



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JULIANA CARDOSO ALVES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE
CRESCIMENTO NAS INFECÇÕES PELOS VÍRUS *Zika* e *Chikungunya***

ARACAJU/SE

2023

JULIANA CARDOSO ALVES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS, QUIMIOOCINAS E FATORES DE
CRESCIMENTO NAS INFECÇÕES PELOS VÍRUS *Zika* e *Chikungunya***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe
como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em
Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Roque Pacheco de Almeida

Profa. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres

Profa. Dra. Ângela Maria da Silva

Profa. Dra. Priscila Lima Santos

Prof. Dr. Lucas Sousa Magalhães

**ARACAJU/SE
2023**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

A474a	Alves, Juliana Cardoso Avaliação do perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento nas infecções pelos vírus zika e chikungunya / Juliana Cardoso Alves ; orientador Roque Pacheco de Almeida. – Aracaju, 2023. 83 f. : il. Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2023. 1. Ciências da saúde. 2. Zika vírus. 3. Chikungunya. 4. Biomarcadores. 5. Coinfecção. I. Almeida, Roque Pacheco de, orient. II. Título. CDU 616.98
-------	--

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por ter me sustentado e me guiado até aqui diante de tantas adversidades ao longo do caminho.

Aos meus pais, Eliana e Manuel por todas as batalhas travadas dia após dia para mais essa conquista. Sem o alicerce que vocês construíram, nada seria possível. À minha irmã Viviane por toda torcida e cuidado que sempre demonstrou ter por mim.

Ao meu filho Guilherme por ser essa fonte de força que me alimenta todos os dias. Tão pequeno e tão gigante ao mesmo tempo, sempre com sua sensibilidade me mostrando todos os dias o quanto ainda tenho que aprender para alcançá-lo.

A Michell Menezes pelo apoio diário, pelo suporte concedido, por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, por não me deixar desistir, por acreditar em mim mesmo quando nem eu acreditava mais e por entender todos os momentos em que estive ausente.

À amiga Paulina Marques que sempre me ouviu nos momentos de desespero e sempre me fez enxergar que sou capaz!

À Universidade Federal de Sergipe, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, às agências financiadoras: Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica de Sergipe (FAPITEC), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pela contribuição na realização desse estudo.

Ao meu orientador Dr. Roque Pacheco pelas oportunidades concedidas em seu grupo de pesquisa que me proporcionaram diversas conquistas profissionais.

À Dra. Amélia Ribeiro por sua serenidade e suas contribuições científicas pertinentes ao longo dessa jornada.

Aos colegas do laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LIBM) que tanto se dedicaram a linha de pesquisa sobre arboviroses, em especial a Dra. Camilla Santos, o Dr. Lucas Magalhães, Dr. Rodrigo Cazzaniga e a Dra. Tatiana Rodrigues que nunca mediram esforços para me ajudar na realização dos experimentos. À Dra. Priscila Lima que segurou em minha mão nessa reta final e transmitiu tranquilidade.

Aos colaboradores dos laboratórios de Imunologia e Biologia Molecular do Laboratório Central de Sergipe (LACEN-SE) pela grande contribuição para o desenvolvimento desse estudo.

Ao coorientador, Dr. Cliomar Alves, por acreditar em meu potencial e por sua expertise profissional que tanto agregou a esse estudo.

A todos dos ambulatórios de Infectologia, de Reumatologia e Neurologia do Hospital Universitário de Sergipe, representados pelos médicos Ângela Silva, Regina Adalva, Alejandra Debbo e Phillip Nicolau tão importantes no recrutamento e na caracterização clínica dos pacientes envolvidos no estudo.

Aos pacientes que se disponibilizaram para a realização desse estudo.

Ao prof. Dr. Fábio, do Departamento de Economia da Universidade Federal de Sergipe, pela colaboração durante a análise dos dados.

Aos colaboradores parceiros do Instituto Butantan, do Imperial College London, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG pelo apoio científico na execução desse projeto.

Enfim, agradeço a todos os que me ajudaram de alguma forma nessa longa jornada.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS, QUIMIOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO NAS INFECÇÕES PELOS VÍRUS *Zika* e *Chikungunya*. ALVES, J.C.

Aracaju, 2023.

Introdução: Os vírus Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) são arbovírus reemergentes, que podem ser transmitidos simultaneamente aos seres humanos. Os quadros clínicos desencadeados durante as infecções por esses vírus são variados e a desregulação da resposta imunológica pode estar envolvida na patogênese e no prognóstico dessas arboviroses.

Objetivo: Avaliar os possíveis biomarcadores imunológicos associados às doenças causadas pelos vírus *Zika* (ZIKV) e *Chikungunya* (CHIKV). **Metodologia:** Foi realizada a análise de uma série de casos de indivíduos infectados pelos ZIKV e CHIKV (n=66) com grupo controle (n=13), acompanhados pelos serviços de reumatologia ou de infectologia do Hospital Universitário de Sergipe, no ano de 2016. Foram coletadas informações clínico-epidemiológicas, amostras de sangue para realização do diagnóstico molecular pela RT-PCR em tempo real (plasma) e para a análise de 45 mediadores imunológicos por LUMINEX (soro). Foram realizadas comparações dos mediadores imunológicos entre grupos de monoinfecções (ZIKV, CHIKV), coinfeções (ZIKV/CHIKV), infecção na fase aguda (CHIKV agudo), na fase crônica (CHIKV crônico) e controles saudáveis. As variáveis numéricas foram descritas como média e desvio padrão ou mediana, primeiro quartil e terceiro quartil, atendendo o pressuposto de normalidade. Para as variáveis categóricas utilizou-se frequências simples e frequências percentuais. Para diferenças entre dois grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para as análises de correlação foi utilizada a correlação de Spearman. Para a análise preditiva foi utilizado um modelo de regressão linear. Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. **Resultados:** Houve predominância do sexo feminino em todos os grupos analisados, sem diferença de idade entre os participantes dos grupos infectados em relação ao grupo controle. Entretanto, os indivíduos do grupo CHIKV crônico apresentaram maiores idades do que os do grupo CHIKV agudo. Foi demonstrado o aumento das concentrações de IP-10 e RANTES em todos os indivíduos infectados independentemente do vírus (ZIKV ou CHIKV). Também foi observado que os indivíduos infectados somente com o ZIKV apresentaram concentrações menores IFN- α , IL-1RA, IL-10 e IP-10 e os indivíduos infectados apenas com CHIKV exibiram maiores concentrações de IFN- α , IL-1RA e MCP-1 do que os indivíduos coinfectados. Ainda, algumas citocinas só foram observadas no grupo de indivíduos na fase crônica da infecção por CHIKV (IL-1 α , IL-9, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-31, IL-4, GM-CSF e PDGF-BB) e esses indivíduos também apresentaram resposta antiviral deficiente em relação aos indivíduos na fase aguda. De acordo com a análise preditiva, os indivíduos mais jovens infectados com CHIKV na fase crônica da doença podem ter uma maior produção de fatores de crescimento associados ao remodelamento tecidual (VEGF-A, VEGF-D, PDGF-BB, PIGF-1, LIF, SDF- α), assim como, os indivíduos acima de 40 anos podem exibir uma resposta inflamatória exacerbada via perfis celulares Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 do que indivíduos nas mesmas faixas etárias infectados com CHIKV na fase aguda da doença. **Conclusão:** Este estudo descreve pela primeira vez o perfil imunológico em coinfeção ZIKV/CHIKV e nossos achados identificaram aumento nas concentrações de citocinas exclusivas da fase crônica da infecção por CHIKV, bem como estimou taxas de incrementos na produção de citocinas relacionadas com a idade e o sexo dos indivíduos acometidos pelas infecções podendo contribuir para estudos futuros de desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Descritores: Biomarcadores. Chikungunya. Coinfecção. Zika.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE PROFILE OF CYTOKINES, CHEMIOKINES AND GROWTH FACTORS IN INFECTIONS BY Zika and Chikungunya VIRUSES. ALVES, J.C. Aracaju, 2023.

Introduction: Zika (ZIKV) and Chikungunya (CHIKV) viruses are reemerging arboviruses that can be transmitted simultaneously to humans. The clinical conditions triggered during infections by these viruses are varied and the deregulation of the immune response may be involved in the pathogenesis and prognosis of these arboviruses. **Objective:** To evaluate possible immunological biomarkers associated with diseases caused by Zika and Chikungunya viruses. **Methodology:** A series of cases of individuals infected by ZIKV and CHIKV (n=66) with a control group (n=13) were analyzed, followed up by the rheumatology or infectology services of the University Hospital of Sergipe, in the year 2016. Clinical-epidemiological information and blood samples were collected for molecular diagnosis by real-time RT-PCR (plasma) and for the analysis of 45 immunological mediators by LUMINEX (serum). Comparisons of immunological mediators were performed between groups of monoinfections (ZIKV, CHIKV), coinfections (ZIKV/CHIKV), acute phase infection (acute CHIKV), chronic phase (chronic CHIKV) and healthy controls. Numerical variables were described as mean and standard deviation or median, first quartile and third quartile, meeting the assumption of normality. For categorical variables, simple frequencies and percentage frequencies were used. For differences between two groups, the Mann-Whitney test was used. For correlation analysis, Spearman's correlation was used. For the predictive analysis, a linear regression model was used. All p values < 0.05 were considered statistically significant. **Results:** There was a predominance of females in all groups analyzed, with no age difference between the participants of the infected groups in relation to the control group. However, individuals in the chronic CHIKV group were older than those in the acute CHIKV group. Increased concentrations of IP-10 and RANTES were demonstrated in all infected individuals regardless of the virus (ZIKV or CHIKV). It was also observed that individuals infected only with ZIKV had lower concentrations of IFN- α , IL-1RA, IL-10 and IP-10 and individuals infected only with CHIKV exhibited higher concentrations of IFN- α , IL-1RA and MCP-1 than coinfecting individuals. Furthermore, some cytokines were only observed in the group of individuals in the chronic phase of CHIKV infection (IL-1 α , IL-9, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-31, IL-4, GM-CSF and PDGF-BB) and these individuals also had a deficient antiviral response compared to individuals in the acute phase. According to predictive analysis, younger individuals infected with CHIKV in the chronic phase of the disease may have a higher production of growth factors associated with tissue remodeling (VEGF-A, VEGF-D, PDGF-BB, PIGF-1, LIF, SDF- α), as well as individuals over 40 years of age may exhibit an exacerbated inflammatory response via Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 cell profiles than individuals in the same age groups infected with CHIKV in the acute phase of the disease. **Conclusion:** This study describes for the first time the immunological profile in ZIKV/CHIKV co-infection and our findings identified an increase in cytokine concentrations exclusive to the chronic phase of CHIKV infection, as well as estimated rates of increase in cytokine production related to age and age. sex of individuals

affected by infections, which may contribute to future studies on the development of new therapeutic targets.

