00)	0.18	1.00 (0.99-1.00)	0.60
CCL9	1.00 (0.99-1.00)	0.87	*	*
CCL5	0.99 (0.99-1.00)	0.38	*	*
CXCL10	1.00 (0.99-1.00)	0.47	*	*
IL-1 β	0.85 (0.65-1.12)	0.26	*	*
IL-6	1.02 (0.99-1.05)	0.12	1.07 (0.93-1.23)	0.31
TNF	0.78 (0.62-0.98)	0.04	0.63 (0.35-1.15)	0.14
IL-12	0.86 (0.67-1.09)	0.22	*	*
IFN- γ	1.05 (0.70-1.55)	0.80	*	*
IL-17	0.85 (0.70-1.03)	0.10	0.93 (0.62-1.40)	0.74
IL-4	0.95 (0.68-1.34)	0.79	*	*
IL-10	0.97 (0.79-1.18)	0.77	*	*
IL-2	0.96 (0.67-1.37)	0.83	*	*

* Not selected for entry into multivariable model. Variables significant to $p < 0.20$ as well as variables age, gender, and days of symptoms, were entered into a backward stepwise selection multivariable Poisson regression model. Bold font signifies significant association with persistent arthralgia. Risk Ratio is expressed per pg/mL or median fluorescence intensity increment of chemokines or cytokine concentration.

Chemokines and cytokines profile in acute CHIKV infection according to DENV co-infection status

No statistically significant differences were found on the levels of chemokines and cytokines between patients with and without DENV co-infection (*Supplementary data – Figure 1*).

Chemokines and cytokines profile in acute CHIKV infection according to CHIKV IgM status on acute-phase samples

The results demonstrate higher levels of CXCL8, CCL2, CXCL10, and IL-6 on the CHIKV IgM- group while IFN- γ , IL-2, and IL-4 were found to be significantly lower compared to CHIKV-IgM+ group. (Figure 3)

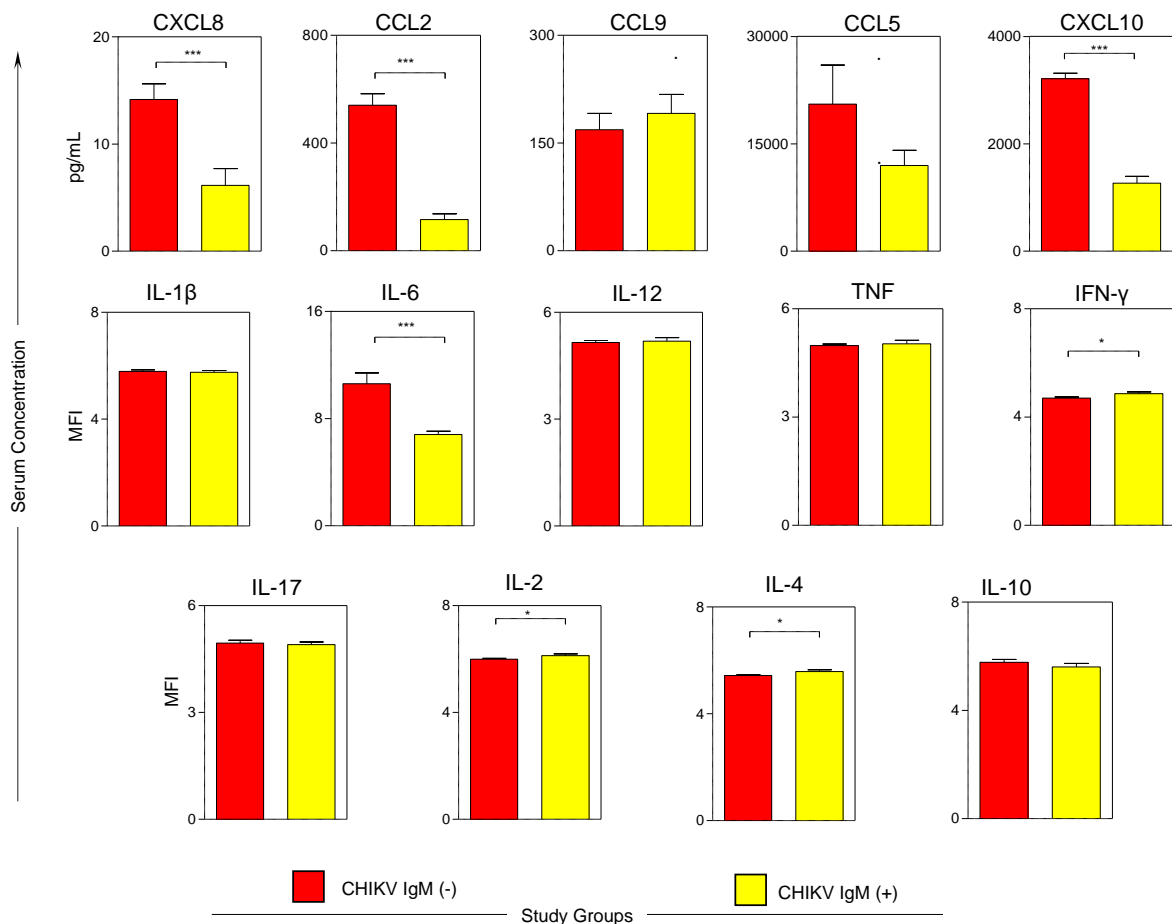


Figure 3. Serum levels of chemokines and cytokines in acute CHIKV infection according to CHIKV IgM status on the acute-phase sample. Quantitative analysis of chemokines and cytokines was carried out by BD Cytometric Bead Array™ (CBA) as described in Methods. A total of 14 soluble biomarkers (CXCL8, CCL9, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, INF- γ , IL-17, IL-2, IL-4 and IL-10) were measured in serum samples from patients with acute CHIKV infection categorized according to the CHIKV IgM status [IgM(-) and IgM(+)]. The results are expressed in pg/mL for chemokines and in mean fluorescence intensity for cytokines. Data are presented as mean values. Significant differences at $p < 0.05$ were identified by asterisks and connecting lines for differences between CHIK IgM (-) and CHIKV IgM (+) (* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$).

Chemokines and cytokines profile in acute CHIKV infection according to days since symptoms onset

Regardless of the similar profiles without fluctuation among of DPSO timeline for IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-2, and IL-4 between CHIKV and OAFD patients, a lower magnitude of the biomarker levels were always observed for CHIKV (Figure 4). On the other hand, distinct profile and higher levels of CCL2, CCL5 and CXCL10 were reported in CHIKV patients especially at D1 and D2-3. Conversely, distinct kinetic profiles of CXCL8, CCL9, and IL-6 were observed in OAFD, especially at D2-3. Interestingly, the kinetic curve of CXCL8, CCL9, and IL-6 showed high levels on the first day of symptoms in the CHIKV group and decreased after 2 days of symptoms. For the OAFD group, the levels of IL-6 on day 1 were lower, peaked between days 2 to 3, and then again decreased. (Figure 4).

