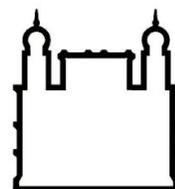




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA HUMORAL NA PROGRESSÃO DA  
DOENÇA ARTRALGIA CRÔNICA CAUSADA PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA  
(CHIKV)**

**ISABELE DE PÁDUA CARVALHO**

**Salvador – Bahia  
2021**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA HUMORAL NA PROGRESSÃO DA  
DOENÇA ARTRALGIA CRÔNICA CAUSADA PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA  
(CHIKV)**

**ISABELE DE PÁDUA CARVALHO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Patologia Experimental e Humana para a  
obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Khouri

**Salvador – Bahia**

**2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**C331a** Carvalho, Isabele de Pádua.

Avaliação do papel da resposta humoral na progressão da doença artralgia crônica causada pelo vírus chikungunya (CHIKV)/ Isabele de Pádua Carvalho. \_ Salvador, 2021.

52 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Khouri

Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Vírus Chikungunya. 2. Fase crônica. 3. Progressão da artralgia.  
4. Resposta humoral. I. Título.

CDU 616.91

**“AVALIAÇÃO DO PAPEL DA RESPOSTA HUMORAL NA PROGRESSÃO DA  
DOENÇA ARTRALGIA CRÔNICA CAUSADA PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA  
(CHIKV)”.**

**ISABELE DE PÁDUA CARVALHO**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 20 de dezembro de 2021.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

Dr. Rodrigo Haddad  
Professor  
UNB



---

Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brasil (CNPq) – Código de Financiamento 001”

A Deus, a minha família por todo amor, carinho e  
incentivo

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu Pai Celestial, pelo amor incondicional e por sempre me ensinar mais e mais que a vontade Dele sempre é boa, agradável e perfeita e Ele está no controle de tudo!

A minha família meus pais (Danilo e Jane) e irmãos (Daniele e Josué).

Meu avô José Eduardo Casaes (em memória) e minha avó Isabel Casaes e, tia Meirinha sim! Meus tios e tias. Por todo incentivo, apoio e palavras de encorajamento. Amo vocês!

Ao Professor Dr. Ricardo Khouri por todo ensinamento, orientações e aprendizados na minha caminhada na Pesquisa.

À Professora Dra. Luciane (Tika) por todo o incentivo, orientação e por me apresentar a Pesquisa lá na graduação.

Agradeço a cada membro da equipe do Professor Ricardo por contribuir na minha formação acadêmica saibam que cada um fazem parte dessa caminhada.

Ao Laboratório LEITV e LIB, e a todos os funcionários que fazem a Fiocruz acontecer.

A FIOCRUZ-Bahia/IGM, por oferecer todo o suporte acadêmico que tanto contribuiu para meu amadurecimento científico.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

**(Josué 1:9)**

CARVALHO, Isabele de Pádua. Avaliação do papel da resposta humoral na progressão da doença artralgia crônica causada pelo vírus chikungunya (CHIKV). 2021. 52 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O vírus da Chikungunya é transmitido pelo mosquito do gênero *Aedes*. Na fase aguda da doença o indivíduo apresenta febre e dores nas articulações, a fase subaguda é caracterizada pela prolongação dos sintomas na fase aguda e, por fim, a fase crônica há persistência das dores nas articulações. Nesta fase, a grande maioria dos indivíduos infectados pelo vírus desenvolve a artralgia crônica. Com isso, o vírus da CHIKV chamou a atenção por estar associado a dor articular debilitante afetando a qualidade de vida dos indivíduos por um longo período. **OBJETIVO:** Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da resposta humoral na progressão para artralgia crônica causada pelo Vírus da Chikungunya. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Nós empregamos o método de diagnóstico através do ELISA (IgM e IgG) e PRNT50, PRNT80 e PRNT90 sendo um teste sensível e específico, respectivamente. **RESULTADOS:** Analisamos a cinética de produção de anticorpos IgM e IgG ao longo da progressão da doença pelo ELISA e investigamos a relação desses anticorpos neutralizantes quanto à progressão da doença através do PRNT50, PRNT80 e PRNT90. Com isso, a resposta se mantém após 2 anos e foi constatado que existe uma resposta neutralizante nos primeiros dias de infecção no PRNT50. **CONCLUSÕES:** Existe uma resposta de neutralização nos primeiros dias da doença que impedem que o indivíduo infectado desenvolva artralgia crônica observado no PRNT50.

**Palavras-chave:** Vírus Chikungunya. Fase crônica. Progressão da artralgia. Resposta humoral.

CARVALHO, Isabele de Pádua. Evaluation of the role of the humoral response in the progression of arthralgia disease caused by the Chikungunya virus. 2021. 52 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The Chikungunya virus is transmitted by the Aedes mosquito. In the acute phase of the disease, the individual has fever and joint pain, the subacute phase is characterized by the prolongation of symptoms in the acute phase and, finally, the chronic phase in which joint pain persists. At this stage, the vast majority of individuals infected with the virus develop chronic arthralgia. Thus, the CHIKV virus drew attention for being associated with debilitating joint pain affecting the quality of life of individuals for a long period. **OBJECTIVE:** Given the above, the aim of this study was to evaluate the role of the humoral response in the progression to chronic arthralgia caused by the Chikungunya Virus. **MATERIALS AND METHODS:** We employ the diagnostic method through ELISA (IgM and IgG) and PRNT50, PRNT80 and PRNT90 being a sensitive and specific test, respectively. **RESULTS:** We analyzed the kinetics of IgM and IgG antibody production along disease progression by ELISA and investigated the relationship of these neutralizing antibodies to disease progression through PRNT50, PRNT80 and PRNT90. Thus, the response is maintained after 2 years and it was found that there is a neutralizing response in the first days of infection in PRNT50. **CONCLUSIONS:** There is a neutralization response in the first days of the disease that prevents the infected individual from developing chronic arthralgia observed in PRNT50.

**Key words:** Chikungunya virus. Phase chronic. Progression arthritis. Humoral response.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo de Transmissão de CHIKV. ....	19
<b>Figura 2</b> - Genoma e estrutura do vírus.....	21
<b>Figura 3</b> - Relações filogenéticas entre isolados dos quatros genótipos do CHIKV.....	22
<b>Figura 4</b> - Esquema da replicação de CHIKV.....	23
<b>Figura 5</b> - Fluxograma da coorte do estudo.....	35
<b>Figura 6</b> - Cinética dos anticorpos IgM (A) e IgG (D) contra CHIKV no plasma de indivíduos infectados.....	38
<b>Figura 7</b> - Títulos de proteção de anticorpos do PRNT50(G), PRNT80(J) e PRNT90(M) entre os grupos crônico e não-crônico.....	40
<b>Figura 8</b> - Resposta humoral mantida por até 2 anos de infecção. ....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>Ae. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
BA	Bahia
CARDIF	Adaptador de domínio de recrutamento de ativação de caspase ( <i>Caspase Activation Recruitment Domain Adaptor</i> )
CE	Ceará
CHIKV	Vírus Chikungunya ( <i>Chikungunya Virus</i> )
CCL2	Ligante 2 de quimiocina com motivo C-C ( <i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i> )
CCL3	Ligante 3 de quimiocina com motivo C-C ( <i>C-C Motif Chemokine Ligand 3</i> )
CCL4	Ligante 4 de quimiocina com motivo C-C ( <i>C-C Motif Chemokine Ligand 4</i> )
CCL5	Ligante 5 de quimiocina com motivo C-C ( <i>C-C Motif Chemokine Ligand 5</i> )
Células NK	Células exterminadoras naturais ( <i>Natural Killer</i> )
CLR	Receptor de lectina de tipo C ( <i>C-type lectin receptor</i> )
CXCL9	Ligante 9 de quimiocina com motivo C-X-X ( <i>C-X-X Motif Chemokine Ligand 9</i> )
CXCL10	Ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-X ( <i>C-X-X Motif Chemokine Ligand 10</i> )
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos ( <i>Damage-associated molecular patterns</i> )
dsRNA	Dupla fita de RNA ( <i>Double-stranded RNA</i> )
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
FBS	Soro Bovino Fetal ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocitárias ( <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> )
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulócitos e Macrófagos ( <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )

IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgM	Imunoglobulina M ( <i>Immunoglobulin M</i> )
IgG	Imunoglobulina G ( <i>Immunoglobulin G</i> )
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-27	Interleucina 27
IL-29	Interleucina 29
Kb	Kilobases
MAC-ELISA	Teste imunoenzimático de captura de anticorpos da classe IgM ( <i>IgM Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
MAVS	Sinalização antiviral mitocondrial ( <i>Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein</i> )
nm	Nanômetro
NLR	Receptor do tipo NOD ( <i>NOD like receptor</i> )
NLRP-3	Receptor do tipo NOD tipo 3
nsP	Proteína não-estrutural ( <i>Non-Structural Protein</i> )
ORF	Quadro aberto de leitura ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAHO	<i>Pan American Health Organization</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
PFU	Unidade formadora de Placa ( <i>Plaque Form Unit</i> )

PRNT	Teste de Neutralização por Redução de Lise ( <i>Plaque Reduction Neutralization Test</i> )
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões ( <i>Pattern Recognition Receptors</i> )
RIG-I	Receptor do tipo RLR ao gene I induzível por ácido retinóico ( <i>Retinoic acid-inducible gene I</i> )
RLRs	Receptor do tipo RIG ( <i>RIG-I-like receptor</i> )
RT-qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase em Transcrição Reversa quantitativa ( <i>Quantitative Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction</i> )
ROP	Dor retro-orbital ( <i>Retroocular pain</i> )
ssRNA	Fita simples de RNA ( <i>Single-stranded RNA</i> )
TLR3	Receptores do tipo <i>Toll-like 3</i> ( <i>Toll-like receptor 3</i> )
TLR7	Receptores do tipo <i>Toll-like 7</i> ( <i>Toll-like receptor 7</i> )
TLR8	Receptores do tipo <i>Toll-like 7</i> ( <i>Toll-like receptor 8</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa ( <i>Tumour Necrosis Factor Alpha</i> )
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

## LISTA DE URLS

SHERA [www.sheracalculator.com/shera](http://www.sheracalculator.com/shera)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	HISTÓRICO DA TRANSMISSÃO DO CHIKV NO MUNDO E EPIDEMIOLOGIA ..	17
1.2	CICLO DE TRANSMISSÃO.....	19
1.3	ESTRUTURA VIRAL E FILOGENIA .....	20
1.4	CICLO DE REPLICAÇÃO .....	22
1.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: FASE AGUDA, SUBAGUDA E CRÔNICA.....	23
1.6	IMUNOPATOGÊNESE.....	25
1.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	26
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	29
2.1	HIPÓTESE .....	29
2.2	OBJETIVOS.....	29
2.2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	29
2.2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	29
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
3.1	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA .....	30
3.2	TIPO DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	30
3.3	LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAS .....	30
3.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	30
3.5	DETECÇÃO SOROLÓGICA .....	31
3.6	MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR PARA OS ENSAIOS DE PRNT.....	31
3.7	PREPARAÇÃO DOS ESTOQUES DO VÍRUS CHIKV PARA OS ENSAIOS DE PRNT .....	32
3.8	TITULAÇÃO DO VÍRUS CHIKV PARA OS ENSAIOS DE PRNT .....	32
3.9	TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE LISE (PRNT).....	33
3.10	CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE E NEGATIVIDADE NO PRNT .....	33
3.11	VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS .....	34
3.12	DEFINIÇÃO DE CRONICIDADE DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS POR CHIKV	34
3.13	CALCULADORA <i>SHERA</i> .....	34
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 HISTÓRICO DA TRANSMISSÃO DO CHIKV NO MUNDO E EPIDEMIOLOGIA

As primeiras epidemias de CHIKV aconteceram no século XVIII, no entanto as análises desses casos foram documentadas imprecisamente como surtos de dengue (CAREY DONALD. E., 1971). A partir disso, o primeiro caso de emergência do vírus CHIKV registrado no ciclo urbano foi no período de 1879 e 1956 (WEAVER; LECUIT, 2015).