Keywords: Biomarkers. Chikungunya. Coinfection. Zika

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclos de transmissão dos vírus <i>Zika</i> e <i>Chikungunya</i>	20
Figura 2: Via de produção e sinalização dos interferons tipo I a partir de infecção por vírus de RNA.....	30
Figura 3: Métodos diagnósticos e produção de anticorpos.....	34
Figura 4: Concentrações de citocinas em pacientes coinfectados (ZIKV/CHIKV).....	47
Figura 5: Concentrações de citocinas em pacientes infectados com CHIKV nas fases aguda e crônica da doença.....	49
Figura 6: Correlações entre mediadores imunológicos e os Cts (Cycle threshold)	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos e epidemiológicos dos indivíduos participantes do estudo.....	44
Tabela 2: Medianas e intervalos interquartis das concentrações dos mediadores imunológicos analisados por grupo.....	46
Tabela 3: Análise preditiva para a população em geral infectada pelos vírus ZIKV e CHIKV.....	55
Tabela 4: Análise preditiva dos diferenciais de concentrações dos mediadores imunológicos de indivíduos infectados pelo CHIKV nas fases aguda e crônica por faixa etária.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Manifestações atípicas relacionadas a infecção por CHIKV	29
Quadro 2: Diagnóstico clínico diferencial Dengue x Zika x Chikungunya.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Estado Amazonas
BA	Estado Bahia
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BNGF	Fator de crescimento do nervo β
CHIKV	Vírus Chikungunya
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ER:	Retículo endoplasmático
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
GRO- α	Proteína α regulada pelo crescimento
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IFN- α	Interferon α
IFN- γ	Interferon γ
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-1RA	Antagonista do receptor da interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 α
IL-1 β	Interleucina 1 β
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon γ
IRF	Fator regulador de interferon
ISGF	Fator de gene estimulador de interferon
ISRE	Elemento de resposta estimulada por interferon
LIF	Fator inibidor de leucemia

MAVS	Proteína de sinalização antiviral mitocondrial
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito 1
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago 1 α
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófago 1 β
μ L	Microlitro
nm	Nanômetro
PDGF- $\beta\beta$	Fator de crescimento derivado de plaquetas $\beta\beta$
PIGF-1	Fator de crescimento placentário 1
RANTES	Quimiocina CCL-5
RNA	Ácido ribonucleico
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SCF	Fator de células-tronco
SCZ	Síndrome congênita do Zika
SDF-1 α	Fator 1 α derivado de células do estroma
ssRNA	RNA de fita simples
STAT1	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
STAT2	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TNF- β	Linfotoxina α ou fator de necrose tumoral β
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGF-D	Fator de crescimento endotelial vascular D
ZIKV	Vírus <i>Zika</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Arbovírus/arboviroses.....	18
2.2 Agentes etiológicos.....	19
2.2.1 Vírus <i>Zika</i> (ZIKV)	19
2.2.2 Vírus Chikungunya (CHIKV).....	19
2.3 Vetor.....	21
2.4 Infecções simultâneas por arbovírus (Coinfecções).....	22
2.5 Epidemiologia.....	23
2.5.1 Vírus <i>Zika</i> (ZIKV) no mundo e no Brasil.....	23
2.5.2 Vírus Chikungunya no mundo e no Brasil.....	24
2.6 Manifestações clínicas.....	26
2.6.1 Manifestações clínicas ocasionadas pelo ZIKV.....	26
2.6.2 Manifestações clínicas ocasionadas pelo CHIKV.....	27
2.7 Aspectos imunológicos das infecções por arbovírus.....	29
2.7.1 Aspectos imunológicos associados ao ZIKV.....	29
2.7.2 Aspectos imunológicos associados ao CHIKV.....	32
2.8 Diagnósticos.....	33
2.9 Tratamento.....	34
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Geral.....	36
3.2 Específicos.....	36
4 DESENHO DO ESTUDO.....	37
5 METODOLOGIA.....	38
5.1 População estudada.....	38
5.2 Diagnósticos das infecções por arbovírus.....	39
5.3 Dosagem das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.....	40
5.4 Análise estatística.....	41
5.5 Aspectos éticos	42
6 RESULTADOS	43
7 DISCUSSÃO	58

8 CONCLUSÃO.....	64
9 PERSPECTIVAS.....	65
10 REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE A – Questionário arboviroses.....	75
ANEXO A -Termo de consentimento livre e esclarecido.....	76
ANEXO B -Artigo publicado.....	79
ANEXO C- Parecer do comitê de ética.....	81

1. INTRODUÇÃO

Os vírus *Zika* (ZIKV) e *Chikungunya* (CHIKV) são arbovírus reemergentes e têm como principais vetores os mosquitos do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) que podem transmitir mais de um arbovírus simultaneamente (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017; RÜCKERT et al., 2017). Os primeiros casos relatados de infecções por esses vírus ocorreram no continente africano, de onde foram difundidos para diversos países, tornando-os agentes causais de importantes epidemias nas últimas duas décadas (VALDÉS LÓPEZ; VELILLA; URCUQUI-INCHIMA, 2019).

No Brasil, as transmissões autóctones dos ZIKV e CHIKV iniciaram nos anos de 2014-2015, atingindo o maior número de casos confirmados no ano de 2016, principalmente na região nordeste do país (NUNES et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Houve um declínio no número de casos, contudo, é sabido que as epidemias ocasionadas por esses vírus são caracterizadas por surtos remotos intercalados com períodos de silêncio epidemiológico (SILVA JR. et al., 2018).

Os sinais e sintomas clínicos apresentados nos estágios iniciais das doenças causadas pelos ZIKV e CHIKV são muito semelhantes. Entretanto, os desfechos das infecções variam desde infecções assintomáticas (60-80% dos indivíduos infectados com ZIKV ou em 25% para indivíduos infectados com CHIKV), ou infecções com sintomas comuns como febre, artralgia, exantema, dor reto-orbitária, podendo evoluir para a cronificação dos sintomas articulares e o desenvolvimento de complicações neurológicas como nos casos da Síndrome Congênita do ZIKV, Síndrome de Guillain-Barré, além de encefalites e neuropatias periféricas. Estas condições clínicas tornam os indivíduos acometidos pelas infecções arbovirais impossibilitados de desenvolverem suas atividades cotidianas, gerando assim, grave impacto socioeconômico além de sobrecarregar o sistema de saúde público (COUTURIER et al., 2012; WEAVER et al., 2016; KEESSEN et al., 2017; GUANCHE GARCELL et al., 2019).

Sabe-se que as manifestações clínicas presentes durante uma infecção viral são resultadas das interações entre fatores virais e do hospedeiro que podem ser decorrentes da não ativação ou da ativação excessiva do sistema imunológico por meio da produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (ASSUNÇÃO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013). Acredita-se, que o dano articular causado pelo CHIKV é devido a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro mediada por macrófagos, células T, anticorpos e por uma possível persistência viral (AMDEKAR; PARASHAR;

ALAGARASU, 2017). Ademais, tanto o ZIKV quanto o CHIKV antagonizam as respostas dos interferons tipo I que são conhecidos por promover um estado antiviral nas células, contribuindo assim, para uma eliminação ineficiente do vírus (FROS et al., 2010; GRANT et al., 2016).

Ainda, vários casos confirmados de coinfeções com os ZIKV e CHIKV foram descritos na literatura (NAYAR et al., 2007; PHOMMANIVONG et al., 2016; WAGGONER et al., 2016; PRATA-BARBOSA et al., 2018; ELIGIO-GARCÍA et al., 2020) e há evidências de alteração da resposta imunológica durante coinfeções (RUIZ SILVA et al., 2017; BADOLATO-CORRÊA et al., 2018). Apesar disso, permanecem as lacunas no conhecimento sobre como as coinfeções por arbovírus afetam as condições clínicas e os impactos na progressão das doenças coexistentes.

Portanto, dado o aumento no número de casos relatados por infecções pelos arbovírus (ZIKV/CHIKV) no Brasil, principalmente na região nordeste do país e a possibilidade de coinfeção, este trabalho busca quais os aspectos da resposta imune podem contribuir para a evolução das infecções ZIKV/CHIKV. Cabe, ressaltar que há lacunas na literatura relacionadas às concentrações de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e fatores de crescimento com os quadros clínicos desencadeados em monoinfecções (ZIKV ou CHIKV), coinfeções por ZIKV/CHIKV e em casos crônicos de CHIKV.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Arbovírus/arboviroses

Os arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos aos hospedeiros vertebrados e são uma causa significativa de morbidade e mortalidade humana em todo o mundo, especialmente, em regiões tropicais e subtropicais onde os artrópodes tendem a ser abundantes devido às condições climáticas favoráveis a sua proliferação (BARZON, 2018).

De acordo com o Catálogo de Arbovírus do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, existem mais de 600 espécies de arbovírus descritas das quais aproximadamente 150 espécies são responsáveis por causar infecções em seres humanos. Esse número pode representar menos de 1% de todos os arbovírus existentes, uma vez que, a maioria das infecções ocorrem entre hospedeiros não humanos. Contudo, as principais espécies causadoras de doença nos humanos estão classificadas nas famílias: *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* (CONWAY et al., 2014; BARZON, 2018).

Nas últimas décadas houve o ressurgimento de vários arbovírus e a capacidade deles de se adaptarem a novos vetores pode ter um grande impacto na expansão geográfica desses vírus. Além disso, outros fatores como mudanças genéticas (TSETSARKIN et al., 2014), mudanças climáticas (GOULD; HIGGS, 2009), aumento da urbanização e falta de controle eficaz dos vetores também podem contribuir para o reaparecimento dos arbovírus (WEAVER; REISEN, 2010; DIDIER MUSSO ET. AL., 2016).

Estimativas apontam que as doenças arbovirais (arboviroses) mais prevalentes no mundo são as causadas pelos vírus *Dengue* (DENV) com cerca de 96 milhões de casos/ano, CHIKV com aproximadamente 693 mil casos/ano (Américas), ZIKV com cerca de 500 mil casos/ano (Américas) e vírus causador da febre amarela com previsão de 130 mil casos/ano (África)(FRANKLINOS et al., 2019).

No Brasil, essas arboviroses ganharam destaque especialmente a partir dos anos 90 com a epidemia de Dengue e mais recentemente, nos anos 2014-2015 com o advento dos primeiros casos confirmados de ZIKV e CHIKV no nordeste do país (TEIXEIRA et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015), especialmente, devido às complicações clínicas desencadeadas pelos indivíduos infectados. Com isso, estabeleceu-se um estado de emergência determinado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2016), implicando em ações de monitoramento epidemiológico, incentivo ao desenvolvimento e

aperfeiçoamento de exames diagnósticos em tempo ágil, específicos, bem como, em estímulos para as pesquisas científicas visando melhorar o entendimento sobre os mecanismos patológicos na tentativa de combater a expansão desses vírus (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

2.2 Agentes Etiológicos

2.2.1 Vírus Zika (ZIKV)

O ZIKV é um vírus pertencente à família *Flaviviridae*, ao gênero *Flavivirus* e era considerado um agente causador de doenças brandas até o surto originado na Polinésia Francesa, em 2013. Possui seu material genético composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva apresentando 10,8 kpb, que codifica três proteínas estruturais (capsídeo - C, membrana - M, envelope - E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (WANG et al., 2017).

A partir da análise filogenética, as cepas do ZIKV foram agrupadas em três linhagens: a do leste africano, a do oeste africano e a asiática e identificou-se um total de 75 substituições de aminoácidos entre as linhagens africanas e asiáticas, tendo a proteína de membrana como a região de maior variabilidade. Entretanto, as sequências gerais do ZIKV apresentam mais 88,9% de similaridade. As cepas responsáveis pelo surto de ZIKV no Brasil se assemelham com as cepas da linhagem asiática e apresentaram mutações de 14-18 aminoácidos quando comparadas com outras da linhagem asiática isoladas de humanos (WANG et al., 2016).

A transmissão ocorre através de dois ciclos já bem estabelecidos: o ciclo silvestre – que ocorre entre primatas não humanos e mosquitos, principalmente, mosquitos do gênero *Aedes* e o ciclo urbano – que ocorre entre mosquitos e humanos (WEAVER et al., 2016). Ainda, sabe-se que a transmissão pode ocorrer através do contato sexual com a confirmação da presença do RNA viral no sêmen por vários meses, de forma vertical, entre 20% a 30% das gestantes infectadas, também consistente com a detecção do RNA viral pela transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em líquido amniótico de gestantes (MERCADO et al., 2020) e por transfusão sanguínea (MOREIRA et al., 2017; PIELNAA et al., 2020).