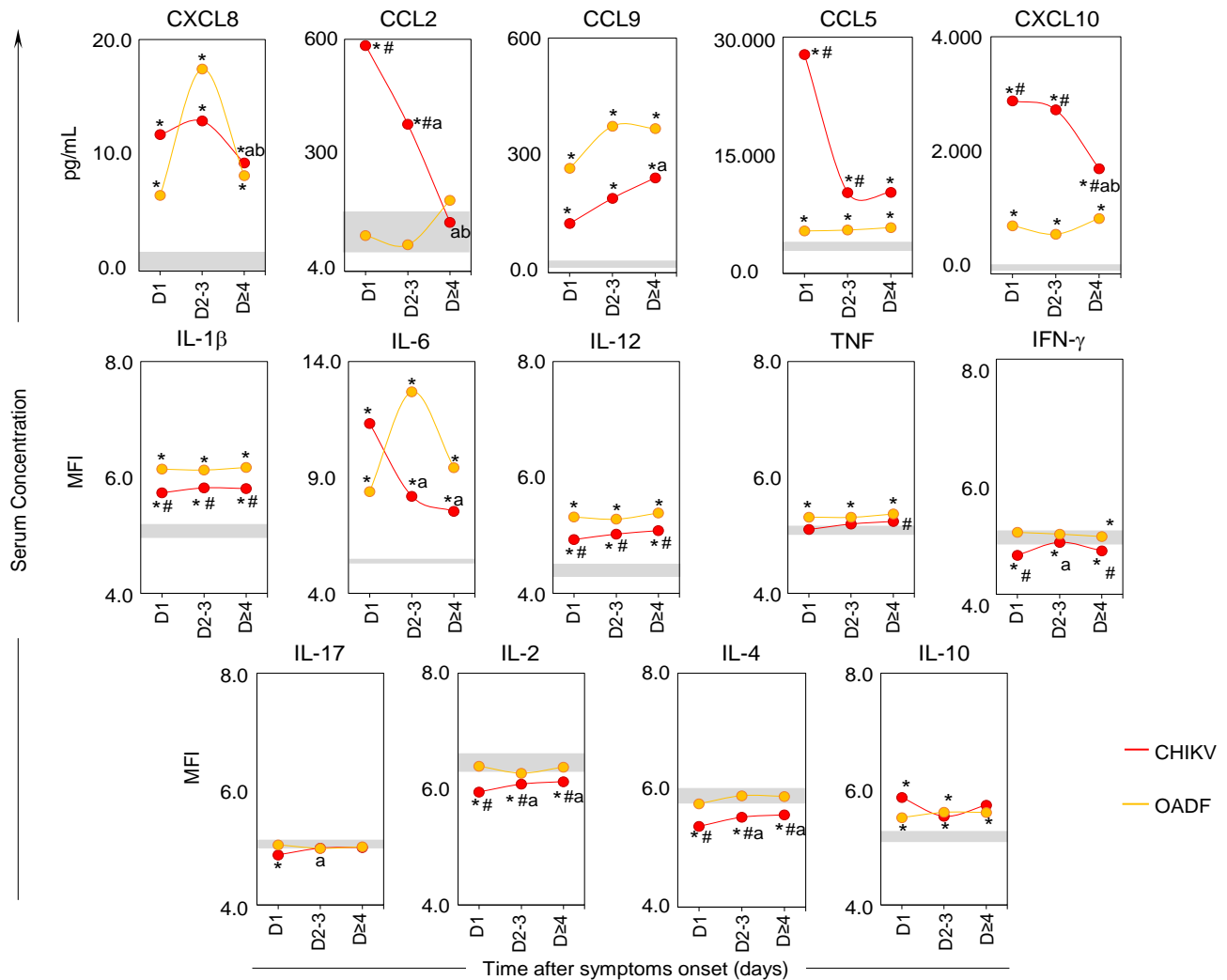


Figure 4. Kinetic profile of serum chemokines and cytokines in acute CHIKV infection and other acute febrile diseases. Quantitative analysis of chemokines and cytokines was carried out by BD Cytometric Bead Array™ (CBA) as described in Methods. A total of 14 soluble biomarkers (CXCL8, CCL9, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, INF- γ , IL-17, IL-2, IL-4 and IL-10) were measured in serum samples from patients with acute CHIKV infection and other acute febrile diseases (OAFD) at distinct times after symptoms onset (D1, D2-3 and D \geq 4) as well as healthy controls. The results are expressed in pg/mL for chemokines and in mean fluorescence intensity for cytokines. Data are presented as mean values and the reference range observed in healthy controls underscored by gray background (95%CI of mean values). Significant differences at $p < 0.05$ were identified by asterisks for comparisons with HC, by hashtag for differences between CHIKV and OADF and letters “a” and “b” for comparisons with D1 and D2-3, respectively.

Serum Biomarkers Signatures in Acute CHIKV Infection

Additionally, we built biomarker signatures for CHIKV and OADF groups, and according to duration of arthralgia.

The comparative biomarker signature analysis identified that while CCL9, CXCL10, IL-1 β , IL-6, and IL-12 were common biomarkers observed in CHIKV and OADF, CCL5 and CXCL8 were biomarkers selectively observed in a higher proportion of CHIKV patients in comparison to OADF. On the other hand, TNF and IL-10 were biomarkers selectively observed in a higher proportion of OADF as compared to CHIKV.

The stratification of CHIKV patients according to the duration of arthralgia (≤ 3 months and > 3 months) pointed out distinct biomarker signature profiles and showed that while TNF was a biomarker selectively observed in CHIKV patients with duration of arthralgia ≤ 3 months. CXCL8 and CCL2 were selective biomarkers observed in a high proportion of CHIKV patients with duration of arthralgia > 3 months. CCL9, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6 and IL-12 were observed in both groups. (Figure 5)

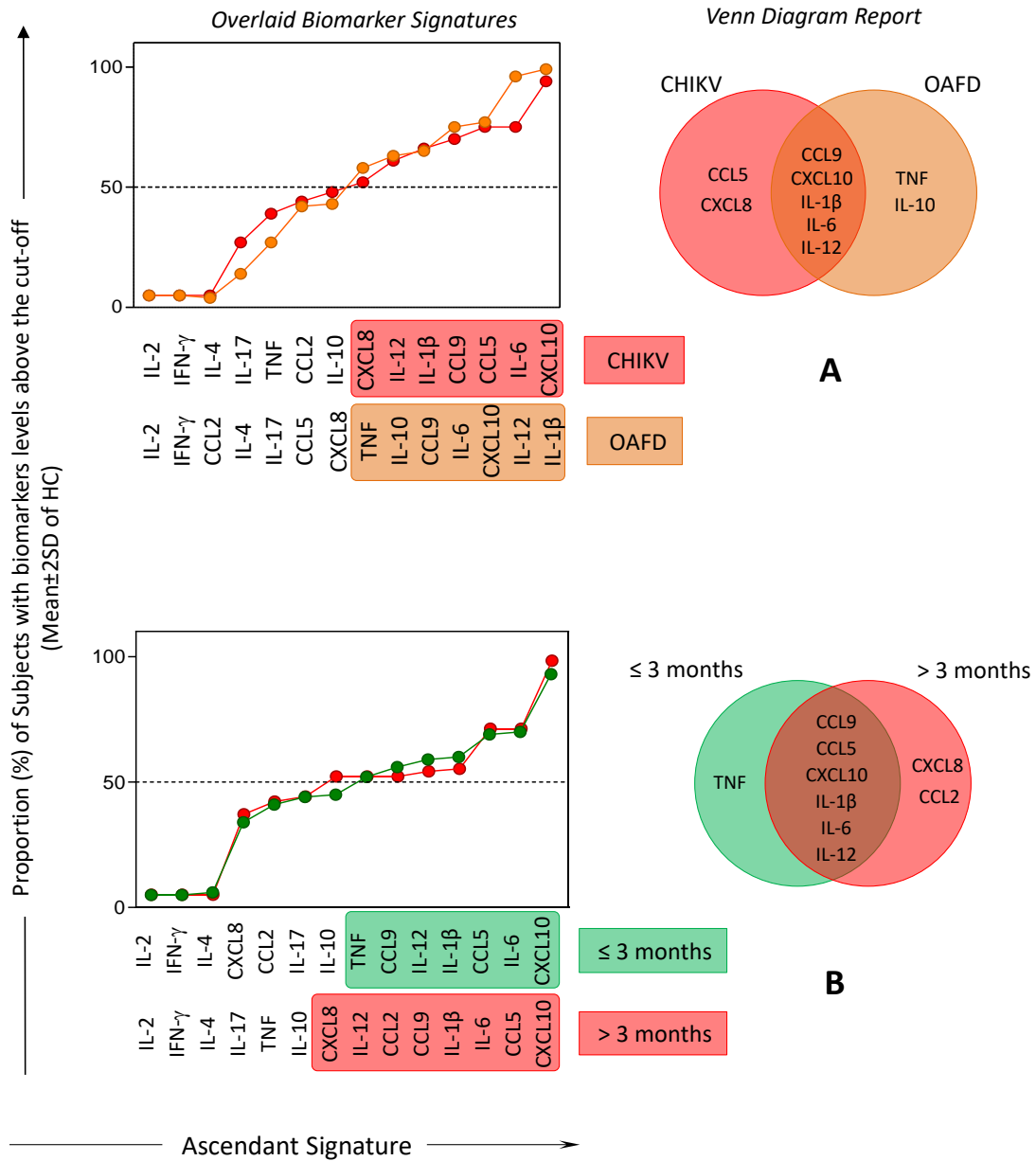


Figure 5. Serum biomarker signatures in acute CHIKV infection Quantitative analysis of chemokines and cytokines were carried out by BD Cytometric Bead Array™ (CBA) as described in Methods. A total of 14 soluble biomarkers (CXCL8, CCL9, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, INF- γ , IL-17, IL-2, IL-4 and IL-10) were measured in serum samples from **A** (patients with acute CHIKV infection compared to other acute febrile diseases [OAFD]) and **B** (patients that presented arthralgia for \leq 3 months compared to $>$ 3 months). The results are ascendant biomarker signatures representing the proportion of subjects above the reference range cut-off (mean \pm 2 standard deviations of HC). Venn diagram analysis was further assembled to identify common and selective biomarkers between groups.