No século XX, a epidemia do vírus CHIKV foi descrita pela primeira vez em 1952 e notificado no Instituto de Pesquisa de Vírus localizado na Tanzânia, anteriormente chamado Tanganica, em 1953 (LUMSDEN, 1955). A modificação do nome deveu-se a fundição da região Tanganica a região Zanzibar dando origem ao nome Tanzânia. De acordo com a língua do povo Makonde, localizado na Tanzânia, foi originado o nome *chikungunya* cujo significado é “aquele que se dobra” devido às contorções ocasionadas pela dor nos indivíduos acometidos pela doença (GANESAN; DUAN; REID, 2017) (MASON; HADDOW, 1957).

As epidemias de CHIKV, entre as décadas de 1960 e 1970 foram restritas aos países da África Central, Ocidental, Sul e o Sudeste Asiático desencadeada pelo genótipo da África Oriental, Central e Sul (ECSA) (WEAVER; LECUIT, 2015). Os países acometidos por essa epidemia foram: a África do Sul, República Democrática do Congo, Uganda, Indonésia, Tailândia e Índia, respectivamente (SERGON *et al.*, 2005). No ano de 1998, foi registrado na Malásia o primeiro surto de CHIKV (LARAS *et al.*, 2005).

No século XXI, em 2004, aconteceu um grande surto de CHIKV iniciada em Lamu, Quênia, localizado na África Oriental (SILVA JR, *et al.*, 2018). Durante esta epidemia, o vírus CHIKV espalhou-se por Mombaça, Quênia, e pelas ilhas Comores, país insular da África, e outras ilhas do Oceano Índico incluindo a ilha *La Réunion*, França (CUNHA *et al.*, 2020). No período de março de 2005 e abril de 2006 foram reportados 244.000 casos (TANABE *et al.*, 2018).

Durante a epidemia *La Réunion* foi observado uma mutação adaptativa, a qual substituiu o aminoácido alanina pela valina na posição 226 E1-A226V, na glicoproteína E1 do envelope viral (TUEKPRAKHON *et al.*, 2018). Isto permitiu uma adaptação no mosquito *Ae. Albopictus* que favoreceu a dissipação viral em regiões como Itália e França no ano de 2010 e 2014 (TSETSARKIN *et al.*, 2007).

No ano de 2013, o primeiro caso de transmissão autóctone de CHIKV ocorreu nas ilhas de *Saint Martin* e *Martinique* e as transmissões do vírus foi através do mosquito *Aedes aegypti* por várias ilhas caribenhas, tais como Dominica, Anguilla e ilhas das Virgens Britânicas e o número de pessoas infectadas foram mais de 30.000 casos em 4 meses (CUNHA *et al.*, 2020). A cepa que circulou nas ilhas caribenhas é pertencente ao genótipo Asiático e está relacionado com as cepas que circularam na Indonésia em 2007 (LANCIOTTI *et al.*, 2007).

Em 2014, aconteceu o primeiro caso de CHIKV na Guiana Francesa, no continente Sul-Americano e espalhou-se por todo o território. Neste mesmo período até 2015 foram mais de 16.000 indivíduos infectados no país. É importante salientar que vários casos atípicos, por exemplo, distúrbios neurológicos, insuficiência cardiorrespiratória, hepatite aguda, distúrbios renais e comprometimento muscular foram apresentados nesta epidemia (BONIFAY *et al.*, 2018).

Ainda em 2014, o primeiro caso autóctone no Brasil desencadeado pela cepa ECSA aconteceu na cidade de Feira de Santana região do nordeste brasileiro. Em setembro do mesmo ano, o primeiro local de transmissão foi no Oiapoque, localizado no estado do Amapá, região norte do país, e estava relacionado com a linhagem asiática. Os genótipos asiáticos e ECSA co-circularam no Norte e regiões do Nordeste do Brasil (NUNES *et al.*, 2015).

Em 2016, o genótipo ECSA foi espalhado para outros estados brasileiros, tais como Alagoas e Paraíba sendo uma ameaça à saúde pública, principalmente, devido à co-circulação de outros arbovírus, como a dengue e zika, transmitida pelo mesmo vetor (CHARLYS DA COSTA *et al.*, 2017). No mesmo ano, o genótipo ECSA foi isolado na região sudeste do Brasil, no estado do Rio de Janeiro (CUNHA *et al.*, 2017).

Desde então, o número de casos de Chikungunya no Brasil aumentaram 38.332 casos prováveis em 2015 segundo os dados da Semana Epidemiológica, destes foram confirmados 13.236 (BRASIL, 2016). Em 2016 foram registrados 277.882 casos prováveis, destes 151.101 foram confirmados. Em 2017, 185.593 casos prováveis de febre de Chikungunya (BRASIL, 2017b) e no ano de 2018 foram 80.010 casos prováveis, destes 59.584 confirmados (BRASIL, 2018).

No ano de 2019, 59.215 casos prováveis de infecção pelo vírus Chikungunya (BRASIL, 2020). Em 2020, foram 19.593 casos prováveis de infecção pelo vírus Chikungunya. Em 2021, na região Nordeste foi notificado 7.778 casos prováveis (BRASIL, 2021).

No entanto, como desde fevereiro de 2020, o Brasil enfrenta a pandemia do COVID-19, observou-se uma diminuição dos registros de casos prováveis. Isto pode ser devido a uma subnotificação ou atraso nas notificações das arboviroses (BRASIL, 2021).

## 1.2 CICLO DE TRANSMISSÃO

O CHIKV é transmitido em dois diferentes ciclos: o urbano e silvestre ou enzoótico (GANESAN; DUAN; REID, 2017). O ciclo silvestre existe, principalmente, na África entre primatas não-humanos, roedores, morcegos, babuínos e macacos (Figura 1).

A transmissão de CHIKV, no ciclo silvestre, envolve várias espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, tais como *Ae africanus*, *Ae furcifer-taylori* e *Ae dalzieli* (THIBOUTOT *et al.*, 2010). A espécie *Ae furcifer-taylori* transmite para o macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Os macacos verdes africanos e babuínos foram sugeridos como hospedeiros importantes de replicação viral, juntamente, com as outras espécies de vertebrados (TSETSARKIN *et al.*, 2007).

O ciclo urbano é iniciado quando uma pessoa entra em contato ou vive perto das florestas africanas ocorrendo, assim, a infecção nos seres humanos. Estes atuam como os principais hospedeiros. As fêmeas dos mosquitos das espécies *Ae aegypti* e *Ae albopictus* são os principais vetores deste ciclo, porque adaptaram-se ao ambiente antrópico de modo que os recipientes de água utilizadas como locais de oviposição e os humanos como fonte de sangue e nutrição (TSETSARKIN *et al.*, 2011). Aumento de viagens aéreas, a migração humana, urbanização comércio internacional, mudanças climáticas favoreceu a disseminação destas espécies para diferentes regiões tropicais e subtropicais do mundo, tornando-se o principal vetor de CHIKV mundialmente (TSETSARKIN *et al.*, 2011) (HUIITS *et al.*, 2018).

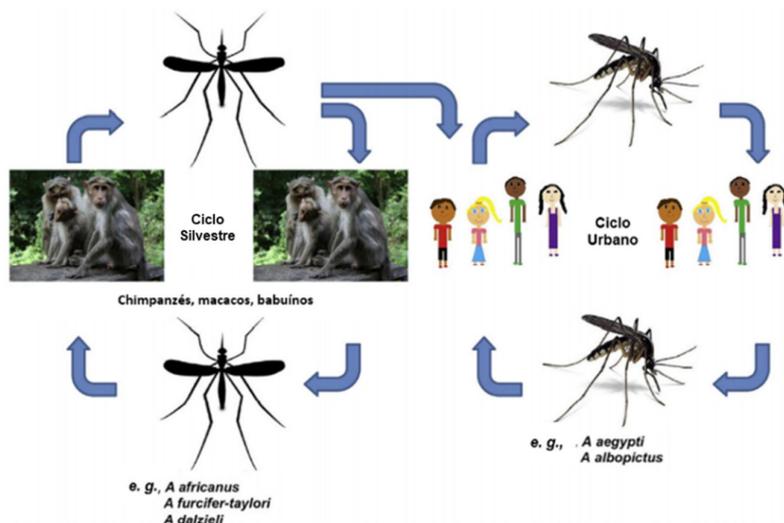


Figura 1 - Ciclo de Transmissão de CHIKV. Primatas não humanos como reservatório do vírus. As fêmeas dos mosquitos do gênero *Aedes* infectados pelo CHIKV através da picada infectam os humanos. Os humanos infectados, infectam o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* perpetuando o ciclo de transmissão do CHIKV.

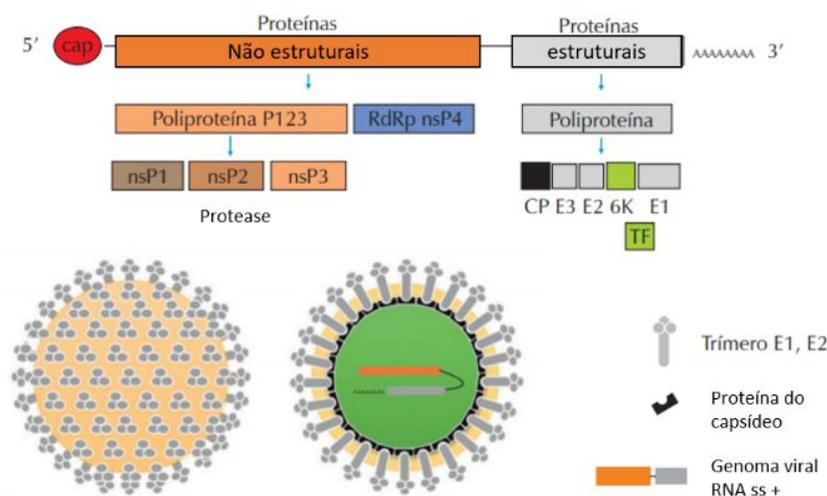
**Fonte:** Adaptado de THIBOUTOT *et al.* (2010).

### 1.3 ESTRUTURA VIRAL E FILOGENIA

O CHIKV é pertencente à família *Togaviridae* e possui o diâmetro de 65 a 70 nm e faz parte do gênero *Alphavirus* (WESTAWAY, 1985). O gênero *Alphavirus* é subdividido em Velho Mundo e Novo Mundo (WESTAWAY, 1985) (BAXTER *et al.*, 2021). O vírus CHIKV está incluído na subdivisão do Velho Mundo, assim como, o vírus Ross River (RRV), o vírus Mayaro (MAYV), o vírus Semliki Forest (SFV), o vírus Sindbis (SINV) e o vírus O'nyong-nyong (ONNV) os quais causam doenças inflamatórias agudas musculoesqueléticas e os sintomas clínicos são febre, rash e artrite (BAXTER *et al.*, 2021). A subdivisão do Novo Mundo inclui o vírus da encefalite equina venezuelana e Ocidental responsáveis por causar doenças neurológicas (HOLMES *et al.*, 2020) (BAXTER *et al.*, 2021).

O vírus é envelopado, constituído pela bicamada fosfolipídica derivada da célula hospedeira permeado pelas glicoproteínas virais de superfície, E1 e E2. Internamente, o vírus possui um nucleocapsídeo icosaédrico que reveste o material genético viral, formado por um RNA fita simples, senso-positivo e comprimento de aproximadamente 12-kb (STRAUSS; STRAUSS, 1994). O genoma contém dois quadros de leitura (ORFs) que cada um codifica uma poliproteína.

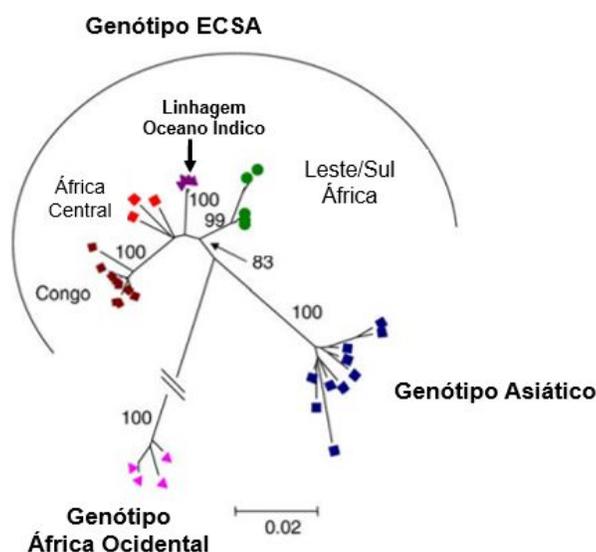
A primeira poliproteína, localizado à 5' do genoma com o cap 7-metilguanossina, codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) necessárias para a replicação (Figura 2) (YAP *et al.*, 2017). A segunda poliproteína, localizado à 3' do genoma com a cauda poliadenilada, dá origem a cinco proteínas estruturais – capsídeo (C), glicoproteínas estruturais do envelope E1, E2, E3 e 6K relacionadas com a entrada do vírus na célula hospedeira, montagem e brotamento do vírus na célula do hospedeiro (ORTEGA-SOTO; ARELLANO-ANAYA Z; BARRÓN B, 2017).