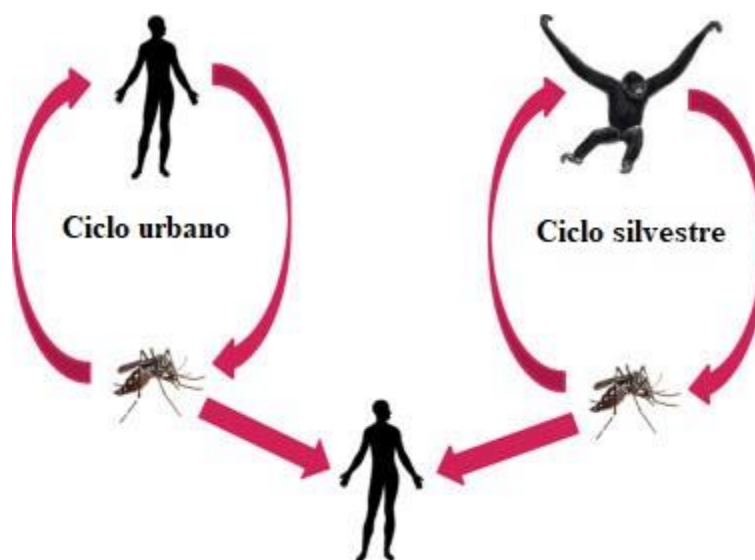
2.2.2 Vírus *Chikungunya* (CHIKV)

O CHIKV é um vírus artritogênico pertencente à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. Seu genoma consiste em uma única fita de RNA com sentido positivo de 11,8 kpb que origina quatro proteínas não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), cinco proteínas estruturais (capsídeo, E1, E2, E3 e 6K). A partícula viral é esférica, com aproximadamente 70 nm de diâmetro, formada por 240 cópias da proteína do capsídeo e envolta por um envelope composto por uma bicamada lipídica. Inseridos no envelope estão 80 trimeros formados pelas glicoproteínas E1 e E2 (JOSE; KUHN, 2009; CUNHA; TRINTA, 2017).

Foram identificados quatro genótipos para o CHIKV de acordo com a sua distribuição geográfica: o da África Oriental, Central e do Sul – ECSA, da África Ocidental, da Ásia e do Oceano Índico - IOL. As linhagens ECSA (Feira de Santana – BA) e asiáticas (Oiapoque - AM) foram as responsáveis pelos primeiros casos relatados no Brasil (NUNES et al., 2015).

A transmissão ocorre de forma semelhante ao ZIKV já mencionada anteriormente, com ciclos de transmissão urbano e silvestre (Figura 1), tendo a principal forma de manutenção do ciclo silvestre em regiões africanas e em áreas densamente povoadas prevalece o ciclo urbano com humanos atuando como hospedeiros e mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* como principais vetores (SINGH; UNNI, 2011).

Figura 1. Ciclos de transmissão dos vírus Zika e Chikungunya



(Adaptado de SINGH; UNNI, 2011)

2.3 Vetores do ZIKV e CHIKV

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* são conhecidos como principais vetores dos ZIKV e CHIKV (KAMAL et al., 2018). O *Aedes aegypti* foi descrito pela primeira vez em 1862 nas florestas africanas, enquanto que o *Aedes albopictus* foi relatado em 1894 nas florestas do sudeste asiático (SMITH, 1956) e por muito tempo esses vetores permaneceram restritos a essas regiões. Contudo, o *Aedes aegypti* substituiu amplamente o *Aedes albopictus* em regiões do sudeste da Ásia na primeira metade do século XX e o *Aedes albopictus* foi introduzido nas Américas após uma diminuição do número de *Aedes aegypti* na década de 1980. Hoje, são comumente encontrados em regiões periurbanas, rurais e florestais nos cinco continentes (FORATTINI, 1986; MEDLOCK et al., 2012; BRAKS et al., 2004).

As taxas de infecção, disseminação e transmissão desses vetores variam de acordo com a localização geográfica dos mosquitos testados. Em locais onde *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* coexistiam, o *Aedes albopictus* foi considerado vetor secundário desses arbovírus (ZIKV/CHIKV) por muito tempo. No entanto, a sua relevância como vetor se deu a partir de um surto de CHIKV ocorrido na Ilha da Reunião em 2006, onde foi detectada a mutação no aminoácido 226 da proteína E1 (E1-A226V) do vírus que possibilitou o aumento da infectividade e da transmissibilidade do vírus em *Aedes albopictus* (TSETSARKIN et al., 2007). Atualmente, o *Aedes albopictus* é reconhecido pela sua capacidade de transmitir mais de 20 arbovírus, incluindo o ZIKV (PAUPY et al., 2009; GUO et al., 2020).

Os mosquitos *Aedes* põem ovos em áreas de alta umidade ocorrendo a transformação de larvas para pupas chegando a fase adulta de maturação. Esse ciclo leva aproximadamente de uma semana e meia a três semanas para ser finalizado. Quando atinge a fase adulta, as fêmeas são capazes de produzir de 100 a 200 ovos por prole atingindo até 5 proles durante sua vida (HUSSAIN et al., 2018).

A infecção desses mosquitos ocorre no momento da alimentação por hematofagia de um hospedeiro virêmico. Com isso, os vírus se replicam no intestino médio, em seguida, entram na hemocele antes da disseminação para as glândulas salivares (DONG et al., 2017). O período de incubação é de 2-5 dias, demonstrando que mesmo em populações de mosquitos com vida curta, é possível que haja a transmissão de maneira eficaz através de fêmeas com saliva infectada para um outro hospedeiro (WEAVER;

CHEN; DIALLO, 2019). Além disso, é possível a ocorrência da transmissão de mais de um arbovírus simultaneamente pelo mesmo vetor (RÜCKERT et al., 2017).

2.4 Infecções simultâneas por arbovírus (Coinfecções)

Com a confirmação de que o *Aedes aegypti* pode se infectar/ transmitir vários arbovírus ao mesmo tempo e a introdução dos ZIKV e CHIKV nas Américas recentemente, aumentaram-se as chances de um mesmo indivíduo se infectar por mais de um arbovírus simultaneamente. Contudo, ainda não se sabe quais os reais impactos clínicos e epidemiológicos causados pelo aumento da frequência de coinfecções arbovirais, pois os estudos realizados com humanos são limitados e concentrados apenas na descrição dos casos (RÜCKERT et al., 2017; MERCADO-REYES et al., 2019).

Embora seja complexo compreender as interações que ocorrem durante uma coinfecção viral, existem hipóteses a respeito dos potenciais mecanismos envolvidos nesse cenário: como o aumento de ambos os vírus, a inibição de ambos os vírus, a competição entre os vírus e nenhum efeito em nenhum vírus (VOGELS et al., 2019).

Os vírus ZIKV e CHIKV são conhecidos por inibir os transdutores de sinal e ativadores da transcrição 1 e 2 (STAT1 e STAT2) que são dois transdutores de sinais envolvidos na produção de interferons tipo I, estes são componentes importantes relacionados à resposta imune inata e a resposta antiviral, com isso, pode haver a facilitação da replicação de ambos os vírus (HOLLIDGE; WEISS; SOLDAN, 2011; GRANT et al., 2016).

Mesmo que a coinfecção não influencie no aumento da replicação viral, ela ainda pode contribuir para o agravamento da doença devido às alterações da resposta imunológica, já que há relatos que confirmam casos graves com comprometimento neurológico, por exemplo, após infecções por múltiplos arbovírus (BRITO et al., 2017; BADOLATO-CORRÊA et al., 2018). Entretanto, pode também existir a possibilidade do desenvolvimento potencializado de um estado antiviral, não patogênico, que reduza a gravidade das doenças.

Outra alternativa de mecanismo atuante durante as coinfecções seria a competição entre os arbovírus envolvidos resultando na apresentação clínica idêntica a monoinfecção do vírus com maior taxa de replicação como já demonstrado, uma vez que, os ZIKV e CHIKV utilizam os mesmos tipos celulares para replicação (SARDI et al., 2016), ou

ainda, que os vírus tenham a capacidade de atuarem como se o outro não existisse, não havendo impactos na replicação viral e nem na gravidade das doenças desencadeadas, pois a maioria dos casos relatados de coinfecção, a apresentação clínica não diferiu da apresentação clínica de uma monoinfecção. Portanto, fica evidente que várias questões ainda precisam ser respondidas no contexto das coinfecções pelos arbovírus ZIKV e CHIKV (VOGELS et al., 2019).

2.5 Epidemiologia

2.5.1 Vírus Zika (ZIKV) no mundo e no Brasil

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 de um macaco *Rhesus* na floresta Zika em Uganda e posteriormente identificado em mosquitos *Aedes africanus* na mesma floresta (DICK G, 1952). Em 1954 foi constatado o primeiro caso de infecção em humanos na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Até 2007, quando ocorreu o primeiro grande surto de infecções pelo ZIKV na Ilha de Yap (Micronésia), poucos foram os casos relatados fora da África e da Ásia (LANCIOTTI et al., 2008).

Nesse surto ocorrido na Ilha de Yap foi estimado que aproximadamente 73% dos 6.892 habitantes com idade maior ou igual a 3 anos foram infectados pelo ZIKV e através do sequenciamento viral foi possível sugerir que a introdução do ZIKV na ilha foi originada de cepas circulantes no sudeste da Ásia (LANCIOTTI et al., 2008; DUFFY et al., 2009).

No início da década 2010, casos mais frequentes de infecção pelo ZIKV aconteceram em países do sul da Ásia como no Camboja (HEANG et al., 2012), na Tailândia (BUATHONG et al., 2015), na Malásia (TAPPE et al., 2015) e na Indonésia (KWONG; DRUCE; LEDER, 2013). Ainda, o surto ocorrido na Polinésia Francesa (2013-2014) atingiu cerca de 11% da população total com a observação da incidência cerca de vinte vezes maior do comprometimento neurológico nos indivíduos infectados quando comparado aos surtos anteriores (CAO-LORMEAU et al., 2016a).

No Brasil, os primeiros casos de transmissões autóctones foram detectados na região nordeste, no estado do Rio Grande do Norte, no início de 2015 e ao final deste ano, 18 estados já haviam confirmados laboratorialmente a transmissão de ZIKV no país (ZANLUCA et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Em 2016, até a semana epidemiológica 50, o Brasil apresentou 215.795 casos prováveis de infecção por ZIKV, com uma taxa de incidência de 104,7 casos/ 100 mil habitantes. A análise da taxa de

incidência por regiões, demonstrou que a região Centro-Oeste obteve a maior taxa de incidência: 217,7 casos/ 100 mil habitantes, destacando-se o estado do Mato Grosso com taxa de incidência de 653,6 casos/ 100 mil habitantes e a região Nordeste com a segunda maior taxa de incidência: 136,1 casos/ 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Nesse mesmo ano, o estado de Sergipe compartilhou a mesma situação dos demais estados do país apresentando 221 casos confirmados e uma taxa de incidência de 9,6 casos/100 mil habitantes. De acordo com a análise da taxa de incidência por regiões de saúde do estado (Aracaju, Estância, Itabaiana, Lagarto, Nossa Senhora da Glória, Nossa Senhora do Socorro e Propriá), a região de saúde de Itabaiana apresentou maior taxa de incidência: 38,71 casos/ 100 mil habitantes. Além disso, 27 municípios do estado apresentaram casos notificado para o vírus; destes, apenas 1 (São Miguel do Aleixo) demonstrou alta incidência (mais de 300 casos/ 100 mil habitantes), 2 apresentaram média incidência (100-300 casos/ 100 mil habitantes) e 24 apresentaram baixa incidência (menos de 100 casos/ 100 mil habitantes) (SERGIPE, 2017).