DISCUSSION

One of the most striking features of the disease caused by CHIKV infection is intense arthralgia, which may persist for several months (GOUPIL; MORES, 2016). In this study, 88% of CHIKV-positive patients reported arthralgia and 92% reported myalgia. These findings were significantly higher compared to OADF control. Conversely to CHIKV, OADF control had a higher frequency of clinical manifestations suggestive of influenza-like illnesses as cough and sore throat which is consistent with other acute illnesses commonly diagnosed in this emergency care unit (OLIVEIRA et al., 2016). OADF patients were also more delayed to present for care compared to patients with CHIKV diagnosis. This is likely to occur due to the intense pain caused by CHIKV infection, which can lead the patient to seek health services more urgently.

The results of cytokine and chemokine profile analysis showed that patients infected with CHIKV presented significantly higher levels of serum chemokines CCL2, CCL5, and CXCL10 compared to OADF patients. CCL2 is a potent monocyte-attracting chemokine, and CCL5 greatly contributes to the recruitment of blood monocytes, eosinophils, basophils, monocytes, effector memory T cells, B cells, NK cells, and immature dendritic cells into inflammation sites and both are previously described to be involved in CHIKV infection (YOSHIMURA, 2018; SOARES-SCHANOSKIID et al., 2019). Interestingly, despite CHIKV infected patients presented statistically significant lower levels of CCL9, IL-1 β , IL-12, TNF, IFN- γ , IL-17, IL-12, and IL-4 compared to those that had OADF, when submitted to signature analysis the immune mediators CCL9, CXCL10, IL-1 β , IL-6, and IL-12 were found to be common biomarkers between both groups. The signature analysis also identified two important chemokines that recruit innate immune response cells (CCL5 and CXCL8) as biomarkers of CHIKV infection and TNF and IL-10 as biomarkers of OADF infections

The CHIKV-host interaction triggers Th1 mediated immune response that can favor viral spread since at the early phase of disease CHIKV infects primary human epithelial and endothelial cells, fibroblasts, and monocyte-derived macrophages (HER et al., 2010; GANESAN; DUAN; REID, 2017).

Regarding persistent arthralgia > 3 months, we found a prevalence of 46% (62/134) among evaluated patients. The prevalence of chronic joint manifestations can vary between 14.4% to 87.2% of cases depending on the epidemiological scenario of the study site (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2015). Methodological issues such as sample size, duration of follow-up, the strategy used to determine the outcome (via telephone, medical evaluation,

etc.) and data collection methods may partly explain this variability between the results (MARQUES et al., 2017b). In the present study, we found a statistically significant greater level of CXCL8 in acute-phase samples of patients that developed arthralgia for > 3 months, this is consistent with other studies that reported an increase in circulating levels of CXCL8 due to CHIKV infection. (TANABE et al., 2019). Biomarkers signature analysis showed CXCL8 and CCL2 as biomarkers of arthralgia > 3 months and TNF as biomarker \leq 3 months.

As TNF is considered a key role in the activation of the immune system to fight viral infections (SEO; WEBSTER, 2002; ESPÍN-PALAZÓN et al., 2016), a robust innate immune response could create a natural anti-viral environment during the acute phase of CHIKD that could lead to fast and early clearance of CHIKV infection and result in a better clinical outcome. This type of pattern in CHIKV infection has been reported previously in several studies (SIMARMATA et al., 2016; MURILLO-ZAMORA et al., 2017; CHANG et al., 2018).

Also, we showed that female sex and higher levels of CXCL8 during CHIKV infection were independently associated with persistent arthralgia. This specific chemokine is known to be an important factor in neutrophil traffic. This chemokine is secreted by activated macrophages and promotes the recruitment of neutrophils to the inflammatory site (RUSSO et al., 2014). Recent work showed that neutrophil extracellular traps effectively control acute CHIKV infection and, again, indicating that immune innate cells and mediators early recruited to the infection site could be able to control CHIKV replication and dissemination (HIROKI et al., 2020).

On the other hand, it has been suggested that the presence of inflammation and arthralgia may be associated with dysregulation of the immune response in both the acute and convalescent phases, with an increase in Th1 pro-inflammatory cytokines and decrease in Th2 effectors cytokines in patients with persistent symptoms (HOARAU et al., 2010; CHOW et al., 2011b).

It is important to note that the correlation between joint inflammation and a state of systemic activation, as demonstrated by the presence of inflammation markers in plasma, such as chemokines and cytokines, remains uncertain. It is not clear whether the chronic arthralgia resulting from CHIKV infection is due to the viral presence in joints and tissues, whether these events are due to the host's immune response to infection or even an association of these events. This indicates that there may be other factors interfering with the virus-host interaction, such as genetic background (e.g. polymorphism, human leucocitary antigen),

which can trigger and direct the immune response and consequently influence the patient's outcome.

As expected, on CHIKVIgM- patients, the median of days post symptoms onset at the blood collection date was significantly low (1 day of symptoms) compared to CHIKVIgM+ group when compared to had a median of 4 days. Since CHIKV viral load is higher and likely detectable at 1-7 days post symptoms these results coincide with the laboratory diagnosis for viral detection (MARQUES et al., 2017b). The patients with CHIKIgM- diagnosis had higher levels of CXCL8, CCL2, CXCL10 chemokines, which are known to recruit Th1 cells. The results also indicate a higher level of IL-6, known as pro-inflammatory and associated with arthralgia in CHIKV infection, a symptom also more frequently in those patients (NG et al., 2009; CHAAITHANYA et al., 2011). Differently, lower levels of IL-4 were observed in this group. This is likely to occur as IL-4 is the main effector cytokines for the Th2 response and usually appears after a few days of symptoms, a time needed to the immune system be able to trigger an effector Th2 response and to produce IgM antibodies (SILVA-FILHO; CARUSO-NEVES; PINHEIRO, 2014). Also, CHIKV-IgM+ patients had a higher frequency of rash, cough, sore throat, and diarrhea ($p < 0.05$) compared to CHIKVIgM- group, curiously, a very similar profile to OAFD patients.

Although DENV and CHIKV have been shown to induce different signatures of responses suggesting specific roles in the control of both infections (PETITDEMANGE et al., 2016), in the present study no differences were found between DENV status among CHIKV-positive patients. Also, we did not find the presence or absence of an additional diagnosis of DENV associated with the chronification of arthralgia. Both in Brazil and the city of Salvador, State of Bahia, DENV is an endemic arbovirus since 1980 and a large part of the population has already been exposed to this virus (KIKUTI et al., 2015; SILVA et al., 2016). For this reason, the comparison by this criteria may not provide relevant findings due to the similarity of the population concerning DENV exposure. None of the participants in this study had co-infection with ZIKV.

This study has potential limitations regarding the cytokine analysis results. Since we detect low sensitivity in the cytokine kits (CBA Human Th1, Th2, Th17 and Inflammation), we chose to present the results in MFI instead of pg/mL. Although other studies use this measure in the evaluation of cytokines, it is important to take into account that this type of measure is not ideal for the evaluation of biomarkers.

Because of the spread and high frequency of CHIKV epidemics worldwide, is necessary a more accurate comprehension of the development and maintenance of persistent

arthralgia caused by CHIKV infection. Alternative approaches to better understand immunopathogenesis, provide early treatment, and prevent CHIKV-associated chronic pain and improve patients' quality of life should be further explored. Hence, these findings reveal immunological aspects associated with CHIKD that may be useful as tools for further understanding the immunopathogenesis of CHIKV infection

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the technical staff who participated in data collection and sample processing, Renan Rosa for his assistance with data management, the São Marcos Health Unit staff for providing health assistance to the patients, and the patients for their participation in the study. The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities. LCJN thanks the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for scholarship grant.