**Figura 2 - Genoma e estrutura do vírus.** O genoma viral de CHIKV é RNA de fita simples de sentido positivo contendo duas estruturas de leitura aberta (ORFs); o primeiro codifica uma poliproteína que dá origem em proteínas não estruturais e a segunda em proteínas estruturais. CHIKV é um vírus envelopado cuja membrana contém as glicoproteínas E1 e E2 formando espículas em trímeros em sua superfície, o capsídeo é icosaédrico pela proteína chamada C. **Fonte:** Adaptado de ORTEGA-SOTO; ARELLANO-ANAYA Z; BÁRRON B (2017).

De acordo com as análises filogenéticas (Figura 3), foram identificados quatro genótipos principais de CHIKV: (I) o genótipo da África Ocidental, (II) o genótipo asiático, (III) o genótipo centro-leste-sul africano (ECSA) e (IV) o genótipo da linhagem do Oceano Índico (IOL) (NAVECA *et al.*, 2019). A nomeação de cada genótipo está relacionada com a sua distribuição geográfica. O genótipo da África Ocidental foi originalmente isolado dos países Senegal e Nigéria (POWERS *et al.*, 2000). O genótipo Asiático foi isolado da região Sudeste da Ásia (ROSSINI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

O genótipo ECSA originalmente faz parte do ciclo enzoótico, mas não foi possível o esclarecimento quanto à introdução no ciclo urbano (POWERS *et al.*, 2000). Por fim, o genótipo Oceano Índico (IOL) é originário do genótipo ECSA sendo uma nova linhagem (ROSSINI; LANDINI; SAMBRI, 2016).



**Figura 3** - Relações filogenéticas entre isolados dos quatro genótipos do CHIKV. A descendência da linhagem Oceano Índico a partir do genótipo ECSA. Os valores numéricos indicam reamostragem por *bootstrap*. Fonte: Adaptado de SCHUFFENECKER *et al.* (2006).

#### 1.4 CICLO DE REPLICAÇÃO

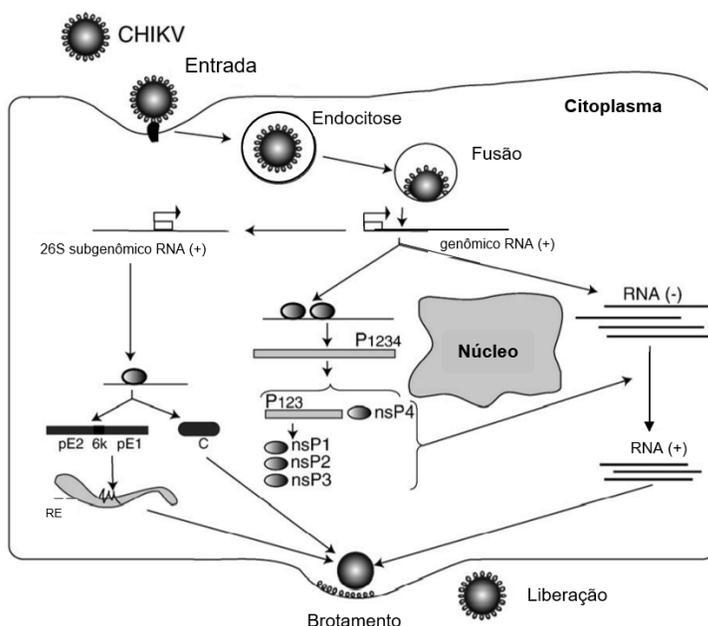
O ciclo de replicação do CHIKV, assim como em outros arbovírus, consiste na ligação da glicoproteína E2 do vírus aos receptores, tais como glicosaminoglicanos, proibirina (PHB) e CD209 expressas na superfície da célula hospedeira do mamífero (MATUSALI *et al.*, 2019) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Com isso, o vírus é endocitado numa vesícula mediada por clatrina formando o endossomo e entra no citoplasma da célula hospedeira, onde será replicado (SOLIGNAT *et al.*, 2009).

No endossomo acontece o processo de reorganização estrutural das glicoproteínas E1 e E2 do vírus desencadeada pela acidificação, por consequência do pH baixo. Por meio disso, a glicoproteína E1 torna-se instável e a membrana viral se funde com a membrana plasmática do endossomo e ocorre a liberação do nucleocapsídeo e do genoma viral (SILVA JR *et al.*, 2018) (CUNHA *et al.*, 2020).

No citoplasma, o nucleocapsídeo se desintegra e libera o RNA viral para tradução da poliproteína não estrutural P1234 que é clivado pela protease codificada do vírus dando origem as proteínas não-estruturais nsP1-nsP4. A proteína não estrutural nsP1 está relacionado na síntese da fita negativa do RNA viral e é responsável pelo capeamento do RNA (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). nsP2 exibe a RNA helicase, RNA trifosfatase e atividades de proteinase envolvidas no desligamento da transcrição da célula hospedeira (SCHWARTZ; ALBERT,

2010). nsP3 é responsável pela replicase e nsP4 é a RNA polimerase. Por isso, o conjunto das proteínas não-estruturais nsP1-4 formam o complexo de replicação viral (CUNHA *et al.*, 2020).

O RNA de sentido negativo é a fita molde para o RNA de sentido positivo. Isso é o modelo de RNA subgenômico (26S) e genômico (49S). O RNA subgenômico conduz a expressão da poliproteína C-pE2-6K-E1 a qual é processado por uma serina protease autoproteolítica. As proteínas pE2 é transportado para o complexo de Golgi, onde é clivado em E2 e E3 (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A montagem viral é realizada pela ligação do ácido nucléico e o capsídeo (C) formando os novos nucleocapsídeos com genomas recém-sintetizados por uma única molécula do genoma de RNA. Em seguida ocorre o brotamento das partículas virais na célula hospedeira (Figura 4) (LEUNG; NG; CHU, 2011).



**Figura 4** - Esquema da replicação de CHIKV. Passo a passo da replicação CHIKV.

**Fonte:** Adaptado de SOLIGNAT *et al.* (2009).

## 1.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS: FASE AGUDA, SUBAGUDA E CRÔNICA

Após a picada do mosquito infectado com CHIKV, a maioria dos indivíduos acometidos pelo CHIKV apresentam doença sintomática após um período de incubação de dois a dez dias (SUHRBIER, 2012) (BAXTER *et al.*, 2021). As manifestações clínicas apresentam três fases: a aguda, subaguda e crônica. A fase aguda ou febril da doença é sintomática tendo como principal sintoma a febre de início súbito e dor articular intensa acompanhado de mialgia, náusea, vômito, poliartrite, erupção cutânea e conjuntivite. Ademais, na fase aguda da doença

tem-se observado uma alta carga viral, achados laboratoriais encontraram trombocitopenia leve, leucopenia e testes de função hepática elevados. A duração da fase aguda é de 3-10 dias (BRASIL, 2017a).

Durante a fase subaguda, normalmente, a febre desaparece, podendo ocorrer persistência ou agravamento das dores articulares que inclui poliartrite distal, exacerbação da dor articular acometido na primeira fase e tenossinovite hipertrófica subaguda em mãos, falanges, punhos e tornozelos. Nesta fase pode estar associado a astenia, prurido e exantema maculopapular, além das lesões purpúricas, vesiculares e bolhosas. Caso os sintomas persistam por mais de três meses, após o início da doença, estará instalada a fase crônica (BRASIL, 2017a).

As manifestações dos sintomas da fase crônica estão associadas com os principais fatores de risco que são idade acima de 45 anos, sexo feminino, desordem articular preexistente e maior intensidade nas dores articulares na fase aguda. O principal sintoma nessa fase é a dor articular associado as articulações atingidas durante a fase aguda. Na grande maioria, o acometimento muscular é poliarticular e simétrico, mas pode ser assimétrico e monoarticular. Durante a fase crônica manifestações como fadiga, cefaleia, exantema, tenossinovite são descritos. Essa fase é definida por sintomas que persistem por mais de três meses (BRASIL, 2017a) (WHO, 2008).

Já foi demonstrado que intensidade de sintomas na fase aguda está diretamente relacionado com a cronicidade e que a artralgia persistente ocorre com mais frequência em mulheres, indivíduos com mais de 40 anos de idade e aqueles com comorbidades preexistentes, como hipertensão.

Por este motivo, foi desenvolvido uma ferramenta intitulada *SHERA*. Esta é de fácil uso e acesso possuindo uma capacidade de predizer se o indivíduo possui risco de permanecer com dor articular de longo prazo após a infecção por CHIKV. A predição é baseado em cinco excelentes preditores que desenvolvem um sistema de pontuação como uma calculadora. A origem do nome é a letra inicial de cada um desses preditores a partir da Língua Inglesa as quais são: Sexo (*Sex -female*), Hipertensão (*Hypertension*), Edema (*Edema*), Dor retro-orbital (*Retroocular pain*) e Idade (*Age*), descrito no artigo *A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in Chikungunya disease: A cohort study*.

## 1.6 IMUNOPATOGÊNESE

O CHIKV é inoculado durante o repasto sanguíneo do mosquito fêmea previamente infectado (SRIVASTAVA *et al.*, 2020). Através da picada o vírus alcança as camadas subjacentes da pele as quais são a epiderme, derme, capilares sanguíneos e via linfática. Através da via linfática o vírus é disseminado e alcança as articulações, músculos, ossos caracterizando a doença crônica com duração maior que 3 meses (CUNHA *et al.*, 2020).

No sítio de inoculação é iniciado a replicação viral nos fibroblastos e macrófagos que são células residentes. Embora haja a infecção, as células atuam na primeira linha de defesa contra o patógeno ativando a resposta imune inata induzindo a produção do interferon do tipo I (IFN) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

A ativação da resposta imune inata é desencadeada por conta dos Receptores de Reconhecimento Padrão expressos nas células que detectam os PAMPs virais. Os PRRs envolvidos na ativação são os receptores do tipo TLRs, RLRs, NLRs e CLR (KATHRYN S. CARPENTIER AND THOMAS E. MORRISON, 2017) (MATUSALI *et al.*, 2019).

Os TLRs ativados na atividade antiviral do CHIKV são os TLR3, TLR7 e TLR8. O reconhecimento do TLR3 se dá pela presença da dsRNA que se forma em uma das etapas intermediárias da replicação viral para induzir IFN do tipo I. O reconhecimento do TLR7 e TLR8 se dá pela presença da ssRNA viral no endossomo e, assim, induz IFN do tipo I (KATHRYN S. CARPENTIER AND THOMAS E. MORRISON, 2017).

Os RLRs do tipo RIG-I reconhecem o RNA viral presente no citoplasma. A ativação do RIG-I se dá através da proteína adaptadora CARDIF, também, conhecida como MAVS para induzir IFN do tipo I (KATHRYN S. CARPENTIER AND THOMAS E. MORRISON, 2017).

O NLR do tipo NLRP3 induz a formação do inflamossoma e ativa caspase-1 que secreta citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. Essas citocinas são responsáveis pela morte celular por piroptose inerente a inflamação aguda e causa febre (BERGSBAKEN; FINK; COOKSON, 2009).

Durante a fase aguda no soro dos pacientes infectados por CHIKV há uma elevação de citocinas antivirais e pro-inflamatórias as quais são TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-27, IL-29, G-CSF, GM-CSF, CCCL2, CCCL3, CCL4, CCL5, CXCL9 e CXCL10 (BAXTER *et al.*, 2021).

Além disso, as células NK estão relacionadas no início da fase aguda devido a capacidade de atingir células infectadas por CHIKV. As NKs participam do recrutamento de linfócitos T por meio da produção de citocinas Th1 e linfócitos T CD8<sup>+</sup>. A imunidade adaptativa específica

para CHIKV é observada após a depuração viral, já que anticorpos específicos são produzidos e contribuem para a neutralização viral e/ou citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (SRIVASTAVA *et al.*, 2020).