Nos anos seguintes houve um declínio no número de casos notificados, em 2020, até a semana epidemiológica 51, o número de casos notificados não ultrapassou a marca dos 7.387 casos prováveis em todo o país com a taxa de incidência de 3,5 casos/ 100 mil habitantes. A região Nordeste liderou a taxa de incidência (9,2 casos/ 100 mil habitantes) e o estado da Bahia concentrou 47,9% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021b). Para Sergipe houve a confirmação de 152 casos distribuídos nos seguintes municípios: Aracaju, Aquidabã, Barra dos Coqueiros, Cristinápolis, Estância, Itabaiana, Itabaianinha, Lagarto, Neópolis, Nossa Senhora do Socorro, São Cristóvão e Simão Dias (SERGIPE, 2020).

Até as semanas epidemiológicas 45 de 2021 e 2022 ocorreram 312 casos confirmados e 119 casos confirmados, respectivamente, em Sergipe (SERGIPE, 2022).

2.5.2 Vírus *Chikungunya* no mundo e no Brasil

O primeiro relato do CHIKV ocorreu durante um surto no planalto Makonde, no sul da Tanzânia, na fronteira com Moçambique em 1952 e no ano seguinte foi isolado em mosquitos *Aedes aegypti* o que possibilitou sua classificação com arbovírus (MASON; HADDOW, 1957). Em 1958, foi descrito o primeiro surto asiático em Bangkok na Tailândia e depois em diversas partes da Índia (1963-1965). Já nos anos 1999-2000 outra

epidemia foi documentada na República Democrática do Congo, que atingiu cerca de 50.000 pessoas (PASTORINO et al., 2004). Em anos posteriores, uma nova epidemia foi relatada na Indonésia (2001-2003) (LARAS et al., 2005) e após de 32 anos sem registros de casos, a doença ressurgiu na Índia afetando cerca de 1,3 milhões de indivíduos em 13 estados diferentes (2004) (RAVI, 2006; DEEBA et al., 2015).

Entre os anos de 2005 e 2006 um relevante surto varreu as ilhas do Oceano Índico, com destaque para o ocorrido na Ilha da Reunião, onde a maioria das infecções eram sintomáticas, com a estimativa de aproximadamente 266 mil casos e uma taxa de prevalência de 34,3% (GÉRARDIN et al., 2008). Observou-se também nesse surto a caracterização de uma linhagem derivada da ECSA: a linhagem do Oceano Índico e que teve como principal vetor o *Aedes albopictus* (ROSSINI; LANDINI; SAMBRI, 2016). Com isso, houve um impacto significativo na propagação do CHIKV, uma vez que, é extensa a distribuição geográfica desse vetor, especialmente em áreas temperadas (PAUPY et al., 2009).

A partir daí, a epidemia espalhou-se ainda mais com o surgimento de pequenos surtos no norte da Itália (2007) (REZZA et al., 2007), no sul da França (2010) (GRANDADAM et al., 2011) e os primeiros casos de transmissão autóctone no hemisfério ocidental aconteceram na Ilha de San Martin em outubro de 2013 com posterior disseminação para outras ilhas do Caribe. O genótipo asiático foi associado ao surto ocorrido no Caribe, de onde foi difundido para Flórida, norte do México, América Central e América do Sul (ROSSINI; LANDINI; SAMBRI, 2016).

No Brasil, a transmissão autóctone foi apresentada pela primeira vez relacionada ao genótipo asiático, no Oiapoque, estado do Amapá, em 2014. No mesmo ano, foi identificado o genótipo ECSA, em Feira de Santana, na Bahia, com estudos sugerindo que o genótipo ECSA foi introduzido no país por um viajante virêmico oriundo de Angola (TEIXEIRA et al., 2015). Ao total, no ano de 2014 foram notificados 3657 casos autóctones suspeitos de infecção por CHIKV em oito municípios pertencentes aos estados da Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul e ao Distrito Federal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Em 2015, nacionalmente, foram notificados 20.661 casos suspeitos da febre de *Chikungunya* com registro de 3 óbitos, sendo 2 no estado da Bahia e 1 no estado de Sergipe. O estado de Sergipe apresentou alta taxa de incidência para a região de saúde de Nossa Senhora do Socorro (331,88 casos/ 100 mil habitantes) e média incidência para a região de saúde de Itabaiana (176,15 casos/ 100 mil habitantes). No ano seguinte, foram

registrados 277.882 casos prováveis no país com a taxa de incidência de 134,3 casos/ 100 mil habitantes. Em Sergipe, foram relatados 9.242 casos prováveis de infecção com taxa de incidência de 407,9 casos/ 100 mil habitantes, destacando-se as regiões de saúde de Estância e Aracaju com altas taxas de incidência e que 71 municípios notificaram casos de Chikungunya (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; SERGIPE, 2017).

De maneira semelhante como ocorrido com os casos de ZIKV, houve uma redução no número de casos prováveis de infecção por CHIKV nos anos de 2017, 2018 e 2019. Segundo o boletim epidemiológico das semanas epidemiológicas de 03 janeiro de 2021 a 24 de julho de 2021, ocorreram 63.713 casos prováveis com taxa de incidência de 30,1 casos/ 100 mil habitantes, correspondendo a uma redução de 3,6% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Entretanto, no ano de 2022 até a semana epidemiológica 45, foram confirmados 3470 casos de Chikungunya no estado de Sergipe, 3 óbitos, com predominância de casos na faixa etária de 35-49 anos (26,1%) e pessoas do sexo feminino (60,4%) (SERGIPE, 2022).

2.6 Manifestações clínicas

2.6.1 Manifestações clínicas ocasionadas pelo ZIKV

Geralmente, as infecções causadas pelo ZIKV são assintomáticas (75%-80%) ou desencadeiam sintomatologia inespecífica como febre baixa, artralgia, mialgia, exantema, conjuntivite, com doença branda e autolimitada após um período de incubação que varia entre 3 a 14 dias. Entretanto, em alguns casos ocorrem o desenvolvimento de complicações neurológicas como a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ) ou como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) devido ao neurotropismo já associado ao ZIKV (MASMEJAN et al., 2020).

A SCZ é caracterizada por mal formações em fetos expostos ao ZIKV durante o período gestacional, com taxas de ocorrência variando entre 4% a 9%. Essas mal formações resultam em anomalias neurológicas graves que incluem anomalias cerebrais estruturais, hidropisia fetal, artrogripose (10%-29%), anomalias oculares (25%), microcefalia (33%-64%), hipertonia, distúrbios da deglutição (POMAR et al., 2019) e com isso, o desenvolvimento de crianças com SCZ foi prejudicado em quase 100% dos casos analisados em durante uma média de idade de 30 meses (WHEELER et al., 2020).

Além disso, mesmo em crianças que não foram constatadas anormalidades no nascimento, mas foram expostas ao ZIKV, seus scores de desenvolvimento foram inferiores quando comparados aos de crianças não expostas ao vírus, sugerindo assim que mesmo sem sintomas evidentes da SCZ a pré-exposição ao vírus pode ocasionar consequências graves ao desenvolvimento infantil (MASMEJAN et al., 2020).

A SGB foi associada às infecções pelo ZIKV a partir do surto ocorrido na Polinésia Francesa. Essa patologia é uma polirradiculoneuropatia aguda imunomediada que surge após infecções virais ou bacterianas, na qual a função motora é comprometida iniciando-se pelas extremidades de forma ascendente e que pode ter uma duração de até 4 semanas (VAN DEN BERG et al., 2014).

O risco do desenvolvimento da SGB aumenta com a idade e indivíduos do sexo masculino são mais afetados. Ela é a principal causa de paralisia não traumática no mundo com incidência global de 1-4 casos a cada 100 mil pessoas por ano (MCGROGAN et al., 2009). Todavia, os mecanismos moleculares envolvidos nos desfechos dos casos permanecem pouco compreendidos. No entanto, sabe-se que anticorpos IgG anti-antiglicopídeos são direcionados gangliosídeos, particularmente, em casos axonais da doença (CAO-LORMEAU et al., 2016b).

2.6.2 Manifestações clínicas ocasionadas pelo CHIKV

Após a infecção pelo CHIKV, demora-se um período de 1 a 12 dias para o aparecimento dos sintomas. Esses sintomas incluem febre alta de início súbito, exantema, cefaleia, mialgia, náuseas e o que pode diferir de outras arboviroses são as fortes dores nas articulações. As taxas de infecções sintomáticas estão em torno dos 70% e, ainda que, os sintomas agudos tenham a tendência de desaparecer por volta de duas semanas, a artralgia pode perdurar por meses ou até mesmo anos. Com isso, o curso clínico da doença está dividido em três fases: fase aguda, fase subaguda e fase crônica (PINHEIRO et al., 2016).

A fase aguda ou febril da doença é conhecida por apresentar febre alta contínua, poliartralgia intensa e/ ou artrite e exantema. São mais intensas nos primeiros 3 dias podendo persistir até o sétimo dia. A poliartralgia é descrita em mais de 90% dos casos de pacientes adultos com padrão simétrico, acometendo principalmente as articulações das mãos, do punho, dos ombros, dos joelhos, dos tornozelos e pés acompanhada de edema. O exantema é maculopapular e acomete cerca de 50% dos doentes, do segundo

ao quinto dia após o início da febre, atingindo o tronco e as extremidades do corpo. A presença de prurido ocorre em cerca de 25% dos casos. Outros sinais e sintomas descritos na fase aguda são dor retro-ocular, calafrios, conjuntivite sem secreção e manifestações do trato gastrointestinal que são mais frequentes em crianças (KRUTIKOV; MANSON, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017).

Durante a fase subaguda, entre 45%-75% dos pacientes persistem com sintomatologia até 3 meses. Normalmente, nessa fase a febre desaparece, mas pode haver piora dos sintomas articulares associados à rigidez matinal. Também foi relatado sintomas como astenia, surgimento de lesões purpúricas, vesiculares e bolhosas, depressão e alopecia (DE BRITO et al., 2020).

Quando os sintomas persistem por mais de 3 meses é estabelecido a fase crônica da doença. Nesta fase, a dor articular, musculoesquelética e neuropática são frequentes, intensas e incapacitantes. A dor neuropática alcança cerca de 20% dos pacientes e em um estudo realizado sobre o impacto da doença na vida dos indivíduos infectados pelo CHIKV após 36 meses, foi confirmado que 62,9% dos pacientes relataram dificuldades para se levantar a partir da posição sentada, 54,8% tinham dificuldades para andar, 54,8% dos indivíduos tinham dificuldades para pegar objetos e 37,1% tinham dificuldades para tomar banho. Demonstrou-se ainda, que a doença não contribuiu apenas para limitações físicas, também afetou o estado emocional dos pacientes onde 56,4% deles apresentaram distúrbios do sono, 50% apresentaram depressão e 43,5% relataram distúrbios de memória e concentração (SCHILTE et al., 2013).

Em uma outra avaliação oriunda da Ilha da Reunião, pôde-se verificar que 112 dos 159 pacientes analisados na fase crônica da doença desenvolveram doença reumática crônica, sendo que 40 deles atendiam aos critérios clínicos e radiológicos para artrite reumatoide, 33 para espondiloartrite e 21 para poliartralgia indiferenciada, todos sem histórico prévio de doença reumática (JAVELLE et al., 2015).

Além disso, podem ocorrer as manifestações clínicas atípicas (Quadro 1). Estas manifestações podem acontecer devido ao efeito direto do próprio vírus, à resposta imunológica desencadeada ou pela toxicidade a medicamentos e são associadas ao maior risco de evolução para óbitos.

Vários fatores têm sido discutidos como preditores do curso clínico das doenças causadas pelo CHIKV, entre eles estão: ser do sexo feminino, ter mais de 45 anos, comprometimento reumático grave, níveis de proteína C elevados na fase inicial da doença, persistência de IgM positivo, presença de comorbidades como diabetes, asma,

insuficiência cardíacas e doenças reumáticas pré-existentes (GÉRARDIN et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2017).