FUNDING

This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development under Grants 400830/2013-2 and 440891/2016-7 to G.S.R., and scholarships to L.B.T., M.G.R., and G.S.R.; the Bahia Foundation for Research Support under Grants PET0026/2013, APP0044/2016, and PET0022/2016 to G.S.R., and scholarship to M.M.O.S.; the Department of Science and Technology, Secretariat of Science, Technology and Strategic Inputs, Brazilian Ministry of Health; the Federal University of Bahia; and the Oswaldo Cruz Foundation. OAMF is a research fellow from FAPEAM (PVN-II, PRÓ-ESTADO Program #005/2019). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

Designing research study: GSR, MGR

Conducting experiments: LCJN, CXC, LBT, PSSM

Acquiring data: LCJN, LBT, PSSM, MK, MMOS, ROA

Analyzing data: LCJN, JFBF, ACCA, OAMF

Advisory Medical Committee: GSR, MGR

Writing the manuscript: LCJN, OAMF

Revising the manuscript: JFBF, ACCA, GSR, MGR, MMP

DISCLOSURE

The authors declare no competing financial or conflict of interest.

ETHICS STATEMENT

This study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Research Center Gonçalo Moniz - Oswaldo Cruz Foundation - Bahia (CAAE: 90874818.5.0000.0040 and CAAE: 7840813.0.0000.0040). Before enrollment, written informed consent was obtained from patients ≥ 18 years of age, or from guardians of patients < 18 years of age and written assent was obtained from patients 7–17 years of age.

REFERENCES

AMARAL, J. et al. The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 289, 22 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/289>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

BAHIA. **Boletim Epidemiológico da Febre Chikungunya na Bahia, 2014_N12_22122014**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletim-epidemiologico-Chikungunya_N12_22122014.pdf>. Acesso em: 4 maio. 2019.

BALM, M. N. D. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 9, p. 1501–1505, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825831>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 2014. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

CARPENTIER, K. S.; MORRISON, T. E. Innate immune control of alphavirus infection. **Current Opinion in Virology** Elsevier B.V., , 1 fev. 2018. .

CHAAITHANYA, I. K. et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. **Viral Immunology**, v. 24, n. 4, p. 265–271, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830898>>. Acesso em: 26 maio. 2019.

CHANG, A. et al. The Cytokine Profile in Acute Chikungunya Infection is Predictive of Chronic Arthritis 20 Months Post Infection. **Diseases**, v. 6, n. 4, p. 95, 20 out. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30347791>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of infectious diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–57, 15 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288813>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

EDWARDS, C. J. et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 4, p. 271–275, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627877>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

ESPÍN-PALAZÓN, R. et al. TNF α Impairs Rhabdoviral Clearance by Inhibiting the Host Autophagic Antiviral Response. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005699, 28 jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005699>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. **Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling** Viruses MDPI AG, , 1 dez. 2017. .

GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. **The open rheumatology journal**, v. 10, p. 129–140, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28077980>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap)—A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 42, n. 2, p. 377–381, 1 abr. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532046408001226>>. Acesso em: 12 maio. 2019.

HER, Z. et al. Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5903–5913, 15 maio 2010.

HIROKI, C. H. et al. Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 31 jan. 2020.

HOARAU, J. J. et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 15 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404278>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906–908, maio 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000500003&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 5 maio. 2019.

KIKUTI, M. et al. Spatial Distribution of Dengue in a Brazilian Urban Slum Setting: Role of Socioeconomic Gradient in Disease Risk. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003937, 21 jul. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003937>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

KIKUTI, M. et al. Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 108, 13 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30005683>>. Acesso em: 24 abr. 2020.

L'HUILLIER, A. G. et al. Evaluation of euroimmun anti-zika virus igm and igg enzyme-linked immunosorbent assays for zika virus serologic testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2462–2471, 1 ago. 2017.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545–551, mar. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

LIMA MARTINS, H. A. de et al. Depression, Anxiety, and Hopelessness in Patients with Chikungunya Fever in Brazil. **Journal of Neuroinfectious Diseases**, v. 07, n. 04, p. 1–2, 29 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.omicsonline.com/open-access/depression-anxiety-and-hopelessness-in-patients-with-chikungunya-fever-in-brazil-2314-7326-1000236.php?aid=84326>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.-B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005698, 29 jun. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005698>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

MARQUES, C. D. L. et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 – Diagnosis and special situations. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, p. 421–437, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2255502117300469>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

MCCARTHY, M. K.; DAVENPORT, B. J. J.; MORRISON, T. E. Chronic Chikungunya Virus Disease. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2018. p. 1–26.

MOSTAFAVI, H. et al. Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as A Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 290, 22 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/290>>. Acesso em: 31 maio. 2019.

MURILLO-ZAMORA, E. et al. Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 41, 2017.

NG, L. F. P. et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4261, 21 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156204>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 abr. 2015. Disponível em: <<https://bmcmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0348-x>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

OLIVEIRA, C. R. et al. Influenza-like illness in an urban community of Salvador, Brazil: incidence, seasonality and risk factors. **BMC Infectious Diseases**, 2016.

PETITDEMANGE, C. et al. Longitudinal Analysis of Natural Killer Cells in Dengue Virus-Infected Patients in Comparison to Chikungunya and Chikungunya/Dengue Virus-Infected Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 3 mar. 2016.

POH, C. M.; CHAN, Y.-H.; NG, L. F. P. Role of T Cells in Chikungunya Virus Infection and Utilizing Their Potential in Anti-Viral Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 21 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00287/full>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? **Rheumatology International**, v. 35, n. 12, p. 2091–2094, 5 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045218>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

RUSSO, R. C. et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Review of Clinical Immunology** Expert Reviews Ltd., , maio

2014. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678812>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

SANTIAGO, G. A. et al. Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2018.

SEO, S. H.; WEBSTER, R. G. Tumor Necrosis Factor Alpha Exerts Powerful Anti-Influenza Virus Effects in Lung Epithelial Cells. **Journal of Virology**, v. 76, n. 3, p. 1071–1076, 1 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773383>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

SILVA-FILHO, J. L.; CARUSO-NEVES, C.; PINHEIRO, A. A. S. **IL-4: An important cytokine in determining the fate of T cells***Biophysical Reviews*Springer, , mar. 2014. . Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5427811/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC5427811/?report=abstract)>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SILVA, M. M. O. et al. Accuracy of dengue reporting by national surveillance system, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 1 fev. 2016. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/gut.50.2.273>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SILVA, M. M. O. et al. Concomitant Transmission of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Brazil: Clinical and Epidemiological Findings From Surveillance for Acute Febrile Illness. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 69, n. 8, p. 1353–1359, 27 set. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30561554>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

SIMARMATA, D. et al. Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26097, 16 set. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep26097>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

SOARES-SCHANOSKI, A. et al. Systems analysis of subjects acutely infected with the Chikungunya virus. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g001>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