Na fase crônica, a presença do vírus nos macrófagos e nos linfócitos T infectados podem contribuir para a persistência do vírus e o desenvolvimento de inflamação nos tecidos sinoviais. Os monócitos atuam como células reservatórias para a persistência do CHIKV e desempenham um papel importante no desenvolvimento de patologia induzida por CHIKV. Os monócitos migram para os tecidos sinoviais contribuindo para o processo inflamatório. Isso explica a persistência dos sintomas articulares, apesar do curto período de viremia (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015).

Durante a fase crônica as citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-27, GM-CSF, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL9 e CXCL10, presentes na fase aguda, permanecem elevadas no soro (CHIRATHAWORN *et al.*, 2010) (CHIRATHAWORN *et al.*, 2013). A resposta imune adaptativa celular dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> se infiltram nas articulações causando inflamação. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são responsáveis pelo inchaço, inflamação e medeia a resposta do tipo Th1 e T CD8<sup>+</sup> impulsiona a resposta IFN- $\gamma$  (HOARAU *et al.*, 2010). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> exercem, também, um papel eficiente na troca de classe de IgG.

Os anticorpos IgM e IgG são detectados no soro dos indivíduos infectados por CHIKV. Esses anticorpos neutralizantes atuam na proteção precoce contra a infecção do CHIKV e controle da disseminação do vírus por meio da neutralização direta e ativação do complemento. Caso o indivíduo infectado por CHIKV tenha uma resposta do tipo IgG3 precoce acontece uma eliminação eficiente do vírus e, assim, uma proteção contra o desenvolvimento da artralgia crônica, enquanto uma resposta tardia do tipo IgG3 pode levar a persistência da artralgia. Contudo as causas que levam à progressão da artralgia crônica ainda não está elucidado (KAM *et al.*, 2012).

## 1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico de infecção por CHIKV é baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (CAGLIOTI *et al.*, 2013). O caso torna-se provável quando o indivíduo vive ou visitou áreas epidêmicas de arboviroses. Entretanto, como as manifestações clínicas se comportam de modo bastante semelhante o diagnóstico laboratorial torna-se imprescindível para diferenciar quais os possíveis agentes etiológicos na suspeita por infecção por arboviroses

(CUNHA *et al.*, 2017). Já que o diagnóstico é um processo extremamente direto e transparente cooperando com a decisão médica (HOFFMANN *et al.*, 2014).

Sendo assim, em cada uma das fases da doença é possível aplicar uma técnica de diagnóstico. Na fase aguda, após o primeiro dia dos sintomas são feitos os testes moleculares e sorológicos (MENDOZA *et al.*, 2019). O ensaio molecular confirmatório detecta o vírus através do RT-qPCR. Esta técnica realiza o diagnóstico precoce de modo rápido e sensível, por meio da detecção do ácido nucléico viral, como a glicoproteína E1 ou nsp1 (CAGLIOTI *et al.*, 2013). No entanto, o uso dela é delimitado ao período menor que 7 dias, devido ao *clearance* viral (CUNHA *et al.*, 2017).

Os testes sorológicos são indicados a partir do terceiro e quinto dia para detecção de anticorpos específicos do tipo IgM e a partir do sexto dia para detecção de anticorpos específicos do tipo IgG. O ensaio sorológico utilizado são os testes de fluxo lateral, ELISA e PRNT. O ensaio de fluxo lateral é rápido, simples e de baixo custo e possui como princípio um sistema imunocromatográfico. O teste consiste em anticorpos imobilizados na membrana de nitrocelulose e a amostra irá fluir por capilaridade. Neste ensaio o anticorpo marcado forma um complexo com o analito que serão capturados nas linhas de teste pelo anticorpo de captura imobilizado na membrana. A visualização é observada na linha de teste (MOYANO *et al.*, 2020).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) detecta anticorpos IgM e IgG por meio da ligação do anticorpo específico ao antígeno viral imobilizado na superfície sólida (GAN; PATEL, 2013). A detecção desse complexo é revelada através do anticorpo associado à enzima e quando exposto ao substrato produz uma mudança de cor visível ou fluorescência (GAN; PATEL, 2013). A solução colorida pode ser avaliada semiquantitativamente através de leitores de densidade ótica e uma curva ou valor de referência (AYDIN, 2015).

O ensaio do PRNT detecta e quantifica os anticorpos neutralizantes, através da redução da atividade viral (AZAMI; MOI; TAKASAKI, 2016). O princípio básico consiste no plaqueamento de células suscetíveis ao vírus e na formação de complexos vírus-anticorpo (ROEHRIG; HOMBACH; BARRETT, 2008). As etapas do PRNT consistem na realização da diluição seriada das amostras de soro ou plasma antes de serem misturadas ao vírus. Este por sua vez com a quantidade padronizada de PFU e mantido constante quando incubadas ao soro ou plasma. Em seguida, as células são recobertas com um meio semissólido que restringe a propagação do vírus, fazendo com que cada vírus inicie uma infecção, conseqüentemente, uma placa (ROEHRIG; HOMBACH; BARRETT, 2008) (SALJE *et al.*, 2014).

A mensuração do efeito neutralizante se dá pela formação de placas nas células suscetíveis (AZAMI; MOI; TAKASAKI, 2016). Dessa forma, os títulos de ponto final de PRNT são detectados por meio da comparação com a concentração inicial de vírus para definir a redução percentual da infectividade viral de cada amostra de soro ou plasma. Com isso é possível calcular diversos títulos, tais como o título PRNT50, PRNT80 e PRNT90 (WHO, 2007).

Os títulos de PRNT50 são mais simples e amplamente usados para contar a redução da infectividade viral. Os títulos de PRNT90 são cortes mais altos usados para soros pós-vacinação e mais rigorosos. Por este motivo são úteis em áreas endêmicas de arboviroses para estudos epidemiológicos ou diagnósticos (WHO, 2008).

## 2 JUSTIFICATIVA

As infecções desencadeadas por arboviroses têm sido causa de doenças graves para os seres humanos, aumentando as taxas de morbidade ao redor do mundo. Neste sentido, o vírus da CHIKV chamou a atenção por estar associado a dor articular debilitante afetando a qualidade de vida dos indivíduos por um longo período (Suhrieb *et al*, 2019).

O CHIKV é um vírus artritogênico e após 12 meses do início dos sintomas as dores articulares tendem a persistir, causando desconfortos para os indivíduos acometidos pela infecção. Nesse sentido tem-se argumentado sobre a resposta humoral relacionada à progressão da artralgia crônica. Entretanto, na literatura disponível apresenta-se poucos estudos sobre a associação da resposta humoral com a progressão da artralgia crônica causada pelo Vírus da Chikungunya tornando-se necessário mais estudos que investiguem. Nessa perspectiva, nosso estudo objetiva a avaliação da resposta humoral quanto à progressão da artralgia crônica entre a comparação dos grupos crônicos *versus* não-crônicos através das técnicas de diagnóstico ELISA e PRNT.

### 2.1 HIPÓTESE

A resposta humoral está relacionada à progressão da artralgia crônica causada pelo Vírus da Chikungunya (CHIKV).

### 2.2 OBJETIVOS

#### 2.2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da resposta humoral na progressão para artralgia crônica causada pelo Vírus da Chikungunya (CHIKV).

#### 2.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a cinética de produção de anticorpos IgM e IgG ao longo da progressão da doença, comparando os indivíduos que cronificaram *versus* os indivíduos que não cronificaram;
- Investigar a relação dos anticorpos neutralizantes (PRNT) ao longo da progressão da doença, comparando os indivíduos que cronificaram *versus* os indivíduos que não cronificaram.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Revisão Institucional da Escola de Medicina – Universidade Federal da Bahia (UFBA) — Brasil (coorte de derivação - número de aprovação: 1.657.324).

#### 3.2 TIPO DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

Trata-se de um estudo do tipo coorte prospectivo realizado no período de 2016 a 2018 do projeto guarda-chuva do artigo *A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in Chikungunya disease: A cohort study*. As amostras foram coletadas nos tubos de EDTA e Heparina. A coleta foi realizada no período R0, R1 e R2. Sendo que as amostras R0 é no período de 0-5 após o início dos sintomas, as amostras R1 foram coletadas após 30-60 dias após o início dos sintomas, as amostras R2 foram coletadas após 200-300 dias do início dos sintomas. Por fim, as amostras R3 foram coletadas após 600-800 dias do início dos sintomas para acompanhar a progressão da artralgia crônica no grupo de indivíduos que cronificaram.

#### 3.3 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAS

O presente estudo foi realizado em duas cidades baianas localizadas na região norte - Campo Formoso e outra na região sul - Itabuna e uma cidade cearense que é Maranguape, localizada na região metropolitana de Fortaleza.

#### 3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

O critério de inclusão das amostras foram tempo de doença menor ou igual a 5 dias, sem coinfeção com outra arboviroses (Dengue e Zika), PCR positivo no plasma e IgM positivo para CHIKV, ter pelo menos duas amostras de seguimento (*follow-up*) e no período R2 ter a informação de fazer parte do grupo crônico e não-crônico.

### 3.5 DETECÇÃO SOROLÓGICA

A detecção dos anticorpos foi realizada através do kit de ELISA (*EuroImmuno*-Alemanha) para detecção de anticorpos IgM (EI 293a-9601 M; *EuroImmuno* AG) e IgG (EI 293a-9601 G; *EuroImmuno* AG) contra CHIKV. Cada ELISA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

A mensuração fotométrica da intensidade de cor foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm e valor de referência entre 620 nm até 30 minutos após a adição da solução de parada. A obtenção do resultado semiquantitativo foi avaliada através do cálculo do valor de absorvância do controle ou amostra do paciente pelo valor de absorvância do calibrador 2 de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Extinção do controle ou amostra do paciente}}{\text{Extinção do calibrador}} = \text{Razão}$$

Os resultados foram interpretados de acordo com as instruções do fabricante na seguinte razão:

Razão < 0,8 = **negativo**; Razão ≥ 0,8 a < 1,1 = **Bordeline**; Razão ≥ 1,1 = **positivo**.

Um caso confirmado foi definido como um teste positivo para um dos critérios laboratoriais: um positivo qRT-PCR no soro.

### 3.6 MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR PARA OS ENSAIOS DE PRNT

Nos experimentos foram utilizadas as células da linhagem Vero E6 (ATCC, CRL1586<sup>TM</sup>) derivadas do rim do macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). As células eram cultivadas em garrafas de cultivo celular (T175) a cada 2-4 dias, utilizando meio DMEM (Gibco<sup>®</sup>) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco<sup>®</sup>) e antibiótico penicilina/estreptomicina a 1% (LGC<sup>®</sup>). As garrafas foram mantidas durante todo o experimento na estufa a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), por até 30 passagens, e utilizadas para a expansão viral e no plaqueamento para a titulação viral e o teste de neutralização.

Para o plaqueamento da titulação viral e o teste de neutralização, a contagem das células Vero foi efetuada numa câmara descartável, utilizando-se o corante vital *Trypan Blue* (SIGMA<sup>®</sup>). A célula Vero foi distribuída na concentração de 200.000 células num volume de 0,5 mL em cada poço na placa de 24 poços. A experiência do LEITV no plaqueamento indica

que para melhorar a sensibilidade do teste é preciso manter a placa sob agitação no período de 2 horas a cada 30 minutos e até 24h usá-la.

### 3.7 PREPARAÇÃO DOS ESTOQUES DO VÍRUS CHIKV PARA OS ENSAIOS DE PRNT

A cepa viral de CHIKV utilizada nos experimentos foi cedida pela colaboradora Dra. Marli Tenório, pesquisadora do Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) em Pernambuco. As amostras virais passaram por um processo de expansão em células Vero com o intuito de gerar um estoque viral próprio que foi utilizado durante todas as fases experimentais. Para a produção do estoque viral as cepas foram passadas em células Vero e os sobrenadantes coletados foram titulados pelo PFU. As amostras do estoque foram mantidas em alíquotas de 1000 µL a -80°C, seguindo todas as medidas de biossegurança.