Quadro 1: Manifestações atípicas relacionadas a infecção por CHIKV

Sistema / órgão	Manifestações
Nervoso	Meningoencefalite, encefalopatia, convulsão, síndrome de Guillain-Barré, Síndrome cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias.
Olho	Neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite e uveíte.
Cardiovascular	Miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmia, instabilidade hemodinâmica.
Pele	Hiperpigmentação por fotossensibilidade, dermatoses vesiculobolhosas, ulcerações aftosa-like.
Rins	Nefrite e insuficiência renal aguda.
Outros	Discrasia sanguínea, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, síndrome da secreção inapropriada do hormônio antidiurético, insuficiência adrenal.

(Ministério da Saúde, 2015)

2.7 Aspectos imunológicos das infecções por arbovírus

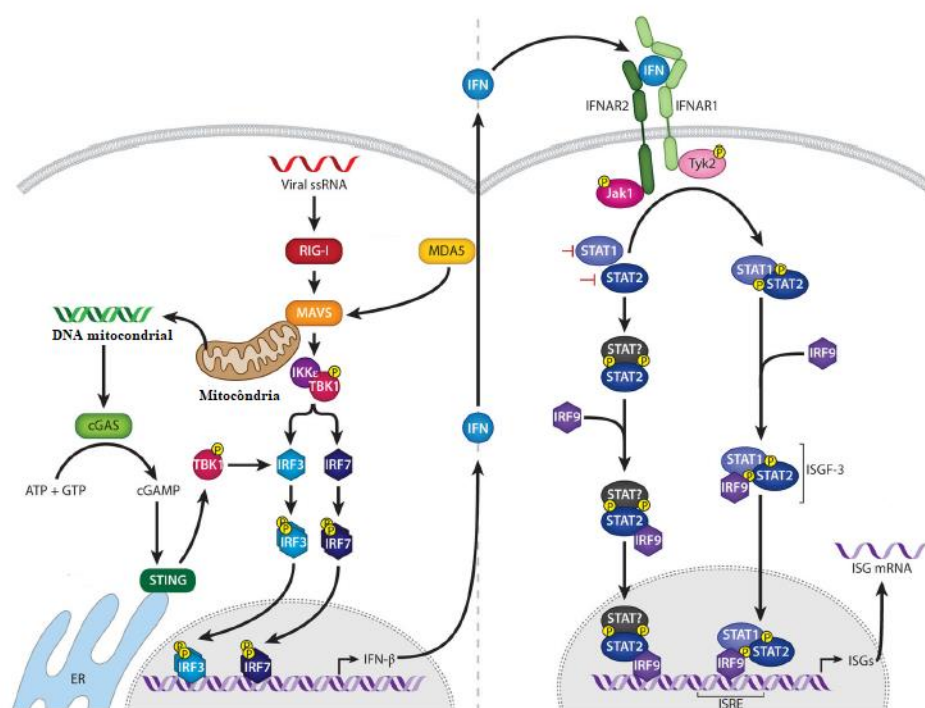
2.7.1 Aspectos imunológicos associados ao ZIKV

A resposta imunológica antiviral humana desempenha um papel crítico na defesa do hospedeiro contra as infecções virais. Sua ativação ocorre em duas etapas: processos inatos inespecíficos com duração entre os 5 a 7 primeiros dias da infecção e os processos adaptativos específicos mediados por linfócitos B e T (CORNISH et al., 2020).

Durante a infecção por vírus de RNA de fita simples como o ZIKV, a replicação viral ocorre no interior celular e os vírus começam a ser detectados pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como os receptores do gene I induzido pelo ácido retinóico (RIG-I) e do antígeno de diferenciação associado ao melanoma 5 (MDA5). Após esse reconhecimento, a proteína adaptadora de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS) desencadeia a ativação de quinases para ativar os fatores de transcrição reguladores de interferons (IRFs) e o NF-kB para induzir a produção de interferons do tipo I (IFN- α /IFN- β) (ZEVINI; OLAGNIER; HISCOTT, 2017). Uma vez secretados por células infectadas por vírus, eles agem de forma parácrina induzindo a expressão dos

genes estimulados por interferons (ISGs) em células vizinhas promovendo um estado antiviral no ambiente circundante. Os interferons do tipo I quando se ligam ao receptor de interferon do tipo I (IFNAR), que é um heterodímero composto pelas cadeias IFNAR1 e IFNAR2, levam a ativação das proteínas quinases Janus quinase I (JAK-1) e da tirosina quinase 2 (TYK-2) associadas ao receptor. Estas por sua vez, fosforilam e ativam os fatores de transcrição STAT-1 e STAT-2 que se associam ao IRF-9 para a formação do complexo ISGF-3, o qual dispara elementos estimuladores da resposta por IFNs (IRSEs) (Figura 2). Os ISGs obtidos atuam em diversos processos celulares incluindo o processamento do RNA, a estabilidade de proteínas e viabilidade celular, afetando diretamente as etapas do ciclo de vida viral, além de fornecer sinais para ativação da resposta imune adaptativa (ELONG NGONO; SHRESTA, 2018).

Figura 2: Via de produção e sinalização dos interferons tipo I a partir de infecção por vírus de RNA. Após infecção viral, o RNA viral é detectado pelo receptor de reconhecimento padrão (RIG-I) que induz vários fatores de transcrição para a produção de interferon. O interferon secretado se liga ao receptor de interferon tipo I para ativar a via (JAK-STAT) para promover a expressão de genes estimuladores de interferon (ISGs). ER: retículo endoplasmático, IRF: fator regulador de interferon, ISGF: fator de gene estimulador de interferon, ISRE: elemento de resposta estimulada por interferon, MAVS: proteína de sinalização antiviral mitocondrial, ssRNA: RNA de fita simples. (Adaptado de ELONG NGONO; SHRESTA, 2018).



Diversos estudos têm demonstrado que a replicação do ZIKV é inibida por interferons do tipo I em vários tipos de células humanas e em modelos animais (HAMEL et al., 2015). Contudo, o ZIKV é capaz de neutralizar essa resposta antiviral evitando a fosforilação de STAT1 e induzindo a degradação de JAK-1 e STAT2 por meio de sua interação com as proteases NS2B-NS3 e NS5 constituindo assim, um dos principais mecanismos de evasão da resposta imunológica (GRANT et al., 2016; BOWEN et al., 2017; XIA et al., 2018).

A infecção por ZIKV também induz respostas robustas de células T CD4⁺, com perfil Th1 caracterizadas pela produção de IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL-2, enquanto que as células T CD8⁺ contribuem para a proteção através de seu mecanismo citotóxico específico e da superregulação de IFN- γ e TNF- α (WEN; SHRESTA, 2017).

Outro aspecto relevante em relação a resposta imunológica ocasionada pelo ZIKV é o aumento da viremia ou gravidade da doença devido ao aumento dependente de anticorpo (ADE). Este fenômeno consiste na produção de anticorpos com reatividade cruzada e não neutralizantes, por exposição prévia a outro *Flavivirus*, devido ao favorecimento da infecção nas células pelo receptor da porção Fc (FcR) das imunoglobulinas (PAUL et al., 2016).

Na fase aguda da doença foram relatados aumentos significativos das concentrações de algumas citocinas e quimiocinas em pacientes infectados pelo ZIKV quando comparados a controles saudáveis (IP-10, IL-9, IL-5, IL-4, IL-1RA, IFN- γ) com a associação das citocinas IL-5 e IP-10 a quadros clínicos com exantema e cefaleia, respectivamente, e IL-1RA à presença de artralgia. Além disso, quando foram comparadas as concentrações de citocinas entre a fase aguda e a fase de recuperação da doença, observou-se diminuição das concentrações de IP-10, RANTES, IFN- γ , IL-9, IL-7, IL-1RA e IL-5 na fase de recuperação com o aumento de IL-12p70 (BARROS et al., 2018).

Em pacientes grávidas que carregavam fetos com anormalidades no desenvolvimento fetal foi demonstrado níveis muito altos de 12 mediadores (IL-8, IL-4, IL-18, IL-22, IL-23, IL-27, MCP-1, TNF- α , IP-10, eotaxina, FGF-2), sendo que IL-22, MCP-1, IP-10 e TNF- α apresentaram níveis diferenciais em comparação a mulheres grávidas que carregam fetos normais parecendo servir como marcadores de prognóstico para bebês de gestantes infectadas pelo ZIKV (KAM et al., 2017). Altas concentrações de TNF- α e MCP-1 foram encontradas em células cerebrais fetais humanas infectadas

com ZIKV, o que implica em seu papel na neuroinflamação (LUM et al., 2017). A ausência de IL-22 em camundongos conferiu uma redução na ativação da micróglia e de astrócitos do córtex cerebral e favoreceu a montagem da resposta T CD8⁺ específica contra ZIKV contribuindo para o controle mais eficaz da infecção no cérebro (LIANG et al., 2020).

2.7.2 Aspectos imunológicos associados ao CHIKV

Os mecanismos moleculares que acompanham as patologias observadas na infecção por CHIKV não são completamente compreendidos e ainda não se sabe se a forte artralgia desenvolvida é consequência da ação direta do vírus. No entanto, como as características clínicas são semelhantes às dos pacientes com artrite reumatoide (AR), acredita-se que os mecanismos imunes sejam compartilhados nas duas patologias (AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017).

A resposta inata à infecção por CHIKV é principalmente regulada pelos interferons do tipo I (WAUQUIER et al., 2011). Em animais com a via do interferon inibida, foi possível observar que a gravidade da doença estabelecida se correlacionava com a replicação viral, com o tropismo e disseminação tecidual (COUDERC et al., 2008). Além da resposta antiviral via interferons I, a fase inicial da infecção está associada a uma significativa liberação de citocinas inflamatórias nos tecidos-alvo. As citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-16), quimiocinas (CCL-2, CCL-4 e CXCL-10), citocinas regulatórias (IL-1RA, IL-10, IL-13) e fatores de crescimento (G-SCF, GM-SCF, VEGF) apresentaram-se mais elevados no plasma de pacientes infectados com CHIKV do que em controles saudáveis (TENG et al., 2015).

Alguns biomarcadores imunológicos já foram descritos como característicos de gravidade na infecção pelo CHIKV, entre eles, o aumento de IL-1 β , IL-6 e diminuição de RANTES (NG et al., 2009). Também, níveis baixos de TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-13 durante a fase aguda foram sugeridos como preditores de doenças crônicas nas articulações assim como, a IL-17A e a IL-27 foram correlacionados com o número de articulações acometidas (GUALBERTO CAVALCANTI et al., 2019; CHIRATHAWORN; CHANSAENROJ; POOVORAWAN, 2020).

Além disso, as células B são essenciais para a eliminação do vírus e as células T CD4⁺ foram demonstradas como significativas para a doença artrítica pelo CHIKV em animais e em pacientes (NAKAYA et al., 2012; OH et al., 2015). As células Treg que

interagem com células dendríticas foram capazes de regular negativamente essas células quanto a sinalização coestimulatória, reduzindo a expansão de células T CD4⁺ específicas ao CHIKV promovendo a redução do inchaço em articulações de camundongos (LEE et al., 2015).

Um questionamento importante sobre a artrite crônica ocasionada pela infecção do CHIKV é se a infecção persistente é responsável pelos sintomas reumáticos crônicos, visto que, os estudos realizados até o momento apresentam resultados controversos.

2.8 Diagnósticos diferenciais

É desafiador diferenciar os sinais e sintomas clínicos das infecções pelos ZIKV e CHIKV de outros arbovírus, especialmente quando há a cocirculação na mesma região geográfica. Os indivíduos apresentam sintomas semelhantes sendo difícil diferenciar a frequência e a intensidade desses sintomas (Quadro 2). Então, se faz necessário a utilização de testes diagnósticos laboratoriais específicos para confirmação da infecção.

Quadro 2: Diagnóstico clínico diferencial Dengue x Zika x Chikungunya. * Pode ocorrer risco de morte nos casos neurológicos como a SGB decorrente de Zika ou para crianças com malformações congênicas graves.