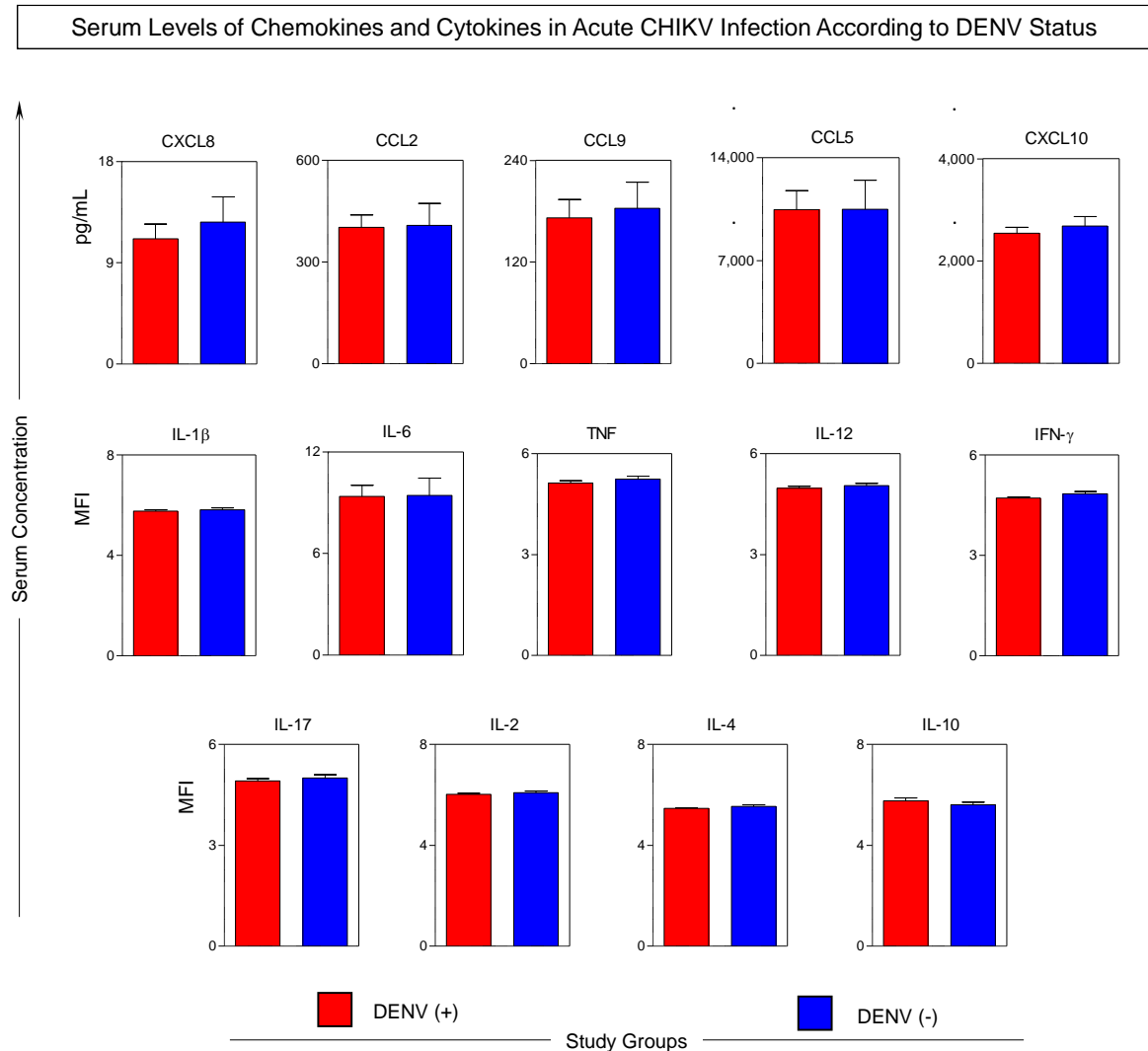
TANABE, I. S. B. et al. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 11, p. 730–733, 1 nov. 2019.

TEIXEIRA, M. G. et al. **East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. Emerging Infectious Diseases**Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2015. .

VAIRO, F. et al. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**W.B. Saunders, , 1 dez. 2019. .

YOSHIMURA, T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: A foe or ally?. **Cellular and Molecular Immunology**. Chinese Soc Immunology, , 1 abr. 2018. .

SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary Data Figure 1. Serum levels of chemokines and cytokines in acute CHIKV infection according to DENV status. Quantitative analysis of chemokines and cytokines were carried out by BD Cytometric Bead Array™ (CBA) as described in Methods. A total of 14 soluble biomarkers (CXCL8, CCL9, CCL2, CCL5, CXCL10, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF, INF- γ , IL-17, IL-2, IL-4 and IL-10) were measured in serum samples from patients with acute CHIKV infection categorized according to the DENV status [DENV(-) and DENV(+)]. The results are expressed in pg/mL for chemokines and in mean fluorescence intensity for cytokines. Data are presented as mean values and standard error and the reference range observed in healthy controls underscored by gray background (95%CI of mean values).

Supplementary Data Table 1. Clinical characterization of patients with Chikungunya Virus (CHIKV) infection according to dengue virus (DENV) diagnosis status, Brazil, 2014-2016

Parameters	DENV(-) (n=176)	DENV(+) (n=77)	<i>p</i> <i>values</i>
Gender (F)	52% (93/176)	45% (35/77)	0.28
Age	32 (20.5 - 43)	37 (25-46)	0.14
Days post symptoms onset	2 (1-3.5)	2 (1-3)	0.53
Myalgia	93% (164/176)	90% (70/77)	0.52
Arthralgia	89% (157/176)	87% (37/77)	0.61
Polyarthralgia*	80% (141/175)	81% (63/77)	0.83
Symmetric Arthralgia**	81% (143/176)	83% (64/77)	0.72
Headache	91% (161/176)	94% (73/77)	0.35
Retro-orbital pain	68% (120/175)	72% (56/77)	0.50
Swollen Joints	39% (70/176)	45% (35/77)	0.39
Rash	31% (55/176)	35% (26/77)	0.73
Conjunctival Hyperemia	48% (68/141)	47% (30/63)	0.93
Cough	33% (59/176)	38% (30/77)	0.40
Sore throat	28% (50/176)	24% (19/77)	0.51
Diarrhea	17% (30/176)	18% (14/77)	0.82
Nauseas/Vomiting	24% (42/175)	22% (17/77)	0.74

* > 1 joint involved; ** At least one pair of joints with arthralgia; DENV status was defined by IgM ELISA and/or NS1 ELISA and/or RT-PCR for DENV.

6 DISCUSSÃO

Na análise de assinatura de biomarcadores em relação à duração da artralgia, CXCL8, CCL2 foram exclusivos do grupo que desenvolveu dor articular >3 meses e TNF do grupo artralgia ≤ 3 meses durante a infecção aguda. Neste estudo, o diagnóstico concomitante de DENV não influenciou no perfil de biomarcadores, nem no desfecho de artralgia > 3 meses. Análises adicionais, realizadas por regressão de Poisson univariada, demonstraram que sexo feminino, idade, dias de sintomas, níveis mais elevados de CXCL8 e níveis mais baixos de TNF foram associados com artralgia >3 meses. No entanto, no modelo de regressão de Poisson multivariado, ajustando para idade, sexo e dias de sintomas, apenas CXCL8 (RR=1,03) e sexo feminino (RR=3,72) permaneceram associados à artralgia > 3 meses.

As quimiocinas CCL2 e CXCL8 são secretadas por diversos tipos celulares em resposta à infecções (células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T dentre outras) e estão envolvidas na modulação do recrutamento de células imunes, como monócitos e neutrófilos, nas articulações inflamadas e já foram encontradas com níveis aumentados no soro e no líquido sinovial de pacientes infectados com CHIKV (HOARAU et al., 2010; CAROLINA; PALOMINO; MARTI, 2015). O tratamento de camundongos infectados com alfavírus com inibidor de CCL2, CCL8 e CCL7, foi capaz de melhorar a infiltração celular nas articulações e diminuir edema articular, sugerindo que as quimiocinas podem desempenhar um papel importante no dano articular e inflamação (CHEN et al., 2015).

A avaliação do perfil de biomarcadores séricos em pacientes com CHIKV revelou um quadro de aumento de diferentes quimiocinas pró-inflamatórias Th1 (CCL5, CCL2, CXCL10) e níveis mais baixos de IL-2, TNF, e de mediadores da resposta de resposta Th2 e regulatória (IL-12, IL-4 e IL-10) em comparação ao grupo controle com ODFA. De modo geral, foi encontrado um perfil Th1 nos pacientes com CHIKV independentemente dos dias de sintomas. Alguns biomarcadores pró-inflamatórios como CXCL8, CCL2, CCL5, CXCL10 e IL-6 apresentaram níveis mais elevados no grupo de pacientes com CHIKV já no primeiro dia de sintoma em comparação aos demais dias e ao grupo ODFA.