### 3.8 TITULAÇÃO DO VÍRUS CHIKV PARA OS ENSAIOS DE PRNT

Foi realizada a titulação a partir do sobrenadante viral por meio do PFU numa placa de 24 poços. Foram preparadas as diluições seriadas  $10^{-1}$  até  $10^{-7}$  utilizando o sobrenadante coletado e como diluente o meio DMEM contendo 1% de PS a 2% SBF.

Em cada diluição respectiva foi realizado a infecção de 200µL nos poços e no poço controle negativo foi adicionado, somente, o meio de cultura. Depois, a placa foi incubada na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por uma hora, sob agitação a cada 30 minutos. Decorrido o tempo da adsorção viral, foi adicionado 300µL de meio semissólido, contendo agarose a 0,3% e DMEM a 5% SBF e as placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 41h de incubação, as monocamadas de células foram fixadas e inativadas as atividades virais com formaldeído a 10% no volume de 500µL por uma hora e coradas com *Naphthol Blue Black* a 2% no volume de 300µL por uma hora.

As placas formadas nas monocamadas de células foram contadas na diluição  $10^{-6}$  em que foi observado as placas individualizadas. Cada placa de lise corresponde a uma partícula viral e elas são contadas, a partir disso é realizado uma média das placas dividido pelo fator de diluição multiplicado pelo volume do inóculo em mL, como apresentado na fórmula a seguir (BAER; KEHN-HALL, 2014):

$$\text{Titulação Viral (PFU/mL)} = \frac{\text{Média da placas}}{\text{Volume de infecção (mL)} \times \text{Diluição}}$$

A partir disso é realizado a etapa de validação para ter uma maior precisão do cálculo do estoque. Para isso foi realizado a Titulação Viral com 30 pfu no volume de 200µL para placas de 24 poços. Dessa forma, confirmou o valor de  $2,5 \times 10^7$  pfu/mL.

### 3.9 TESTE DE NEUTRALIZAÇÃO POR REDUÇÃO DE LISE (PRNT)

Inicialmente, as amostras de plasma foram inativadas por uma hora em banho-maria a 56°C. Em seguida, foi realizada a diluição do plasma (1:20, 1:80, 1:320, 1:1280) em DMEM a 2%SBF utilizando placas de 48 poços, no volume final de 275µL. Após a diluição, 250µL da suspensão viral de CHIKV, previamente titulados com uma concentração de aproximadamente 30 PFU/mL foram adicionados nas diluições correspondentes.

Após, incubação a 37°C, em 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> por uma hora, o meio das placas de 24 poços contendo as células Vero foi descartado e 200µL de cada diluição da mistura vírus-plasma foi inoculado, em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> por uma hora, para permitir a adsorção do vírus. Após este período, as células foram cobertas com 300µL de meio semissólido (DMEM, 5% de SBF, 1% de PS, e 0,3% de agarose). Em seguida, as placas foram incubadas por 41 horas, à 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, foi adicionado uma solução de formaldeído a 10% (500µL/poço, incubado por 30 minutos) para fixação das células e inativação da infecção viral. Depois, o meio semissólido e o formaldeído foram descartados e as células coradas com solução *Naphthol Blue Black* a 2% (300µL/poço). Por fim, as placas foram lavadas em água corrente e, após secagem, as placas foram contadas manualmente.

Neste estudo foram utilizados como controle negativo para o PRNT somente as amostras que não apresentavam níveis detectáveis de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV.

### 3.10 CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE E NEGATIVIDADE NO PRNT

As amostras foram positivas quando as titulações dos anticorpos do PRNT50, PRNT80 e PRNT90 apresentassem valores iguais as diluições 1:20, 1:80, 1:320 ou 1:1280. As amostras foram negativas quando as titulações dos anticorpos PRNT50, PRNT80 e PRNT90 apresentassem o valor <20.

### 3.11 VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS

Para garantir a acurácia e reduzir as variações do teste, todos os procedimentos laboratoriais referentes ao PRNT foram realizados pela mesma pessoa, seguindo um protocolo padronizado. Poços com células não-infectadas, controle positivo (vírus inoculado na ausência de soro) e negativo (soro de indivíduos sabidamente negativos) foram incubados com meio e vírus, respectivamente. Os critérios utilizados para validar o resultado do teste foram: integridade da monocamada de células não-infectadas, pouca ou nenhuma redução na contagem de placas dos soros negativos e apropriadas contagem de placas do controle positivo (30 placas).

### 3.12 DEFINIÇÃO DE CRONICIDADE DOS INDIVÍDUOS INFECTADOS POR CHIKV

Os indivíduos infectados por CHIKV foram reavaliados quanto à persistência das dores nas articulações após 12 meses da infecção e a partir disso classificados nos grupos de crônico e não-crônico.

### 3.13 CALCULADORA *SHERA*

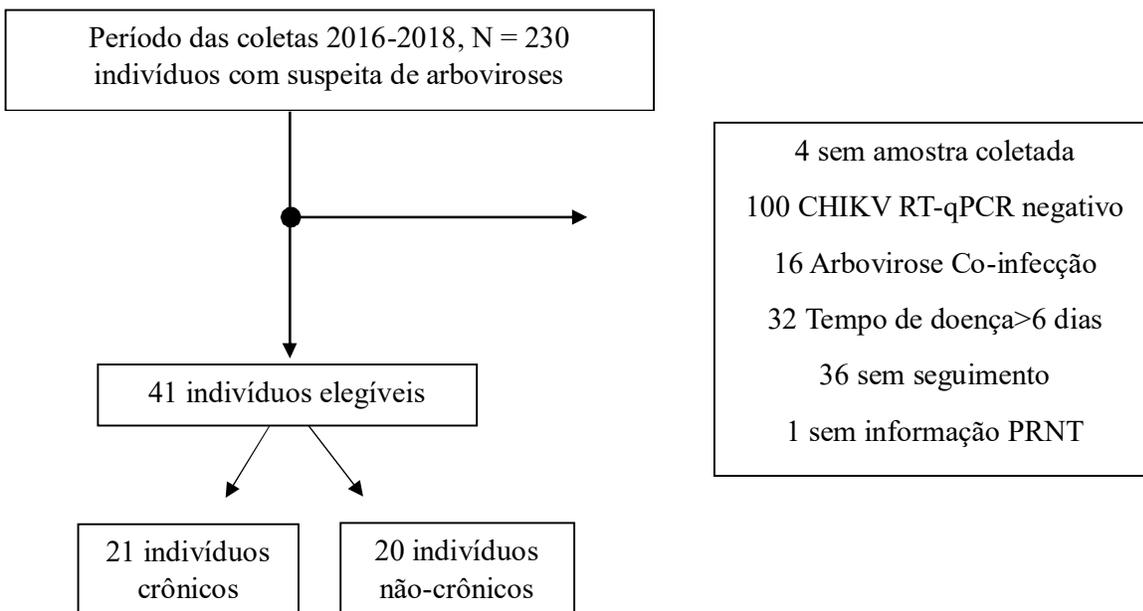
Uma ferramenta em que classifica o indivíduo quanto ao risco de cronicidade. O *SHERA* pode ser encontrado no *SHERA calculator* ([www.sheracalculator.com/shera](http://www.sheracalculator.com/shera)) o qual cada preditor é atribuído um valor a Edema = 2,5 pontos, ROP = 2, Hipertensão = 2, Idade > 26 = 1,5, Feminino = 1. O valor  $\geq 5$  pontos, indicando um alto risco de cronicidade. Enquanto uma pontuação <5 indicou baixo risco de cronicidade.

### 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados gerados foi analisada por meio dos testes de normalidade Shapiro-Wilk. Embora, os dados não assumissem uma distribuição normal o teste utilizado foi Two-Way ANOVA. A escolha desse teste foi devido à robustez dele e a possibilidade de verificar a análise da interação dos dois fatores - tempo e artralgia. Essa interação não seria possível utilizando os testes não-paramétricos. O nível de significância aplicado foi de \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism® versão 9 (San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO



**Figura 5** - Fluxograma da coorte do estudo. Descrição dos critérios de exclusão e o número de indivíduos em cada etapa. Acompanhamento realizado 12 meses após o início dos sintomas do CHIKV.

**Fonte:** Elaborado pela autora

Entre os 230 indivíduos triados inicialmente, 189 indivíduos foram excluídos pelos motivos listados na Figura 4, resultando em 41 indivíduos infectados exclusivamente com CHIKV agudo. Destes, todos os casos foram positivos por qRT-PCR. Um total de 16 casos foram excluídos devido à coinfeção ZIKV (n=11) e DENV (n=5). Os sintomas mais prevalentes incluíram artralgia (100%), seguida de febre (100%), dor de cabeça (97,56%), mialgia (90,24%), edema (65,85%), vômito (75,60%), dor retro-orbital (65,85%), exantema maculopapular (56,09%), lesão oral (26,82%) e hipertensão (17,07%). Na população de estudo os dados demográficos e sintomas clínicos observados foram semelhantes em todos os locais de recrutamento (Tabela 1). Todos os indivíduos foram reavaliados após 12 meses. Artralgia persistente foi detectada em 21 (51,21%). Ademais, o valor do SHERA (índice de intensidade de sintomas clínicos na fase aguda) variou em torno do valor 6,0. Esse valor foi obtido por meio da calculadora SHERA indicando um alto risco de cronicidade, tendo como base os preditores demográficos e clínicos da fase aguda como idade, hipertensão, edema, sexo (feminino) e dor

retro-orbital. A partir disso foi analisado a cinética de produção de anticorpos IgM e IgG ao longo da progressão da doença

**Tabela 1** - Características clínicas e demográficas dos indivíduos que compõem a coorte de estudo

	Campo Fomoso (n=17)	Itabuna (n=12)	Maranguape (n=12)	Total (n=41)
<b>Estado</b>	Bahia	Bahia	Ceará	
<b>Ano de recrutamento</b>	2016	2016	2017	
<b>Tempo de doença (dias)</b>	1 (1-4) (n=17)	1 (1-3) (n=12)	1,5 (0-5) (n=12)	1 (1-3)
<b>Idade (anos)</b>	38 (6-75) (n=17)	41 (20-76) (n=12)	39 (5-71) (n=12)	39 (5-76) (n=41)
<b>Sexo (feminino)</b>	64,70 (11/17)	41,67% (5/12)	66,67% (8/12)	58,53% (24/41)
<b>Sintomas</b>				
Artralgia	100,00% (17/17)	100,00% (12/12)	100,00% (12/12)	100,00% (41/41)
Febre	100,00% (17/17)	100,00% (12/12)	100,00% (12/12)	100,00% (41/41)
Dor de cabeça	100,00% (17/17)	91,67% (11/12)	100,00% (12/12)	97,56% (40/41)
Mialgia	88,23% (15/17)	83,33% (10/12)	100,00% (12/12)	90,24% (37/41)
Edema	64,70% (11/17)	58,33% (7/12)	75,00% (9/12)	65,85% (27/41)
Vômito	76,5% (13/17)	58,33% (7/12)	91,67% (11/12)	75,80% (31/41)
Tontura	82,4% (14/17)	50,00% (6/12)	36,4% (4/11)	58,53% (24/41)
Dor retro-orbital	64,70% (11/17)	58,33% (7/12)	75,00% (9/12)	65,85% (27/41)
Exantema maculopapular	41,17% (7/17)	66,67% (8/12)	66,67% (8/12)	56,09% (23/41)
Prurido	41,17% (7/17)	50,00% (6/12)	41,67% (5/12)	43,90% (18/41)
Lesão oral	31,25% (5/17)	27,27% (3/11)	25,00% (3/12)	28,82% (11/41)
Hipertensão	23,52% (4/17)	8,33 (1/12)	16,67% (2/12)	17,07% (7/41)
SHERA	7 (3,5-8)	5,5 (2,25-7)	6 (4-8)	6 (3,5-8)
<b>Persistência de artralgia por mais de 12 meses</b>	58,82% (10/17)	41,67% (5/12)	50,00% (6/12)	51,21% (21/41)