Sinais/Sintomas	Dengue	Zika	Chikungunya
Febre	>38°C	Sem febre ou subfebril (≤38°C)	Febre alta >38°C
Duração	4 a 7 dias	1-2 dias subfebril	2-3 dias
<i>Rash</i>	Surge a partir do quarto dia	Surge no primeiro ou segundo dia	Surge 2-5 dias
Frequência	30% a 50% dos casos	90% a 100% dos casos	50% dos casos
Milágia (Frequência)	+++	++	+
Artralgia (frequência)	+	++	+++
Intensidade da dor articular	Leve	Leve/Moderada	Moderada/Intensa
Edema da articulação	Raro	Frequente e leve intensidade	Frequente e de moderada a intenso
Conjuntivite	Raro	50% a 90% dos casos	30%
Cefaleia	+++	++	++
Hipertrofia ganglionar	+	+++	++
Discrasia hemorrágica	++	Ausente	+
Risco de morte	+++	+	++
Acometimento Neurológico	+	+++	++
Leucopenia	+++	+++	+++
Linfopenia	Incomum	Incomum	Frequente
Trombocitopenia	+++	Ausente (raro)	++

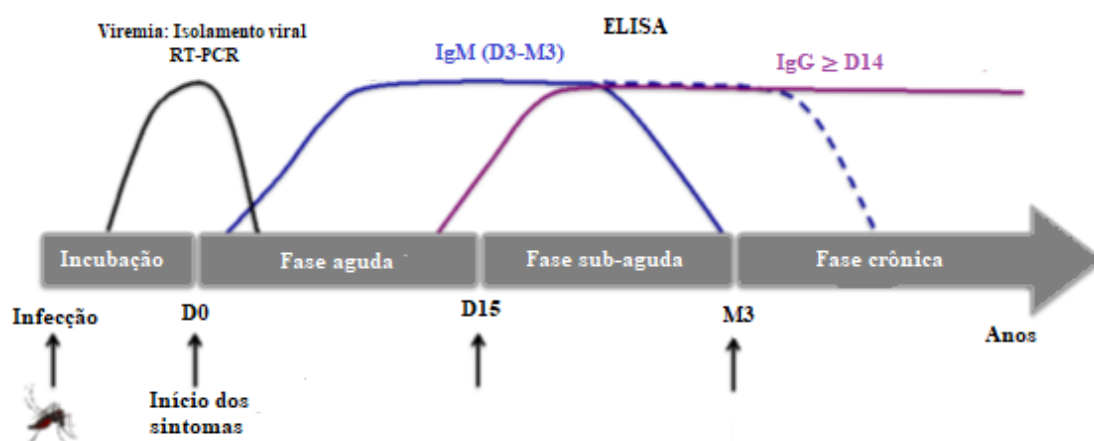
(Ministério da saúde, 2015.)

Os testes laboratoriais são baseados no isolamento viral, na detecção do material genético e na detecção de anticorpos (testes sorológicos) (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). Apesar de não ser comum na rotina diagnóstica, o isolamento viral pode ser realizado a partir de amostras de soros até 7 dias após o início dos sintomas e inoculados em células de linhagens de mosquitos ou mamíferos, nas quais os efeitos citopáticos podem aparecer entre um a três dias após a inoculação (LI et al., 2012).

Os testes moleculares como a transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em tempo real são testes mais sensíveis, rápidos e permitem a detecção do RNA viral de todas as linhagens com alta especificidade, normalmente, em amostras até o sétimo dia após o início dos sintomas sendo o maior período maior viremia ocorre entre o primeiro e o quinto dia de sintomas (LANCIOTTI et al., 2007).

Em estágios mais avançados da doença, são utilizados os métodos imunoenzimáticos como o ELISA (Enzyme-Linked Assay) para a determinação de anticorpos IgM/ IgG em fase aguda ou convalescente da doença. O IgM pode ser detectado de 3 dias (D3) a três meses (M3) após o início da doença enquanto o IgG, geralmente, por ser detectado a partir do décimo quarto dia (D14) por vários anos (SILVA JR. et al., 2018) (Figura 3).

Figura 3: Métodos diagnósticos e produção de anticorpos. D0: dia zero da infecção, D15: dia 15 após a infecção, M3: 3 meses após a infecção.



(Adaptado de LEVI, VIGUNUZZI, 2019).

2.9 Prevenção e tratamento

As arboviroses causadas pelo ZIKV e CHIKV tornaram-se um grave problema de saúde mundial com seus ressurgimentos. Embora suas taxas de mortalidade sejam baixas, a natureza debilitante e crônicas das doenças acarretam problemas sociais e econômicos para o desenvolvimento de um tratamento específico. Até o momento, não existem tratamentos ou vacinas específicas aprovadas contra esses vírus e a prevenção ao vetor das doenças ainda tem sido a melhor estratégia de combate das doenças. O tratamento é baseado nos cuidados paliativos dos sintomas com drogas analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórios não esteróides (SILVA; DERMODY, 2017).

Atualmente, várias vacinas estão em desenvolvimento contra o ZIKV e o CHIKV envolvendo uma grande variedade de plataformas tecnológicas: inativação viral, atenuação viral, partículas semelhantes a vírus, vetores virais e vacinas à base de ácidos nucleicos (CASTANHA; MARQUES, 2020; SCHMIDT; SCHNIERLE, 2022).

Um dos estudos mais avançados contra o CHIKV ocorre com a candidata a vacina VLA1553 com a parceria entre o Instituto Butantan e a empresa Valneva que demonstrou imunogenicidade por pelo menos 6 meses com manutenção da produção de anticorpos durante esse período em 96,3% dos indivíduos avaliados. Este estudo clínico de fase III foi realizado nos Estados Unidos e mais recentemente, um estudo foi iniciado com 750 adolescentes brasileiros das cidades de Ribeirão Preto, São Paulo, Salvador, Fortaleza, Belo Horizonte e Aracaju com duração estimada de 15 meses para avaliar a eficácia do imunizante em região endêmica (ROQUES et al., 2022). Para vacinas contra o ZIKV, os estudos clínicos de fase I e fase II permanecem em andamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

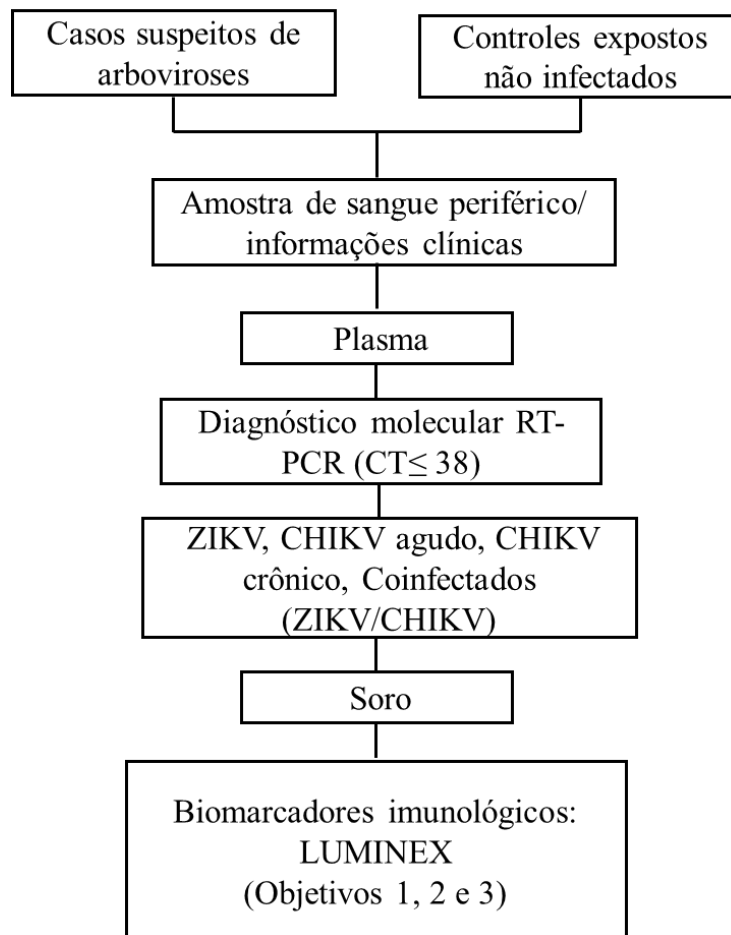
Avaliar o perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento relacionados às infecções causadas pelos vírus *Zika* e *Chikungunya*.

Justificativa: Os produtos analisados da resposta imune poderão servir como biomarcadores de infecção, coinfeções e cronicidade das doenças.

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar a presença de biomarcadores séricos relacionados à resposta imune (ZIKV e CHIKV) e associar à apresentação clínica e complicações das doenças.
2. Avaliar a resposta imune gerada em coinfeções entre os ZIKV/CHIKV e seus efeitos no desfecho das doenças
3. Caracterizar a resposta imunológica apresentada em pacientes infectados com CHIKV nas fases aguda e crônica da doença.

4 DESENHO DO ESTUDO (Série de casos com grupo controle)



5 METODOLOGIA

5.1 População estudada

Foram recrutados os pacientes adultos e crianças com suspeita de infecções pelos ZIKV e CHIKV, por busca ativa em municípios do estado de Sergipe, no ano de 2016, além dos que se apresentaram por demanda espontânea e de maneira não consecutiva nos ambulatórios de doenças infecciosas, clínicas médicas, reumatologia ou de outros serviços do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. Os casos clínicos suspeitos de arboviroses foram classificados de acordo com a sintomatologia apresentada pelos pacientes (febre, dores musculares, dores articulares, cefaleia, náuseas, e exantema maculo-papular) (Apêndice A). Esse hospital é a unidade de referência para o atendimento, tratamento e reabilitação dos casos de microcefalia de todos os municípios do estado de Sergipe. Além disso, existe o ambulatório de infectologia e outro de reumatologia para atendimento de casos de dor articular secundária às infecções causadas por esses vírus.

Os indivíduos participantes do estudo foram escolhidos aleatoriamente e divididos de acordo com o resultado da RT-PCR em tempo real nos seguintes grupos:

- **Indivíduos com ZIKV (n= 14):** pacientes com ZIKV detectável (ZIKV+) por RT-PCR em tempo real.
- **Indivíduos com CHIKV não crônicos – fase aguda (n=20):** pacientes com CHIKV (CHIKV+) detectável por RT-PCR em tempo real que não desenvolveram cronicidade dos sintomas.
- **Indivíduos com CHIKV crônicos – fase crônica (n=20):** pacientes com CHIKV detectável por RT-PCR em tempo real que desenvolveram cronicidade dos sintomas, ou seja, foi considerado artrite crônica os pacientes que apresentaram dor articular associada ou não a edema articular ou periarticular de início ou piora significativa (nos casos de doença articular prévia) após três meses da síndrome febril aguda.
- **Indivíduos com ZIKV e CHIKV (Coinfectados) – fase aguda (n=12):** pacientes com ZIKV e CHIKV detectáveis por RT-PCR em tempo real concomitantemente.

- **Indivíduos saudáveis (controles) (n=13):** indivíduos sadios, que não apresentaram sintomatologia relacionada aos arbovírus e com sorologias anti-ZIKV (IgM), antiCHIKV (IgM) e anti-DENV (IgM) negativas.

5.2 Diagnóstico das infecções por arbovírus

Os diagnósticos das infecções (ZIKV e CHIKV) foram realizados a partir da coleta de 5 mL de sangue em tubo contendo EDTA de indivíduos com suspeita das infecções, em seguida ocorreu a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O plasma obtido foi armazenado a -80°C para posterior realização da extração do RNA viral e da RT-PCR em tempo real no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do HU-SE e em parceria com o Laboratório Central do Estado de Sergipe (LACEN/SE).