Em outros estudos, o perfil de desregulação a resposta Th1 foi associado com períodos prolongados de inflamação e dor nos pacientes. Já uma resposta voltada para perfil Th2, com níveis mais elevados de mediadores como TNF, IL-4 e IL-2 na fase aguda da doença estariam associados à resolução dos sintomas e proteção contra o desenvolvimento de artralgia crônica tendo em vista que, tais mediadores são conhecidos por induzir mudança de respostas imunes

reguladas por Th1 para Th2 e eliminação viral (ESPÍN-PALAZÓN et al., 2016; SIMARMATA et al., 2016; MURILLO-ZAMORA et al., 2017; CHANG et al., 2018). Estes achados podem indicar que os pacientes com CHIKV podem levar mais tempo para avançar para o estágio Th2 da resposta imune, apresentando níveis elevados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

Neste estudo, a caracterização clínica dos pacientes com infecção por CHIKV foi, como esperado, diferencial em relação ao grupo com ODFA. Nós observamos que 88% dos pacientes do grupo CHIKV relataram artralgia e 92% relataram mialgia. Esses achados foram significativamente mais altos em comparação ao controle ODFA e condizente com a literatura já que uma das características mais marcantes da doença causada pela infecção pelo CHIKV é a artralgia intensa (GOUPIL; MORES, 2016). No grupo de pacientes com ODFA as características mais frequentes e diferenciais ao grupo CHIKV ($p < 0,05$) foram manifestações clínicas sugestivas de doenças semelhantes à influenza, como tosse e dor de garganta, o que é consistente com outras doenças agudas comumente diagnosticadas nesta unidade de atendimento de emergência (OLIVEIRA et al., 2016). Os pacientes com ODFA também levaram mais para procurar atendimento médico em comparação com os pacientes com diagnóstico de CHIKV. É provável que isso ocorra devido às manifestações clínicas características da infecção por CHIKV como intensa mialgia e poliartralgia que pode levar o paciente a procurar os serviços de saúde com mais urgência.

Para Tauro et al (2019), ainda que a maior parte da população tenha sido exposta ao CHIKV podem existir dentro e fora de Salvador regiões ou “bolhas” cuja população está susceptível à infecção por CHIKV e, nesse contexto, a possibilidade de novos surtos não pode ser descartada. Os dados epidemiológicos nos últimos anos no estado da Bahia e em Salvador contribuem para esta afirmação. Houve um período de pico da doença nos anos de 2014 e 2015 logo após a sua introdução seguido de um período de queda, no entanto, o número de casos vem aumentando de forma intensa nos anos de 2019 e, principalmente, 2020 onde o número de casos triplicou em relação ao ano de 2019.

Portanto, abordagens alternativas para entender melhor a imunopatogênese, tratar precocemente e prevenir comorbidades associadas ao CHIKV para melhorar a qualidade de vida dos pacientes devem ser exploradas mais detalhadamente. Considerando a miscigenação e singularidade da população brasileira, em um cenário epidemiológico de co-circulação de outros arbovírus, estudos que possam avaliar mediadores imunes nessas regiões são de extrema importância para o avanço do conhecimento científico, diagnóstico diferencial e definição de possíveis estratégias terapêuticas baseadas na resposta imune.

7 CONCLUSÃO

Definir o papel funcional preciso da resposta imune e seus mediadores em indivíduos infectados com CHIKV ainda é um desafio. O presente trabalho demonstrou que as quimiocina CXCL8 e CCL2 podem estar envolvidas no desenvolvimento de artralgia crônica após infecção por CHIKV. Este achado reforça a necessidade de melhor compreender o papel das quimiocinas na patogênese da doença causada pelo CHIKV.

Nesse sentido, especialmente numa região endêmica com registro de alto número de casos de CHIKV, os achados deste estudo revelam aspectos imunológicos associados ao CHIKV que podem ser ferramentas importantes para o entendimento da imunopatogênese da infecção pelo CHIKV.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, J. et al. The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 289, 22 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/289>>. Acesso em: 5 maio. 2019.
- APPASSAKIJ, H. et al. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: A blood transfusion threat? **Transfusion**, v. 53, n. 10 pt. 2, p. 2567–2574, out. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1537-2995.2012.03960.x>>. Acesso em: 27 maio. 2020.
- APPASSAKIJ, H. et al. The Potential impact of chikungunya virus outbreaks on blood transfusion. **Transfusion Medicine Reviews**. W.B. Saunders, , 1 jan. 2020. .
- AZEVEDO, R. do S. da S. et al. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 0, p. 1–6, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102015000100509&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- BAHIA. **Boletim Epidemiológico da Febre Chikungunya na Bahia, 2014_N12_22122014**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/boletim-epidemiologico-Chikungunya_N12_22122014.pdf>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- BAHIA. **Situação Epidemiológica aas Arboviroses. Bahia, 2015**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim-epidemiologico-nº-11-dengue_chikungunya_zika.pdf>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- BAHIA. **Situação Epidemiológica das Arboviroses. Bahia, 2016**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim-epidemiologico-n-19-dengue-chikungunya-zika-rev.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- BAHIA. **Boletim Epidemiológico das Arboviroses. Bahia, 2017**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim_Epidemiologico_n1_Arbov-07novembro2017.pdf>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- BAHIA. **Boletim Epidemiológico de Arboviroses, Bahia, 2018**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Novembro-2018-Boletim-Epidemiologico-de-Arboviroses.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- BAHIA. **Boletim Epidemiológico de Arboviroses, Bahia, 2019**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Janeiro-2019-Boletim-Epidemiologico-de-Arboviroses.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.
- BAHIA. **Boletim Epidemiológico das Arboviroses ,Bahia, 2020**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/BOLETIM-EPIDEMIOLOGICO-SE-30.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2020.
- BALM, M. N. D. et al. A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 9, p. 1501–1505, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825831>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

BARR, K.; VAIDHYANATHAN, V. Chikungunya in Infants and Children: Is Pathogenesis Increasing? **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 294, 23 mar. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30909568>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

BERNARD, E. et al. Human keratinocytes restrict chikungunya virus replication at a post-fusion step. **Virology**, v. 476, p. 1–10, 1 fev. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682214005145>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

BHATIA, M. S.; GAUTAM, P.; JHANJEE, A. Psychiatric Morbidity in Patients with Chikungunya Fever: First Report from India. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 9, n. 10, p. VC01–VC03, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26557595>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde** **Boletim Epidemiológico**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/29/2015-013---Boletim-Dengue-SE11-2015.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. 2014. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico Semana Epidemiológica 11, 2015 Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/29/2015-013---Boletim-Dengue-SE11-2015.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019a.

BRASIL, M. da S. **Febre Chikungunya - Manejo Clínico**. [s.l.: s.n.]

BRITO, C. A. A. de; BRITO, C. A. A. de. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 585–589, set. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822017000500585&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 4 maio. 2019.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, 1 abr. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28159534>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

CABRAL-CASTRO, M. J. et al. Molecular and serological techniques to detect co-circulation of DENV, ZIKV and CHIKV in suspected dengue-like syndrome patients. **Journal of Clinical Virology**, v. 82, p. 108–111, set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27479173>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

CARDONA-OSPINA, J. A. et al. Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Colombia, 2014. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 12, p. 793–802, 1 dez. 2015.

CARDOSO, C. W. et al. Unrecognized Emergence of Chikungunya Virus during a Zika Virus Outbreak in Salvador, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, 2017.

CAROLINA, D.; PALOMINO, T.; MARTI, L. C. Quimiocinas e imunidade. **Revendo Ciências Básicas - Einstein**, v. 13, n. 3, p. 469–73, 2015.

CARPENTIER, K. S.; MORRISON, T. E. **Innate immune control of alphavirus infection***Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V., 1 fev. 2018.

CASTRO, A. P. C. R. de et al. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p. 299–302, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1806-0013.20160093>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

CHAAITHANYA, I. K. et al. Role of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Chronic Arthropathy in CHIKV Infection. **Viral Immunology**, v. 24, n. 4, p. 265–271, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830898>>. Acesso em: 26 maio. 2019.

CHANG, A. et al. The Cytokine Profile in Acute Chikungunya Infection is Predictive of Chronic Arthritis 20 Months Post Infection. **Diseases**, v. 6, n. 4, p. 95, 20 out. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30347791>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

CHAVES, B. A. et al. Coinfection with Zika Virus (ZIKV) and Dengue Virus Results in Preferential ZIKV Transmission by Vector Bite to Vertebrate Host. **Journal of Infectious Diseases**, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-abstract/218/4/563/4962451>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

CHEN, W. et al. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 581–593, 1 jan. 2015. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/>>. Acesso em: 8 nov. 2020.

CHOW, A. et al. Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 15 jan. 2011a. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiq042>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–57, 15 jan. 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288813>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

CHUA, H. H. et al. A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement. **The Medical Journal of Malaysia**, v. 65, n. 1, p. 83–4, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21265260>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

COFFEY, L. L.; FAILLOUX, A. B.; WEAVER, S. C. **Chikungunya virus–vector interactions***Viruses*. MDPI AG, , 24 nov. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25421891/>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. et al. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006510, 1 jun. 2018.