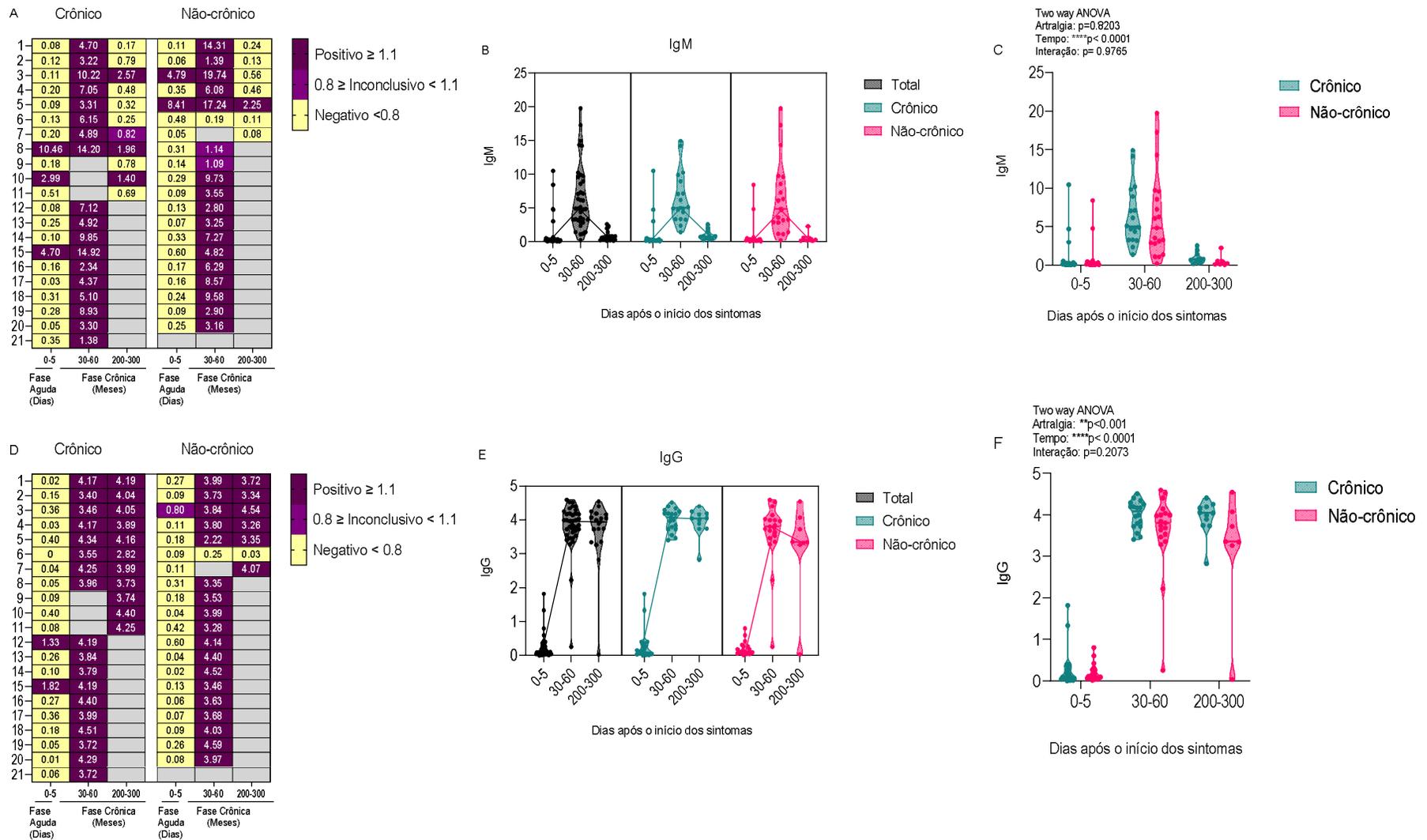
Fonte: Elaborado pela autora

#### 4.2 ANÁLISE CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IGM E IGG AO LONGO DA PROGRESSÃO DA DOENÇA, COMPARANDO OS INDIVÍDUOS QUE CRONIFICARAM *VERSUS* OS INDIVÍDUOS QUE NÃO CRONIFICARAM

O sorodiagnóstico através do ELISA é rápido e sensível para detectar a presença de anticorpos IgM e IgG logo após o início dos sintomas (SUHRBIER, 2012) (CAGLIOTI *et al.*, 2013). Um mapa de calor foi gerado para demonstrar a distribuição das amostras por indivíduo, dessa maneira é possível visualizar uma perda de seguimento em R1 de 14,29% no grupo crônico e 5% no grupo não-crônico. Em R2, houve uma perda de seguimento de 47,62% no grupo crônico e 65% no grupo não-crônico (Figura 6 A e D).

O aparecimento dos anticorpos IgM e IgG contra CHIKV foi detectada uma elevação gradativa no período de 0-5 dias após o início dos sintomas nos dois grupos crônico e não-crônico (Figura 6 B e E). No período de 30-60 dias após a infecção, os anticorpos IgM e IgG atingiram seu pico, em ambos os grupos. No entanto, logo após 200-300 dias do início dos sintomas, há uma queda significativa da produção do IgM em ambos os grupos, permanecendo apenas 9,75% das amostras ainda positivas. Os níveis de anticorpos IgG se mantiveram elevados em ambos os grupos crônico e não-crônico (Figura 6 B e E).

No grupo de crônicos é observado uma sustentação do IgG com valores maiores em relação ao grupo não-crônico no último ponto da cinética ( $p < 0,001$ ) (Figura 6 F), essa diferença não é observada no IgM (Figura 6 C). Não foi observado uma diferença estatística significativa na interação entre artralgia ao longo do tempo para as duas classes de anticorpos entre os grupos crônico e não-crônico (Figura 6 C e F).



**Figura 6** - Cinética dos anticorpos IgM (A) e IgG (D) contra CHIKV no plasma de indivíduos infectados.

Os gráficos do tipo mapa de calor A e D representam a distribuição das amostras quanto ao seu seguimento em cada período do tempo (experimento representativo). Os gráficos B, C, E e F foram representadas pelo *violin plot* e os resultados expressos em mediana, no eixo y e os valores de IgM e IgG estão representados e no eixo x representa o tempo R0, R1 e R2. Os gráficos B e E, tiveram a sobreposição do gráfico *line dot* (experimento representativo). Em C e F foram analisados pelo teste *Two-way ANOVA*.  $**p < 0,001$  e  $****p < 0,0001$ . O círculo preto (●) representa o total dos dois grupos círculo verde (●) grupo crônicos e círculo rosa (●) grupo não-crônicos.

**Fonte:** Elaborado pela autora

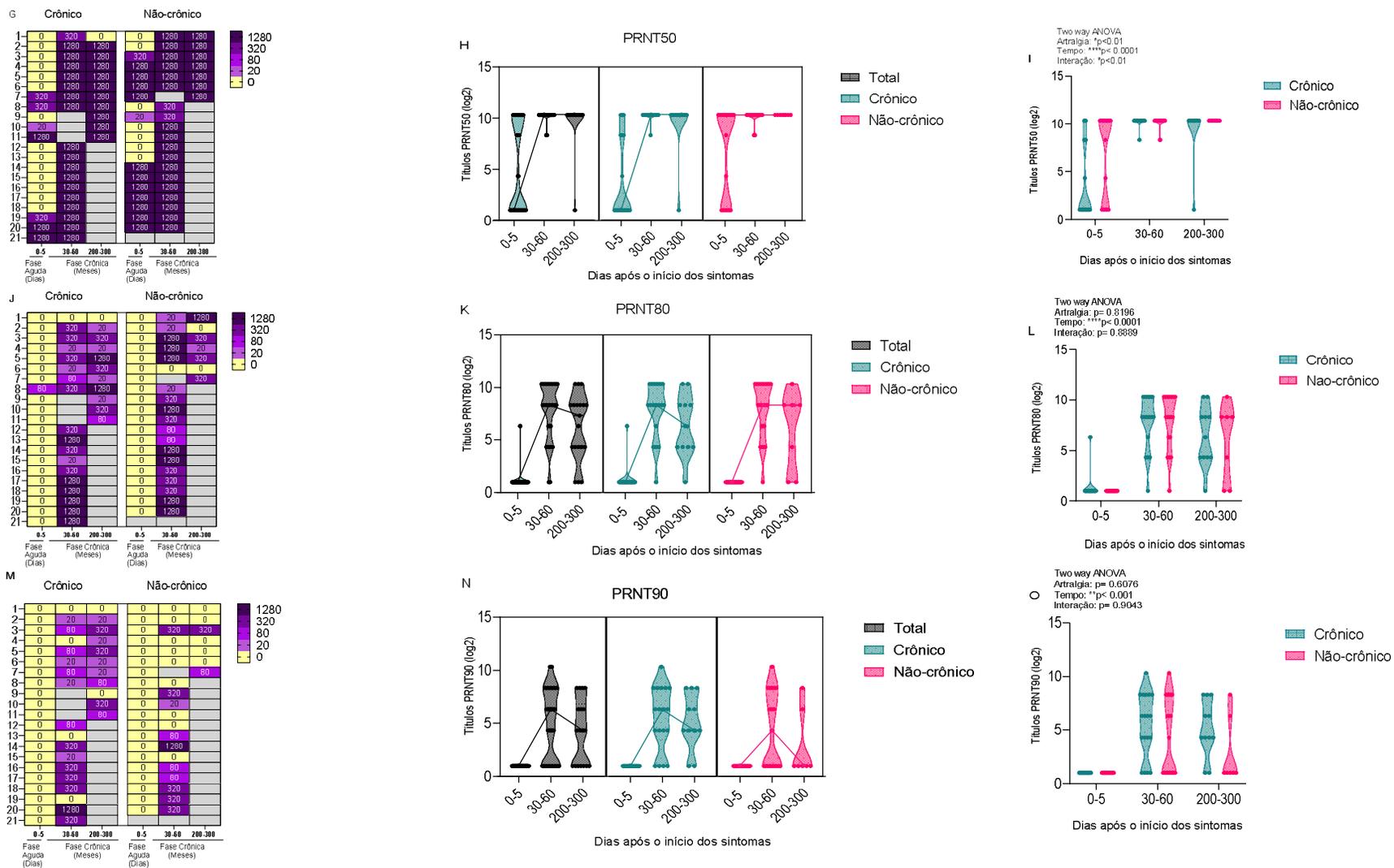
#### 4.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS INDIVÍDUOS QUE CRONIFICARAM *VERSUS* OS INDIVÍDUOS QUE NÃO CRONIFICARAM ATRAVÉS DO PRNT

O PRNT é considerado padrão ouro para avaliar a correlação da capacidade protetora do anticorpo contra os vírus. Os títulos são expressos em diferentes diluições do plasma na inibição percentual das contagens nas placas (WHO, 2008). No presente estudo, foi avaliado a capacidade protetora dos anticorpos neutralizantes através da proteção de 50%, 80% e 90%. Um mapa de calor foi gerado para demonstrar a distribuição das amostras, dessa maneira é possível visualizar uma perda de seguimento em R1 de 14,29% no grupo crônico e 5% no grupo não-crônico. Em R2, houve uma perda de seguimento de 47,62% no grupo crônico e 65% no grupo não-crônico (Figura 7 G, J e M).

No PRNT50, os grupos crônico e não-crônico apresentaram uma capacidade protetora dos anticorpos neutralizantes no período de 0-5 dias após o início da doença, na fase aguda. Enquanto essa neutralização não é observada no PRNT80 e PRNT90 (Figura 7 H, K e N). Os títulos dos anticorpos no PRNT50 se mantiveram elevados ao longo do tempo R1 e R2 (Figura 7 H).

Os títulos dos anticorpos no PRNT80 atingem o pico no período R1 e se mantêm ao longo do tempo R2 (Figura 7 K). No PRNT90, os grupos crônico e não-crônico alcançam o pico no período de R1 e é observado uma queda nos anticorpos neutralizantes no período R2 (Figura 7 N).

No PRNT50, houve diferença estatística significativa na interação entre artralgia ao longo do tempo, mostrando que uma capacidade neutralizante no início da infecção protege contra progressão para artralgia crônica ( $p < 0,01$ ). Contudo, isso não foi observado no PRNT80 e PRNT90 (Figura 7 I, L e O).