5.2.1 Extração do RNA viral

Os RNAs virais das amostras foram extraídos a partir de 140 µL do plasma obtido, utilizando o QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN; Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante.

5.2.2 RT-PCR em tempo real

A RT-PCR em tempo real foi realizada a partir de 5 µL do RNA viral extraído e utilizando o kit da Invitrogen o SuperScript® III Platinum® (One-Step qRT-PCR System) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas sequências específicas de primers e sondas para a detecção dos vírus: VCHIK NS4 6856F (TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA), VCHIK NS4 6981R (TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC), VCHIK NS4 6919p (FAM-AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG) para o vírus *Chikungunya* e VZIK NS5 9271F (AARTACACATACCARAACAAAGTGGT), VZIK NS5 9373R (TCCRCTCCCYCTYTGG), VZIK NS5 9304p (LNA) FAM-CTYAGACCA+G+C+T+GAAR) para o vírus *Zika*. As condições de ciclagem térmica para a transcrição reversa (RT) foram de 1 ciclo a 50°C durante 15 minutos, para a inativação da RT e ativação da Taq® Polimerase 1 ciclo a 95°C por 2 minutos, a

desnaturação ocorreu em 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos e 40 ciclos a 60°C por 30 segundos para anelamento/ extensão. A amplificação foi realizada utilizando o aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Amostras com um número de limiar – Cycle Threshold (CT) ≤ 38 foram consideradas detectáveis para infecções causadas pelos ZIKV e CHIKV.

5.2.3 Diagnóstico sorológico (ELISA)

Para os diagnósticos sorológicos, utilizamos o anti-Chikungunya Virus ELISA (IgM/ IgG), anti-Zika Virus ELISA (IgM/ IgG) e anti-Dengue Virus ELISA (IgM) Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de soro dos pacientes foram diluídas 1: 101 em tampão de amostra e incubadas a 37 ° C durante 1 hora. Os poços das placas foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem. Após o ciclo de lavagem, o IgG anti-humano secundário conjugado com peroxidase foi adicionado aos poços e incubado novamente por 30 minutos. Realizou-se novo ciclo de lavagem, adicionou-se solução cromógeno / substrato em cada poço da placa e incubou-se por 15 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de solução de parada. A leitura da densidade óptica foi medida a 450 nm com um leitor de placas (Biotek). Os resultados foram avaliados semiquantitativamente calculando uma razão do valor de extinção do controle ou amostra do paciente sobre o valor de extinção do calibrador 2. As amostras foram categorizadas como negativas (razão $< 0,8$), limítrofes (razão $\geq 0,8$ a $< 1,1$) ou positivas (proporção $\geq 1,1$).

5.3 Dosagem das citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (LUMINEX)

Foram coletados de 5 mL de sangue, em tubo seco, de indivíduos com suspeita das infecções, em seguida ocorreu a centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi armazenado a -80°C. As concentrações de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (BDNF; Eotaxina/CCL11; EGF; FGF-2; GM-CSF; GRO α /CXCL1; HGF; NGF β ; LIF; IFN- α ; IFN- γ ; IL-1 β ; IL-1 α ; IL-1RA; IL-2; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8/CXCL8; IL-9; IL-10; IL-12 p70; IL-13; IL-15; IL-17A; IL-18; IL-21; IL-22; IL-23; IL-27; IL-31; IP-10/CXCL10; MCP-1/CCL2; MIP-1 α /CCL3; MIP-1 β /CCL4;

RANTES/CCL5; SDF-1 α /CXCL12; TNF- α ; TNF- β /LTA; PDGF-BB; PLGF; SCF; VEGF-A; VEGF-D) foram quantificadas (pg/mL) utilizando o kit Cytokine/Chemokine/growth/Factor 45-Plex Human ProcartaPlex™ de acordo com as instruções do fabricante, no equipamento LUMINEX e analisadas no software MILLIPLEX Analyst 5.1 (Merck Millipore, Billerica, USA).

5.4 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas como média e erro padrão da média atendendo o pressuposto de normalidade ou mediana, primeiro quartil e terceiro quartil, quando tal pressuposto não foi atendido. Para as variáveis categóricas utilizou-se frequências simples e frequências percentuais e intervalo de confiança para 95% quando pertinente. Utilizou-se o teste de D'Agostino & Pearson para avaliar o pressuposto de normalidade. Para diferenças entre dois grupos com dados não paramétricos foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para as análises de correlação foi utilizada a correlação de Spearman. Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As análises foram realizadas nos softwares Graph Pad Prism versão 6.0 e software STATA 16.

5.4.1 Modelo de regressão linear múltipla

A fim de analisar como as concentrações de citocinas reagem à fase e ao estado de infecção por ZIKV e CHIKV, estimou-se um modelo de regressão linear com base na relação funcional:

$$cito_j = f(chikv_k, zikv_k, coinfec_k, gen, idade, chikv_k \times gen, chikv_k \times idade, zikv_k \times gen, zikv_k \times idade, coinfec_k \times gen, coinfec_k \times idade) + e_j, \quad (1)$$

em que $cito_j$ é a concentração de uma determinada citocina j quantificada no estudo, $chikv_k$, $zikv_k$ e $coinfec_k$ (coinfecção) referem ao estado e à fase da infecção, $k = \{\text{agudo, crônico}\}$, gen é o gênero do indivíduo, $idade$ é a faixa etária e e_j representa as características não observáveis. Assume-se também efeitos de interação entre gênero, idade, e a fase e estado da infecção.

O modelo (1) é estimado via Mínimos Quadrados Ordinários (MQO) com erros-padrão robustos¹ para cada um dos 45 mediadores imunológicos, admitindo-se a seguinte especificação linear:

$$\begin{aligned} cito_{i,j} = & \alpha_j + \delta_1 chikv_{i,agudo} + \delta_2 chikv_{i,crônico} + \delta_3 zikv_{i,agudo} + \delta_4 coinfec_{i,agudo} + \beta_1 gen_i + \\ & + \beta_2 idade_i + \gamma_1(chikv_{i,agudo} \times gen_i) + \gamma_2(chikv_{i,crônico} \times gen_i) + \gamma_3(zikv_{i,agudo} \times \\ & gen_i) + \gamma_4(coinfec_{i,agudo} \times gen_i) + \varphi_1(chikv_{i,agudo} \times idade_i) + \varphi_2(chikv_{i,crônico} \times \\ & idade_i) + \varphi_3(zikv_{i,agudo} \times idade_i) + \varphi_4(coinfec_{i,agudo} \times idade_i) + e_{i,j}, \end{aligned} \quad (2)$$

em que o subscrito i indexa os 79 indivíduos da amostra e j a citocina avaliada. $chikv_{i,agudo}$, $chikv_{i,crônico}$, $zikv_{i,agudo}$ e $coinfec_{i,agudo}$ são variáveis *dummy* iguais a 1 se o indivíduo i apresentou o diagnóstico da infecção no respectivo estado e fase, e zero caso contrário. A variável de gênero também é dicotômica, igual a 1 se homem e zero caso contrário. As hipóteses deste estudo podem ser testadas a partir da estimativa do efeito marginal médio (AME) de cada estado e fase de infecção sobre a concentração das citocinas selecionadas. O grupo de controle é o nível base de infecção (não infecção) no modelo (2), porém é possível se comparar o AME entre qualquer estado e fase de infecção.

5.5 Aspectos éticos

Esse projeto incluiu seres humanos e seguiu as recomendações da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que se refere à pesquisa clínica envolvendo seres humanos. Este faz parte de um projeto mais amplo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe intitulado “*Estudo epidemiológico, clínico e imunológico nas infecções pelos vírus Zika, Chikungunya e Dengue na patogênese de anomalias fetais e em doenças de indivíduos adultos*”, com número do parecer: 1.486.302. Todos os indivíduos maiores de 18 anos ou responsáveis pelos menores de 18 anos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO A), após leitura do termo e informações verbais dos pesquisadores sobre os procedimentos da pesquisa. A autonomia dos participantes foi garantida por meio da administração cuidadosa do termo de consentimento informado e a participação foi voluntária. Ainda, o estudo trouxe benefícios diretos aos participantes já que os sintomas e sinais agudos ou crônicos das viroses estudadas foram tratados.

¹ Foi utilizado o software STATA 16.

6 RESULTADOS

6.1 Dados clínicos e epidemiológicos dos participantes

Foram incluídos neste estudo um total de 79 indivíduos, desses, 13 indivíduos compondo o grupo controle e 66 pacientes compondo os grupos de infecções por arboviroses (ZIKV, CHIKV ou ZIKV/CHIKV). Todos os pacientes tiveram o diagnóstico da infecção confirmado pelo exame molecular RT-PCR em tempo real, as informações clínicas e epidemiológica estão resumidas na Tabela 1. Após o diagnóstico molecular, os pacientes foram separados em 4 grupos: indivíduos infectados pelo ZIKV, indivíduos infectados pelo CHIKV na fase aguda da doença, indivíduos infectados pelo CHIKV na fase crônica da doença e indivíduos coinfectados pelos ZIKV e CHIKV.

Em todos os grupos houve a predominância do sexo feminino (78,79% dos infectados e 69,23% dos participantes do grupo controle). Os indivíduos infectados pelo ZIKV possuíam média de idade $48,43 \pm 3,37$ anos, com Ct médio de $37,74 \pm 0,24$ e os sintomas mais relatados por esses pacientes foram artralgia e mialgia. Para os infectados com o CHIKV na fase aguda ($n=20$), a média de idade foi de $34 \pm 13,37$ anos, apresentaram média de Ct de $22,16 \pm 1,23$, o tempo médio de início dos sintomas até a data de coleta foram de $4,31 \pm 1,59$ dias, sendo febre e artralgia os sintomas mais descritos por esses participantes. Os pacientes infectados com CHIKV na fase crônica com idade média de $49,58 \pm 2,69$ anos, exibiram uma característica peculiar ao apresentarem resultados de RT-PCR positivo, com Ct médio de $26,27 \pm 1,69$ e com um tempo médio de $166 \pm 18,6$ dias do início dos sintomas até a data da coleta amostra, ainda, sete dos 20 indivíduos desse grupo apresentaram IgM e IgG simultaneamente para CHIKV. A artralgia foi o sintoma relatado por todos os indivíduos desse grupo. Para os coinfectados, a idade média foi de $41,17 \pm 5,05$ anos, com Ct médio para o ZIKV de $36,88 \pm 0,88$ e para o CHIKV o Ct médio foi de $28,64 \pm 2,83$, sendo febre e artralgia os sintomas mais relatados.

Embora a RT-PCR em tempo real para diagnóstico dos arbovírus acima mencionados tenha sido realizada qualitativamente, a partir dos valores dos Cts pode-se inferir que a carga viral para os infectados com o ZIKV é menor do que a carga viral apresentada nas amostras dos pacientes infectados com o CHIKV, uma vez que quanto maior o valor do Ct, menor será a carga viral. Quando comparados os Cts dos grupos monoinfectados (fase aguda) com os Cts do grupo coinfectados, apenas houve diferença entre os Cts relacionados ao CHIKV ($p=0,02$) onde os pacientes monoinfectados

apresentaram Ct menor, sugerindo assim, uma carga viral maior para esse vírus. Não houve diferença entre os Cts dos grupos infectados com CHIKV nas fases aguda e crônica da doença. Além disso, não houve diferença significativa entre as idades dos pacientes infectados em relação ao grupo controle, entretanto, as idades dos pacientes na fase crônica da infecção pelo CHIKV foram maiores do que as idades dos pacientes na fase aguda da infecção pelo CHIKV ($p=0,02$).

Tabela 1: Dados clínicos e epidemiológicos dos indivíduos participantes do estudo.