DE ARAUJO EYER-SILVA, W. et al. Case Report A case of chikungunya virus disease presenting with remarkable acute arthritis of a previously damaged finger joint. **Revista da**

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 49, n. 6, p. 790–792, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v49n6/0037-8682-rsbmt-49-06-00790.pdf>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

DEEBA, F. et al. Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 3, p. ftv119, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femspd/article-lookup/doi/10.1093/femspd/ftv119>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

DONALISIO, M. R. et al. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102017000100606&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 5 maio. 2019.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446, 27 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479654>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

ECDC. **Clusters of autochthonous chikungunya cases in Italy**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-chikungunya-Italy-update-9-Oct-2017.pdf>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

ECONOMOPOULOU, A. et al. Atypical Chikungunya virus infections: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, 2009.

EDWARDS, C. J. et al. Molecular diagnosis and analysis of Chikungunya virus. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, n. 4, p. 271–275, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627877>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

ESPÍN-PALAZÓN, R. et al. TNF α Impairs Rhabdoviral Clearance by Inhibiting the Host Autophagic Antiviral Response. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005699, 28 jun. 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005699>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

FARIA, N. R. et al. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLoS Currents**, 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://currents.plos.org/outbreaks/article/epidemiology-of-chikungunya-virus-in-bahia-brazil-2014-2015/>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling. **Viruses**. MDPI AG, , 1 dez. 2017. .

GASQUE, P. et al. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 241–249, abr. 2015. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2014.1710>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

GASQUE, P. et al. Chikungunya Pathogenesis: From the Clinics to the Bench. **Journal of Infectious Diseases**, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/214/suppl_5/S446/2632636>. Acesso em: 5 maio. 2019.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, 18 mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18351797>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A Review of chikungunya virus-induced arthralgia: clinical manifestations, therapeutics, and pathogenesis. **The Open Rheumatology Journal**, v. 10, p. 129–140, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28077980>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

GUERRERO-ARGUERO, I. et al. A comparison of Chikungunya virus infection, progression, and cytokine profiles in human PMA-differentiated U937 and murine RAW264.7 monocyte derived macrophages. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0230328, 12 mar. 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0230328>>. Acesso em: 28 maio. 2020.

HARRIS, P. A. et al. Research electronic data capture (REDCap)—A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 42, n. 2, p. 377–381, 1 abr. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532046408001226>>. Acesso em: 12 maio. 2019.

HAWMAN, D. W. et al. Chronic joint disease caused by persistent chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. **Journal of Virology**, v. 87, n. 24, p. 13878–13888, 15 dez. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24131709>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

HAWMAN, D. W. et al. Pathogenic chikungunya virus evades B cell responses to establish persistence. **Cell Reports**, v. 16, n. 5, p. 1326–1338, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27452455>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

HER, Z. et al. Active infection of human blood monocytes by chikungunya virus triggers an innate immune response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5903–5913, 15 maio 2010.

HIROKI, C. H. et al. Neutrophil extracellular traps effectively control acute chikungunya virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 31 jan. 2020.

HOARAU, J. J. et al. Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 15 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404278>>. Acesso em: 24 maio. 2019.

HONÓRIO, N. A. et al. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 906–908, maio 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000500003&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 5 maio. 2019.

KELVIN, A. A. et al. Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1279, 16 ago. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001279>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

KIKUTI, M. et al. Spatial distribution of dengue in a brazilian urban slum setting: role of socioeconomic gradient in disease risk. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003937, 21 jul. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003937>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

KIKUTI, M. et al. Diagnostic performance of commercial IgM and IgG enzyme-linked immunoassays (ELISAs) for diagnosis of Zika virus infection. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 108, 13 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30005683>>. Acesso em: 24 abr. 2020.

KRUTIKOV, M.; MANSON, J. Chikungunya virus infection: an update on joint manifestations and management. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 7, n. 4, 31 out. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27824550>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

KULKARNI, S. P. et al. Regulatory T cells and IL-10 as modulators of chikungunya disease outcome: a preliminary study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 12, p. 2475–2481, 25 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28840350>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

KUMAR, R. et al. Cutaneous manifestations of chikungunya fever: Observations from an outbreak at a Tertiary Care Hospital in Southeast Rajasthan, India. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 8, n. 5, p. 336, 2017.

KUNO, G.; CHANG, G.-J. J. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 608–37, out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16223950>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

L'HUILLIER, A. G. et al. Evaluation of euroimmun anti-zika virus igm and igg enzyme-linked immunosorbent assays for zika virus serologic testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2462–2471, 1 ago. 2017.

LAGOS-GALLEGO, M. et al. Depression as acute and chronic manifestation of dengue and chikungunya: A systematic review and meta-analysis. **International Journal on Infectious Diseases**. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.04.4256>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

LANCIOTTI, R. S. et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 3, p. 545–51, mar. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372617>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, 8 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24506907>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections**, 2015. .

LIMA MARTINS, H. A. de et al. Depression, anxiety, and hopelessness in patients with chikungunya fever in Brazil. **Journal of Neuroinfectious Diseases**, v. 07, n. 04, p. 1–2, 29 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.omicsonline.com/open-access/depression-anxiety-and-hopelessness-in-patients-with-chikungunya-fever-in-brazil-2314-7326-1000236.php?aid=84326>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

LO PRESTI, A. et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya

virus: An updating review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 270–278, jul. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134816301320>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

LOHACHANAKUL, J. et al. 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. **Microbiology and Immunology**, v. 56, n. 2, p. 134–138, 1 fev. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.2011.00417.x>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A.-B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005698, 29 jun. 2017. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005698>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**. Elsevier B.V., , 26 jun. 2015. .

LYRA, P. et al. Congenital Chikungunya virus infection after an outbreak in Salvador, Bahia, Brazil. **American Journal of Perinatology Reports**, v. 06, n. 03, p. e299–e300, 22 ago. 2016.

MANIERO, V. C. et al. Dengue, Chikungunya e Zika vírus no Brasil: situação epidemiológica, aspectos clínicos e medidas preventivas. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa**, v. 1, n. 1, 19 ago. 2016. Disponível em: <<http://publicacoes.unigranrio.edu.br/index.php/amp/article/view/3409/0>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

MARQUES, C. D. L. et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 – Diagnosis and special situations. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, p. 421–437, 2017a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2255502117300469>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

MARQUES, C. D. L. et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 – Diagnosis and special situations. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, p. 421–437, 2017b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2255502117300469>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 238–240, 1957.

MATUSALI, G. et al. Tropism of the Chikungunya Virus. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 175, 20 fev. 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/175>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

MCCARTHY, M. K.; DAVENPORT, B. J. J.; MORRISON, T. E. **Chronic Chikungunya Virus Disease**. In: [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 2018. p. 1–26.

MISHRA, B.; RATHO, R. K. Chikungunya re-emergence: possible mechanisms. **Lancet (London, England)**, v. 368, n. 9539, p. 918, 9 set. 2006. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962879>>. Acesso em: 7 maio. 2019.

MOSTAFAVI, H. et al. Arthritogenic alphavirus-induced immunopathology and targeting host inflammation as a therapeutic strategy for alphaviral disease. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 290, 22 mar. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/3/290>>. Acesso em: 31 maio. 2019.

MOTA, M. T. de O. et al. Mosquito-transmitted viruses – the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 38–50, dez. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1517838216310425>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

MURILLO-ZAMORA, E. et al. Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 41, 2017.

MUSSO, D. et al. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e355–e361, 1 nov. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991830269X?via%3Dihub#bib16>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

NG, L. F. P. et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, p. e4261, 21 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156204>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

NUCKOLS, J. T. et al. Evaluation of simultaneous transmission of Chikungunya Virus and dengue virus type 2 in infected aedes aegypti and aedes albopictus (Diptera: Culicidae). **Source: Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 3, p. 447–451, 2015. Disponível em: <www.bioone.org>. Acesso em: 27 maio. 2020.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 abr. 2015a. Disponível em: <<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0348-x>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 30 dez. 2015b. Disponível em: <<http://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0348-x>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

OLIVEIRA, C. R. et al. Influenza-like illness in an urban community of Salvador, Brazil: incidence, seasonality and risk factors. **BMC Infectious Diseases**, 2016.

OLIVEIRA, R. de M. A. B. et al. Maternal and infant death after probable vertical transmission of chikungunya virus in Brazil -case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, 16 jul. 2018.