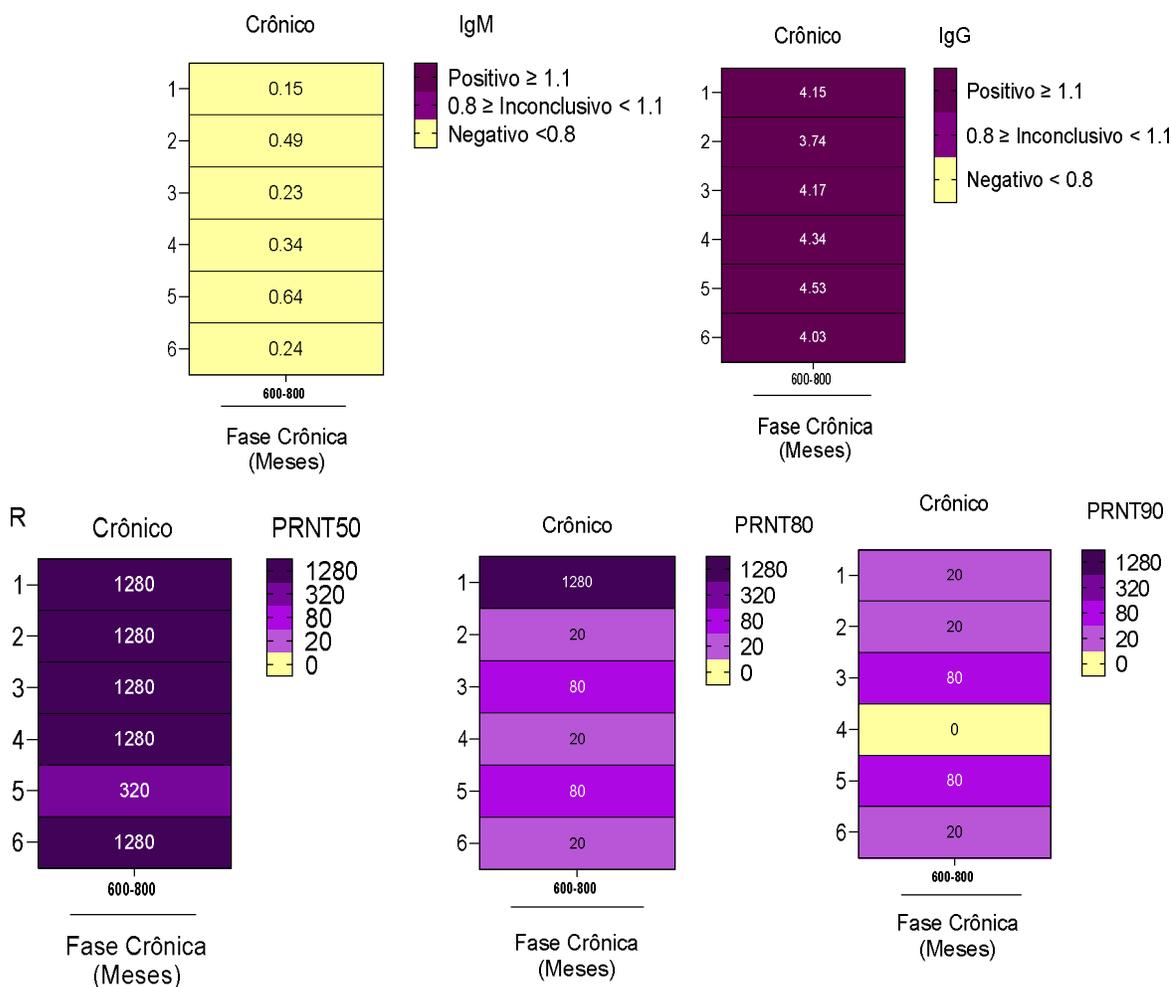
**Figura 7** - Titulos de proteção de anticorpos do PRNT50(G), PRNT80(J) e PRNT90(M) entre os grupos crônico e não-crônico.

Os gráficos do tipo mapa de calor G, J e M representam a distribuição das amostras quanto ao seu seguimento do tempo (experimento representativo). Os gráficos H, I, K, L, N e O foram representados pelo *violin plot*, os resultados expressos em mediana, no eixo y os títulos de anticorpos são expressos pelo log2 e no eixo x representa o tempo R0, R1 e R2. Os gráficos H, K e N tiveram a sobreposição do gráfico *line dot* (experimento representativo). Em I, L e O foram analisados pelo teste *Two-way ANOVA*. \*p<0,01; \*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. O círculo preto (●) representa o total dos dois grupos círculo verde (●) grupo crônicos e círculo rosa (●) grupo não-crônicos.

**Fonte:** Elaborado pela autora

Por fim, foi realizado a coleta e ensaio sorológico dos indivíduos que cronificaram após dois anos de infecção. Por meio disso, observa-se que a produção da resposta humoral se sustenta até dois anos (Figura 8).

Na figura 8, observa-se a ausência do anticorpo IgM após dois anos, logo em seguida uma manutenção do anticorpo IgG tanto no ELISA, quanto no PRNT (Figura 8 P, Q, R, S e T).



**Figura 8** - Resposta humoral mantida por até 2 anos de infecção.

Em P e Q foi realizado o ELISA e em R, S e T foi realizado o PRNT50, PRNT80 e PRNT90, respectivamente. Experimento representativo.

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 5 DISCUSSÃO

O vírus CHIKV é conhecido por causar altas taxas de morbidade associada a artralgia persistente podendo levar a dores debilitantes e, conseqüentemente, a redução de produtividade do indivíduo infectado (BRASIL, 2017b). No estudo de coorte 60% dos indivíduos infectados, desenvolveram artralgia crônica após um ano, afetando sua qualidade de vida (DE MORAES *et al.*, 2020).

Tendo em vista a necessidade de identificar a progressão da doença para artralgia, o presente estudo avaliou o papel da resposta humoral na progressão para artralgia crônica causada pelo CHIKV, comparando os indivíduos que desenvolveram artralgia crônica *versus* os indivíduos que não desenvolveram artralgia crônica. Para isto, foi desenhado uma coorte prospectiva para definir casos clinicamente bem caracterizados de fase aguda com diagnóstico molecular positivo e acompanhou ao longo de três visitas num intervalo de dois anos para determinar artralgia crônica e os títulos de IgM, IgG e PRNT.

A cinética natural de produção do anticorpo IgM contra CHIKV apresentada por diversos autores detecta os primeiros níveis de IgM em torno do terceiro dia, alcançando seu pico no oitavo dia, persistindo por até 3 meses (SUHRBIER, 2012) (E. ÁLVAREZ-ARGÜELLES *et al.*, 2019). Porém, Grivard e colaboradores descreveram a sustentação do IgM em 55,5% da coorte após 13 a 18 meses do início dos sintomas (GRIVARD *et al.*, 2007). No presente estudo, 12,19% das amostras foram detectadas nos primeiros 5 dias após o início dos sintomas, apresentando o pico de produção de IgM no período de 30-60 dias após o início dos sintomas da infecção, como descrito na literatura por Álvarez e colaboradores (E. ÁLVAREZ-ARGÜELLES *et al.*, 2019). Por outro lado, o nosso estudo detectou apenas 9,75% de casos positivos para IgM após, aproximadamente, 9 meses. Alguns relatos de casos descreveram que a sustentação de IgM a longo prazo estaria relacionada à progressão da artralgia crônica (CHELLUBOINA *et al.*, 2019) (MALVY *et al.*, 2009). No entanto, não observamos uma relação estatisticamente significativa, apesar de observarmos uma prevalência maior no grupo crônico. Corroborando com os achados do nosso estudo Moro e Do Nascimento Costa não observaram a relação de IgM com artralgia crônica (DO NASCIMENTO COSTA *et al.*, 2021) (MORO *et al.*, 2012).

A cinética natural de produção do anticorpo IgG contra CHIKV apresentada por diversos autores na chikungunya detecta os primeiros níveis de IgG em torno do quarto dia, podendo persistir por mais de um ano (SUHRBIER, 2012) (CHUA *et al.*, 2017) (CAGLIOTI *et al.*, 2013). Além disso, Ninla-aesong e colaboradores descreveram a sustentação do IgG em

86,5% da coorte após 60 meses (NINLA-AESONG; MITARNUN; NOIPHA, 2020). No presente estudo, 4,87% foram detectadas nos primeiros 5 dias após o início dos sintomas, apresentando o pico de produção de IgG no período de 30-60 dias após o início dos sintomas. Além disso, o nosso estudo detectou IgG persistente em aproximadamente 100% das amostras após aproximadamente 9 meses, e manteve-se assim por até 2 anos, como descrito na literatura por Suhrbier e colaboradores (SUHRBIER, 2012). Alguns estudos descreveram que a sustentação de IgG a longo prazo estaria relacionada à progressão da artralgia crônica, corroborando com os achados do presente estudo (SCHILTE *et al.*, 2013). Por outro lado, alguns autores mostram que o aparecimento do anticorpo IgG, subtipo IgG3, precocemente se relaciona a uma proteção contra o desenvolvimento de artralgia crônica (KAM *et al.*, 2012) (NAYAK *et al.*, 2020), todavia no presente estudo só testou IgG total (JAIN ET AL, 2017).

A avaliação da capacidade de neutralização dos anticorpos IgM e IgG foi pelo PRNT. A sua execução pode ser realizada logo após a fase aguda, no período de 3 ou 4 dias após o início dos sintomas (WHO, 2007). O PRNT serve para distinguir entre soroconversão gerada por vírus da mesma família (exemplo: flavivírus) (KUNO, 2003). Nesse sentido, o PRNT90 é mais específico e pouco sensível, PRNT80 melhora a sensibilidade mantendo alta especificidade e PRNT50 é mais sensível, porém é menos específico (STAPLES *et al.*, 2020).

O PRNT50 é mais sensível devido à captação de efeitos precoces de neutralização (WHO, 2007) (STAPLES *et al.*, 2020). No presente estudo, o PRNT50 apresentou 48,78% das amostras positivas nos primeiros 5 dias após o início dos sintomas, no período de 30-60 dias após o início dos sintomas todas as amostras apresentaram proteção no PRNT50. Ademais, nosso estudo detectou no PRNT50 proteção em 41,46% das amostras após aproximadamente 9 meses, e manteve-se assim por até 2 anos. Foi observada uma maior atividade de neutralização no grupo não-crônico a partir do início da fase aguda (primeiros 5 dias), mesmo não tendo produção de IgM e IgG detectado nestas amostras. A presença de neutralização nos primeiros dias de infecção, segundo os dados presentes na literatura, pode estar associada ao estímulo de produção de fatores séricos e do complemento devido a detecção de viremia pelo teste molecular na fase aguda (SILVA; DERMODY, 2017) (ANFASA *et al.*, 2019). Os fatores séricos associados a neutralização viral contribui para a eliminação do CHIKV através das citocinas IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  IL-1-RA, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18 mais as quimiocinas CCL2, CXCL/IP-10, G-CSF presentes na fase aguda (SILVA; DERMODY, 2017) (CHIRATHAWORN *et al.*, 2013) (VENUGOPALAN; GHORPADE; CHOPRA, 2014). As análises das mesmas amostras pelo nosso grupo (dados não mostrados) mostraram uma maior presença de IFN do tipo I e II nesses primeiros 5 dias no grupo não-crônico.

O PRNT80 melhora a associação de sensibilidade/especificidade segundo Bodilis e colaboradores (COULANGE BODILIS *et al.*, 2011). No presente estudo, o PRNT80 apresentou apenas 2,4% das amostras positivas nos primeiros 5 dias após o início dos sintomas, no período de 30-60 dias após o início dos sintomas 85,3% das amostras apresentaram proteção no PRNT80. Ademais, nosso estudo detectou no PRNT80 proteção em 36,5% das amostras após aproximadamente 9 meses, e manteve-se assim por até 2 anos. Nos nossos dados foi observada uma queda na titulação do PRNT80, em relação ao PRNT50, devido a diminuição da sensibilidade.

O PRNT90 reduz reação cruzada com vírus da mesma família, devido à alta especificidade (STAPLES *et al.*, 2020). No presente estudo, o PRNT90 não teve nenhuma amostra positiva em 0-5 dias após o início dos sintomas, no período de 30-60 dias após o início dos sintomas 58,5% das amostras apresentaram proteção no PRNT90. Ademais, nosso estudo detectou no PRNT90 proteção em 26,8% das amostras após aproximadamente 9 meses, e manteve-se assim por até 2 anos. Nos nossos dados foi observada uma queda na titulação do PRNT90 em ambos os grupos corroborando com a literatura quanto ao aumento da especificidade e, assim, subestimando as amostras positivas que porventura não tiveram um título detectável de neutralização (LINDSEY *et al.*, 2018). Embora, haja uma queda maior no grupo não-crônico não foi observado uma diferença estatística significativa entre o grupo de crônico reforçando, assim, com o achado na literatura em relação a persistência de IgG não está associada com a cronicidade (NINLA-AESONG; MITARNUN; NOIPHA, 2020).

Portanto, concluímos que há uma necessidade de investigação mais detalhada de outros mecanismos séricos/humorais, como o estudo de subtipos IgG (IgG3) e ensaios de inibição de IFNs endógenos, para esclarecer o papel dessa resposta neutralizante precoce na proteção contra a artralgia crônica causada pelo CHIKV. Esses resultados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias eficazes para evitar o grande impacto socioeconômico causado pelo afastamento dessa doença.

## 6 CONCLUSÕES

1. Não houve relação da cinética do anticorpo IgM quanto à progressão da artralgia crônica;
2. Houve diferença estatística significativa na cinética do anticorpo IgG tardio após um ano de início dos sintomas, relacionado a uma proteção de cronicidade;
3. Houve diferença estatística significativa na resposta neutralizante no PRNT50 nos primeiros dias de infecção, relacionado a uma proteção de cronicidade;
4. Há uma manutenção da resposta humoral após 2 anos do início dos sintomas;

## REFERÊNCIAS

- ANFASA, Fatih *et al.* Characterization of antibody response in patients with acute and chronic chikungunya virus disease. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 117, n. May, p. 68–72, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.06.001>
- AYDIN, Suleyman. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, [s. l.], v. 72, p. 4–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- AZAMI, Nor Azila Muhammad; MOI, Meng Ling; TAKASAKI, Tomohiko. Neutralization assay for chikungunya virus infection: plaque reduction neutralization Test. CHU, Justin Jang Hann; ANG, Swee Kim (Ed). **Chikungunya Virus: methods and protocols**. New York: Springer Science, 2016. v. 1426, p. 273–282. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2_25)>.
- BAER, Alan; KEHN-HALL, Kylene. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 93, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/52065>
- BAXTER, Victoria K *et al.* Immunopathogenesis of alphaviruses. **HHS Public Access**, [s. l.], v. 107, p. 315–382, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2020.06.002.Immunopathogenesis>>
- BERGSBAKEN, Tessa; FINK, Susan L.; COOKSON, Brad T. Pyroptosis: host cell death and inflammation. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 99–109, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- BONIFAY, Timothee *et al.* Atypical and severe manifestations of chikungunya virus infection in French Guiana: A hospital-based study. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. e0207406, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207406>
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Brasília, 2016. v. 47, p. 1–10.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**. Brasília, 2018. v. 49, p. 1–14.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Brasil. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, 2020. v. 51, n. 4, n. 24, p. 11–19. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_48.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim_epidemiologico_svs_48.pdf)>
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico arboviroses**, Brasília, 2021. v. 51, n. 24, p. 1–13.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manejo clínico chikungunya**. 2. ed. Brasília, 2017<sup>a</sup>. p. 77.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção Básica. **Boletim epidemiológico**, Brasília, 2017<sup>b</sup>. v. 48, p. 1–13.
- CAGLIOTI, Claudia *et al.* Chikungunya virus infection: An overview. **New Microbiologica**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 211–227, 2013.

CAREY DONALD. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 243 – 262, 1971.

CHARLYS DA COSTA, Antonio *et al.* Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1742–1744, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2310.170307>

CHELLUBOINA, Shweta *et al.* Persistence of antibody response in chikungunya. **VirusDisease**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 469–473, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00534-5>

CHIRATHAWORN, Chintana *et al.* Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 631–634, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60108-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60108-X)

CHIRATHAWORN, Chintana *et al.* Serum IL-18 and IL-18BP Levels in Patients with Chikungunya Virus Infection. **Viral Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 113–117, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vim.2009.0077>

CHUA, Chong Long *et al.* The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171989>

COULANGE BODILIS, H. *et al.* Persistance à long terme des anticorps neutralisants de la fièvre jaune chez les personnes âgées de 60 ans et plus. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 260–265, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13149-011-0135-7>

CUNHA, Marcela S *et al.* Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1737–1739, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3501/pdf>

CUNHA, Marcela S. *et al.* Chikungunya Virus: An Emergent Arbovirus to the South American Continent and a Continuous Threat to the World. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. June, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01297>

DE MORAES, Laise *et al.* A clinical scoring system to predict long-term arthralgia in chikungunya disease: A cohort study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008467>

DO NASCIMENTO COSTA, Denise Maria *et al.* Long-term persistence of serum-specific anti-chikungunya IgM antibody: a case series of brazilian patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 54, n. December 2018, p. 2019–2022, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0855-2020>

E. ÁLVAREZ-ARGÜELLES, Marta *et al.* Diagnosis and Molecular Characterization of Chikungunya Virus Infections. **Current Topics in Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.86957>

GAN, Stephanie D.; PATEL, Kruti R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 133, n. 9, p. 1–3, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.287>

GANESAN, Vaishnavi K.; DUAN, Bin; REID, St Patrick. Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling. **Viruses**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 1–14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v9120368>

GRIVARD, P. *et al.* Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Pathologie Biologie**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 490–494, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2007.07.002>

HOARAU, Jean-Jacques *et al.* Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900255>

HOFFMANN, Georg *et al.* Benefits and limitations of laboratory diagnostic pathways. **Diagnosis**, [s. l.], v. 1, n. 4, p. 269–276, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/dx-2014-0045>

HOLMES, Autumn C *et al.* PLOS PATHOGENS A molecular understanding of alphavirus entry. [s. l.], v. 1, p. 1–20, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>

HUITS, R. *et al.* Diagnostic accuracy of a rapid E1-antigen test for chikungunya virus infection in a reference setting. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 78–81, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.004>

JAIN ET AL. Clinical, Serological and Virological analysis of 572 chikungunya patients during the years 2010-2013 from India. [s. l.], v. 23, n. 98, p. 1–23, 2017.

KAM, Yiu Wing *et al.* Early appearance of neutralizing immunoglobulin G3 antibodies is associated with chikungunya virus clearance and long-term clinical protection. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 205, n. 7, p. 1147–1154, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis033>

KATHRYN S. CARPENTIER AND THOMAS E. MORRISON. Innate Immune Control of Alphaviruses Infection. **HHS Public Access**, [s. l.], v. 176, n. 1, p. 100–106, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.11.006>.INNATE

KUNO, Goro. Serodiagnosis of Flaviviral Infections and Vaccinations in Humans. **Advances in Virus Research**, [s. l.], v. 61, p. 3–65, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)61001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)61001-8)

LANCIOTTI, Robert S. *et al.* Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 764–767, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1305.070015>

LARAS, Kanti *et al.* Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 99, n. 2, p.

128–141, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2004.03.013>

LEUNG, Jason Yat Sing; NG, Mary Mah Lee; CHU, Justin Jang Hann. Replication of alphaviruses: A review on the entry process of alphaviruses into cells. **Advances in Virology**, [s. l.], v. 2011, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/249640>

LINDSEY, Nicole P *et al.* Persistence of yellow fever virus-specific neutralizing antibodies after vaccination among US travellers. [s. l.], v. 25, n. 1, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jtm/tay108.Persistence>

LUMSDEN, 1955. An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganika Territory, in 1952-53 II. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene II**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 33–53, 1955.

MALVY, Denis *et al.* Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 9, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-200>

MASON, P J; HADDOW, A J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 238–240, 1957. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(57\)90022-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(57)90022-6)

MATUSALI, Giulia *et al.* Tropism of the chikungunya virus. **Viruses**, [s. l.], v. 11, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v11020175>

MENDOZA, Emelissa J. *et al.* Combining anti-IgM and IgG immunoassays for comprehensive chikungunya virus diagnostic testing. **Zoonoses and Public Health**, [s. l.], v. 66, n. 8, p. 909–917, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/zph.12641>

MORO, M. L. *et al.* Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: A prognostic cohort study. **Journal of Infection**, [s. l.], v. 65, n. 2, p. 165–172, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.04.005>

MOYANO, Amanda *et al.* Magnetic lateral flow immunoassays. **Diagnostics**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/diagnostics10050288>

NAG, Joydeep *et al.* A Factor I-Like Activity Associated with Chikungunya Virus Contributes to Its Resistance to the Human Complement System. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 94, n. 7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.02062-19>

NAVECA, Felipe Gomes *et al.* Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. e0007065, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007065>

NAYAK, Kaustuv *et al.* Antibody response patterns in chikungunya febrile phase predict protection versus progression to chronic arthritis. **JCI Insight**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130509>

NINLA-AESONG, Putrada; MITARNUN, Winyou; NOIPHA, Kusumarn. Long-Term

Persistence of Chikungunya Virus-Associated Manifestations and Anti-Chikungunya Virus Antibody in Southern Thailand: 5 Years after an Outbreak in 2008-2009. **Viral Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 86–93, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vim.2019.0168>

NUNES, Marcio Roberto Teixeira *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>

ORTEGA-SOTO; ARELLANO-ANAYA Z; BARRÓN B. Chikungunya y Zika en America y Mexico. **Investigación en Discapacidad**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 57–68, 2017. Disponível em: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2017/ir172c.pdf>

PETITDEMANGE, Caroline; WAUQUIER, Nadia; VIEILLARD, Vincent. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 135, n. 4, p. 846–855, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.039>

POWERS, Ann M. *et al.* Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 471–479, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>

ROEHRIG, John T.; HOMBACH, Joachim; BARRETT, Alan D.T. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. **Viral Immunology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 123–132, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vim.2008.0007>

ROSSINI, Giada; LANDINI, Maria Paola; SAMBRI, Vittorio. Evolution and epidemiology of chikungunya virus. **Methods in Molecular Biology**, [s. l.], v. 1426, p. 3–10, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3618-2_1)

SALJE, Henrik *et al.* Variability in Dengue Titer Estimates from Plaque Reduction Neutralization Tests Poses a Challenge to Epidemiological Studies and Vaccine Development. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 8–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002952>

SCHILTE, Clémentine *et al.* Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137>

SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368>

SERGON, Kibet *et al.* Seroprevalence of Chikungunya Virus ( CHIKV ) Infection on Lamu Island , Kenya , October 2004. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 78, n. October 2004, p. 333–337, 2005.

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical**

**Investigation**, [s. l.], v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI84417>

SILVA JR, José V J et al. A scoping review of Chikungunya virus infection : epidemiology , clinical characteristics , viral co-circulation complications , and control. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 188, n. January, p. 213–224, 2018.

SOLIGNAT, Maxime *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus Maxime. **National Institute of Health**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 19–22, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3816/CLM.2009.n.003.Novel>

SRIVASTAVA, Priyanshu *et al.* Disease Resolution in Chikungunya—What Decides the Outcome? **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. April, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00695>

STAPLES, J. Erin *et al.* Review of data and knowledge gaps regarding yellow fever vaccine-induced immunity and duration of protection. **npj Vaccines**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0205-6>

STRAUSS, J H; STRAUSS, Ellen G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological Reviews**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MMBR.58.3.491-562.1994>

SUHRBIER, Andreas et al. Arthritogenic alphaviruses-an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 420–429, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>

TANABE, Ithallo S. B. *et al.* Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. October, p. 1–15, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00345>

THIBOUTOT, Michelle M. *et al.* Chikungunya: A potentially emerging epidemic? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 4, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000623>

TSETSARKIN, Konstantin A. *et al.* A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>

TSETSARKIN, Konstantin A. *et al.* Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence. **National Institute of Health**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 310–317, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004.Chikungunya>

TUEKPRAKHON, Aekkachai *et al.* Variation at position 350 in the Chikungunya virus 6K-E1 protein determines the sensitivity of detection in a rapid E1-antigen test. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19174-8>

VENUGOPALAN, Anuradha; GHORPADE, Ravi P.; CHOPRA, Arvind. Cytokines in acute chikungunya. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111305>

WEAVER, Scott C.; LECUIT, Marc. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmra1406035>

WESTAWAY, E G. et al. Togaviridae. **Intervirolgy**, [s. l.], v. 24, p. 125–139, 1985.

WHO. Guidelines for plaque reducing neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. **Department of Immunization Vaccines and Biologicals**, [s. l.], p. 1–3, 2007.

WHO. Guidelines on Clinical Management of Chikungunya Fever. [s. l.], 2008.

YAP, Moh Lan *et al.* Structural studies of Chikungunya virus maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 114, n. 52, p. 13703–13707, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1713166114>