OZDEN, S. et al. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e527, 13 jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565380>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

PAHO. **Epidemic Diseases - Chikungunya in the Americas**. Disponível em: <https://ais.paho.org/hiph/viz/ed_chikungunya_amro.asp>. Acesso em: 27 maio. 2020.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, v. 3, n. Suppl 1, p. e000530, 1 jan. 2018. Disponível em:

<<http://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2017-000530>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Informação para profissionais de saúde Febre de Chikungunya Antecedentes**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/documents/>. Acesso em: 5 maio. 2019.

PETITDEMANGE, C. et al. Longitudinal analysis of natural killer cells in dengue virus-infected patients in comparison to Chikungunya and Chikungunya/Dengue virus-infected patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, 3 mar. 2016.

POH, C. M.; CHAN, Y.-H.; NG, L. F. P. Role of T Cells in Chikungunya Virus infection and utilizing their potential in anti-viral immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 21 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00287/full>>. Acesso em: 13 mar. 2020.

POWERS, A. M. Chikungunya. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 209–219, 1 mar. 2010. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272271209001206?via%3Dihub>>.

Acesso em: 7 maio. 2019.

QUEYRIAUX, B. et al. Clinical burden of chikungunya virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, 2008. .

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 89–96, fev. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/j.trstmh.2009.07.031>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

RAMFUL, D. et al. Mother-to-Child Transmission of Chikungunya Virus Infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 26, n. 9, p. 811–815, set. 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17721376>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

RIBEIRO, G. S. et al. Does immunity after Zika virus infection cross-protect against dengue? **The Lancet Global Health**, 2018.

RODRIGUES, N. C. P. et al. Temporal and spatial evolution of dengue incidence in Brazil, 2001-2012. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0165945, 10 nov. 2016. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0165945>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America?

Rheumatology International, v. 35, n. 12, p. 2091–2094, 5 dez. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045218>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

ROUGERON, V. et al. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 144–152, 1 mar. 2015.

RUSSO, R. C. et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Review of Clinical Immunology** Expert Reviews Ltd., , maio 2014. .

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678812>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

SÁ, P. K. de O. et al. Chikungunya virus infection with severe neurologic manifestations: report of four fatal cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 2, p. 265–268, mar. 2017. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822017000200265&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 4 maio. 2019.

SALVADOR. SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE SALVADOR. Boletim SMS_DVIS N°13_2018 - **Boletim de Arboviroses** - Disponível em:

<<http://www.cievs.saude.salvador.ba.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

SANTIAGO, G. A. et al. Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2018.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23556021>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

SCHNIERLE, B. S. Cellular attachment and entry factors for chikungunya virus. **Viruses** MDPI AG, , 19 nov. 2019. .

SEO, S. H.; WEBSTER, R. G. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. **Journal of Virology**, v. 76, n. 3, p. 1071–1076, 1 fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773383>>. Acesso em: 25 abr. 2020.

SILVA-FILHO, J. L.; CARUSO-NEVES, C.; PINHEIRO, A. A. S. IL-4: An important cytokine in determining the fate of T cells. **Biophysical Reviews** Springer, , mar. 2014. . Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25427811/>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, 1 mar. 2017. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28248203>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

SILVA, M. M. O. et al. Accuracy of dengue reporting by national surveillance system, Brazil. **Emerging Infectious Diseases** Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 1 fev. 2016. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/gut.50.2.273>>. Acesso em: 27 ago. 2020.

SILVA, M. M. O. et al. Concomitant transmission of dengue, chikungunya, and zika viruses in brazil: clinical and epidemiological findings from surveillance for acute febrile illness. **Clinical infectious diseases**, v. 69, n. 8, p. 1353–1359, 27 set. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30561554>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

SIMARMATA, D. et al. Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26097, 16 set. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep26097>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

SIMIÃO, A. R. et al. A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 2, p. 78–88, mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412934>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

SISSOKO, D. et al. Post-epidemic Chikungunya disease on reunion island: Course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2009.

SNYDER, J. E. et al. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8511, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720714>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

SOARES-SCHANOSKI, A. et al. Systems analysis of subjects acutely infected with the Chikungunya virus. **PLoS Pathogens**. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g001>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

SOUZA, T. M. L. et al. Emergence of the East-Central-South-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2760, 26 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-39406-9>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

STAPLES, E.J; HILLS, S. L. . P. A. M. **Chikungunya. Chapter 3. 2018 Yellow Book | Travelers' Health | CDC**. Disponível em: <<https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2018/infectious-diseases-related-to-travel/chikungunya>>. Acesso em: 6 maio. 2019.

SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.-C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420–429, 8 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrrheum.2012.64>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

TANABE, I. S. B. et al. Cellular and molecular immune response to Chikungunya Virus infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 345, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30364124>>. Acesso em: 5 maio. 2019.

TANABE, I. S. B. et al. Cytokines and chemokines triggered by Chikungunya virus infection in human patients during the very early acute phase. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 11, p. 730–733, 1 nov. 2019.

TAURO, L. B. et al. A localized outbreak of Chikungunya virus in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 0, 28 fev. 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762019000100402&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 4 maio. 2019.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), , 2015. .

TENG, T.-S. et al. A Systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute Chikungunya Virus Infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, n. 12, p. 1925–35, 15 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25635123>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

VAIRO, F. et al. **Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. Infectious Disease Clinics of North America**W.B.

Saunders, , 1 dez. 2019. .

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. et al. Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion. **Viruses**, MDPI AG, , 7 jul. 2015. .

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, v. 120, p. 32–39, ago. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166354215001084>>. Acesso em: 4 maio. 2019.

WILMER VILLAMIL-GÓMEZ, by et al. Congenital Chikungunya Virus Infection in Sincelejo, Colombia: A Case Series. **Journal of Tropical Pediatrics**, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/tropej/article-abstract/61/5/386/1648030>>. Acesso em: 27 maio. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO | Chikungunya. **WHO**, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/denguecontrol/arbo-viral/other_arboviral_chikungunya/en/>. Acesso em: 4 maio. 2019.

YOSHIMURA, T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: A foe or ally? **Cellular and Molecular Immunology**, Chinese Soc Immunology, , 1 abr. 2018. .

ANEXOS

Anexo 1- Roteiro de contato telefônico – Abordagem aos participantes

Anexo 2 - Roteiro de contato telefônico 2 – Log de registro de contato e



Projeto: Marcadores genéticos e imunológicos durante infecções causadas por arbovirus

Pesquisador responsável: Guilherme S. Ribeiro

ROTEIRO DE CONTATO TELEFÔNICO - PARTE 1

Abordagem aos participantes durante o contato telefônico para obtenção de consentimento

Bom dia.

Quem está falando é _____. Estou entrando em contato em nome da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). No dia _____, quando o senhor(a) buscou atendimento Pronto Atendimento de São Marcos em Pau da Lima, o senhor(a) concordou em participar de uma pesquisa da FIOCRUZ e nós coletamos seu sangue para investigar se sua doença era causada por dengue, Zika ou chikungunya.

Nós ainda temos um pouco do seu sangue armazenado em nosso laboratório na FIOCRUZ e estamos solicitando a sua autorização para utilizá-lo para uma nova pesquisa. Essa nova pesquisa tem o objetivo de compreender como o organismo das pessoas responde quando são infectadas pelos vírus da dengue, Zika e chikungunya. Se o senhor(a) concordar, vamos fazer alguns exames no seu sangue e no de várias outras pessoas que tiveram suspeita dessas doenças para compreender melhor como o corpo delas responde a essas infecções.

Os exames que vamos realizar não são para diagnosticar novas doenças e, por isso, o senhor(a) não terá qualquer ganho ou prejuízo pela realização desses novos exames. Nós não usaremos seu sangue para outras finalidades diferentes da que estamos solicitando. Também não vamos divulgar o seu nome como participantes dessa pesquisa. Apesar de você não ter um benefício direto, o resultado dessa pesquisa poderá contribuir no futuro para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da dengue, Zika e chikungunya, podendo evitar a ocorrência de casos graves e de mortes.

É importante nós repetirmos que se o senhor(a) aceitar participar, o senhor(a) não precisará passar por uma nova coleta de sangue, pois nós usaremos a sobra de seu sangue da coleta que fizemos anteriormente.

O senhor (a) concorda que utilizemos a amostra de sangue que temos armazenada para esse novo estudo?

O senhor possui alguma dúvida ou gostaria de algum esclarecimento adicional?