	Controles Saudáveis (n=13)	ZIKV (n=14)	CHIKV Agudo (n=20)	CHIKV Crônico (n=20)	Coinfectados (ZIKV/CHIKV) (n=12)
Sexo n(%)					
Feminino	9 (69,23)	11 (78,57)	15 (75)	17 (85)	9 (75)
Masculino	4 (30,77)	3 (21,43)	5 (25)	3 (15)	3 (25)
Idade (anos)¹	39,55 ± 3,26	48,43 ± 3,37	34 ± 2,99	49,58 ± 2,69	41,17 ± 5,05
Sintomas n(%)					
Febre	-	9 (64,29)	19 (95)	18 (90)	11 (91,67)
Artralgia	-	13 (92,85)	19 (95)	20 (100)	11 (91,67)
Exantema	-	8 (57,14)	9 (45)	16 (80)	9 (75)
Conjuntivite	-	2 (14,29)	8 (40)	4 (20)	2 (16,67)
Mialgia	-	13 (92,85)	16 (80)	19 (95)	8 (66,67)
Dor retro-orbitaria	-	6 (42,85)	13 (65)	5 (25)	4 (33,33)
Linfadenopatia	-	1 (7,14)	3 (15)	3 (15)	5 (41,67)
Tempo de início dos sintomas (dias)¹	-	-	4,31 ± 1,59	166 ± 18,6	-
Cycle Threshold (Ct)	-	37,74 ± 0,24	22,16 ± 1,23	26,27 ± 1,69	36,88 ± 0,38 / 28,64 ± 2,83
RT-PCR¹					

¹ Valores expressos como média ± desvio erro da média. Demais valores expressos como frequência simples (n) e frequência percentual (%).

6.2 Avaliação de mediadores imunológicos em indivíduos infectados pelos ZIKV e CHIKV

6.2.1 Concentrações de citocinas/ quimiocinas/ fatores de crescimento circulantes em indivíduos infectados pelos ZIKV e CHIKV em comparação com controles saudáveis

Foram quantificadas as concentrações dos 45 mediadores imunológicos presentes nos soros dos pacientes infectados pelos ZIKV e CHIKV (Tabela 2). Observamos a elevação das concentrações das quimiocinas IP-10 e RANTES em todos os indivíduos infectados independentemente do tipo de vírus (ZIKV ou CHIKV), da fase da doença (aguda ou crônica) ou do estado da infecção (monoinfecção ou coinfecção).

Surpreendentemente, apenas as quimiocinas IP-10 e RANTES apresentaram diferença significativa entre os pacientes infectados pelo ZIKV quando comparado com o grupo controle. Para os pacientes infectados com CHIKV na fase aguda da doença houve o aumento das concentrações de 16 mediadores imunológicos (IFN- α , IL-6, IL-7, IL-8, TNF- β , IFN- γ , IL-23, IL-1RA, IL-10, IP-10, RANTES, MIP-1 β , EGF, GRO α , SDF-1 α e VEGF-D) quando comparadas às concentrações do grupo controle. Em relação aos pacientes infectados CHIKV na fase crônica da doença, foi demonstrado aumento significativo de 29 mediadores imunológicos (IFN- α , IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-12p70, IL-15, TNF- β , IFN- γ , IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31, IL-4, IL-10, IL-1RA, GM-CSF, MCP-1, RANTES, MIP-1 β , IP-10, GRO α , SDF-1 α , PDGF-BB e VEGF-D) em relação aos controles saudáveis. Já para o grupo de coinfectados (ZIKV/CHIKV), observamos concentrações elevadas para os seguintes mediadores: IFN- α , IFN- γ , IL-8, IL-21, IL-23, TNF- β , IL-1RA, IL-10, IP-10, MCP-1, RANTES, EGF e GRO α em relação aos controles.

Tabela 2: Medianas e intervalos interquartis das concentrações dos mediadores imunológicos analisados por grupo.

	Controle saudável (n=13)		ZIKV (n=14)		CHIKV Agudo (n=20)		CHIKV Crônico (n=20)		Coinfectados (n=12)	
	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3	Mediana	Q1; Q3
IFN- α	0	0; 0	0 ^b	0; 0	31,51 ^{a,b}	0; 94,83	1,3 ^{a,c}	0; 3,90	0,00 ^a	0; 9,45
IL-1 α	0	0; 0	0	0; 0,20	0,00	0; 0,46	1,26 ^{a,c}	0; 2,56	0,00	0; 0,83
IL-1 β	0,83	0,03; 1,88	0,04	0,03; 0,59	0,39	0,04; 1,64	2,7	0,39; 4,41	0,46	0,03; 5,90
IL-6	0,01	0,01; 0,18	0,02	0,01; 42,84	2,985 ^a	0,01; 55,64	17,53 ^a	0,09; 68,55	6,52	0,01; 78,36
IL-12p70	0	0,00; 0,05	0,00	0,00; 0,08	0,00	0,00; 0,13	0,64 ^{a,c}	0,00; 1,47	0,07	0,00; 1,34
IFN- γ	0,53	0,01; 2,45	2,74	0,01; 9,23	7,83 ^a	1,45; 14,10	7,51 ^a	1,70; 14,20	5,89	0,01; 6,09
TNF- α	9,60	4,24; 13,03	4,24	1,63; 9,05	3,83	0,27; 7,47	7,57	4,85; 12,66	5,62 ^a	1,03; 22,15
TNF- β	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,01	0,01 ^a	0,00; 0,01	11,1 ^{a,c}	0,00; 30,37	0,01 ^a	0,00; 0,02
IL-7	0,00	0,00; 0,18	0,00	0,00; 0,03	0,67 ^a	0,00; 8,27	3,42 ^a	0,48; 6,26	0,00	0,00; 9,30
IL-8	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 24,86	5,54 ^a	0,00; 22,89	16,89 ^a	0,00; 28,87	17,38 ^a	0,00; 36,08
IL-9	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,00	0,77 ^{a,c}	0,00; 16,96	0,00	0,00; 0,63
IL-15	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,00	21,33 ^{a,c}	0,00; 45,03	0,00	0,00; 28,08
IL-18	2,94	0,07; 9,03	1,53	0,06; 11,76	6,44	1,39; 25,81	13,93 ^a	6,39; 19,53	8,46	0,78; 37,43
IL-17A	0,09	0,00; 0,20	0,09	0,00; 0,49	0,01	0,00; 0,75	0,88 ^{a,c}	0,08; 2,90	0,33	0,00; 7,41
IL-21	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 4,03	0,00	0,00; 0,00	12,53 ^{a,c}	0,00; 37,33	0,52 ^a	0,00; 10,56
IL-22	0,03	0,01; 0,06	0,06	0,03; 23,40	0,05	0,03; 30,83	34,72 ^a	0,03; 68,87	1,35	0,02; 42,17
IL-23	0,04	0,04; 0,07	0,08	0,05; 11,52	0,08 ^a	0,05; 4,80	11,12 ^{a,c}	0,05; 31,58	3,58 ^a	0,06; 47,27
IL-27	0,01	0,01; 0,01	0,01	0,01; 0,02	0,01	0,01; 0,02	4,59 ^{a,c}	0,01; 18,75	4,59	0,01; 18,75
IL-31	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,00	0,00	0,00; 0,01	9,22 ^{a,c}	0,00; 27,40	0,00	0,00; 2,60
IL-1RA	0,72	0,46; 1,39	1,16 ^b	0,69; 32,28	9108 ^{a,b}	44,83; 16202	169,5 ^{a,c}	9,71; 750,8	352,3 ^a	0,92; 2513
IL-2	1,54	0,21; 7,22	1,38	0,28; 2,70	2,41	0,36; 3,71	3,99	2,27; 6,72	4,15	1,24; 15,20
IL-4	0,05	0,03; 0,11	0,06	0,05; 0,09	0,07	0,04; 0,12	15,06 ^{a,c}	0,05; 39,83	0,09	0,05; 6,83
IL-5	58,00	0,16; 2,66	0,28	0,00; 1,48	0,58	0,00; 1,98	2,48	0,83; 3,93	0,64	0,08; 13,17
IL-10	0,00	0,00; 0,00	0,00 ^b	0,00; 0,00	0,00 ^a	0,00; 0,55	0,98 ^{a,c}	0,00; 3,45	0,40 ^a	0,00; 1,84
IL-13	0,02	0,01; 0,01	0,01	0,01; 0,35	0,02	0,01; 0,03	2,49	0,01; 3,66	0,02	0,01; 4,25
IP-10	20,11	9,50; 27,47	85,38 ^{a,b}	23,01; 154,3	488,2 ^a	355,8; 1047	102,6 ^{a,c}	57,22; 244,1	342,00 ^a	148,7; 615,5
EOTAXINA	55,92	47,83; 94,58	66,63	50,16; 132,4	112,40	49,36; 165,4	134,00	70,96; 252,5	77,06	38,77; 112,4
RANTES	38,54	16,41; 52,31	70,25 ^a	51,24; 101	103,2 ^a	72,27; 127,8	94,34 ^a	76,19; 146,10	87,02 ^a	51,27; 121,1
MCP-1	59,77	42,97; 102,2	74,73	36,88; 134,2	633,30 ^b	94,72; 911,1	123,2 ^{a,c}	59,97; 203,8	127,4 ^a	41,95; 313,4
MIP-1 β	39,05	30,91; 47,28	46,82	36,80; 93,71	67,1 ^a	38,12; 138,2	67,77 ^a	48,03; 106,1	46,03	29,75; 62,17
MIP-1 α	1,35	0,00; 15,69	3,50	0,37; 12,42	18,98	0,84; 29,35	8,80	3,96; 22,44	4,91	0,14; 13,47
GM-CSF	0,20	0,08; 2,76	0,18	0,13; 0,24	0,15	0,12; 0,28	9,08 ^{a,c}	0,16; 14,55	0,15	0,09; 23,32
VEGF-A	268,90	72,28; 485,1	180,60	53,81; 373,8	402,50	119,4; 624,9	214,80	118,9; 600,6	235,10	48,97; 330,7
VEGF-D	0,03	0,02; 0,04	0,03	0,02; 0,06	0,05 ^a	0,03; 0,06	8,91 ^{a,c}	0,03; 22,05	0,04	0,03; 9,89
PDGF-BB	373,30	192,4; 539,3	352,70	174; 713	452,20	269,1; 592,1	656,6 ^{a,c}	445,8; 985,9	594,20	340,8; 705,2
PIGF-1	68,73	55,03; 103,0	88,81	52,58; 134,7	70,75	50,53; 112,5	72,90	45,53; 110,4	74,64	52,07; 114,3
HGF	58,37	31,65; 110,2	67,23	36,84; 146,8	87,68	54,37; 463,8	104,80	71,99; 131,9	50,96	28,68; 121,4
EGF	22,46	4,02; 29,73	18,04	0,00; 85,75	36,47 ^a	24,21; 79,98	27,38	10,93; 58,68	75,73 ^a	26,07; 139,0
BDNF	227,50	110,6; 511,2	268,80	146,8; 1032	525,50	247,8; 873,9	453,80	257,1; 833,3	248,50	49,45; 466,4
β NGF	0,19	0,00; 1,96	0,01	0,00; 8,73	0,37	0,01; 8,83	7,34	0,10; 26,91	0,19	0,00; 13,26
GRO α	1,99	1,5; 2,30	4,10	1,90; 15,53	8,34 ^a	2,45; 45,38	26,62 ^a	2,95; 47,06	9,73 ^a	2,02; 64,68
FGF-2	0,02	0,01; 0,05	0,04	0,02; 0,05	0,03	0,01; 0,05	6,46	0,02; 19,57	0,04	0,01; 6,02
SCF	1,41	0,80; 2,90	2,78	1,52; 6,51	1,31	0,56; 2,43	3,59	1,56; 5,05	1,50	1,04; 2,42
LIF	1,90	0,49; 3,67	1,36	0,01; 3,02	2,33	0,45; 5,09	5,29	1,11; 8,32	1,00	0,31; 6,60
SDF-1 α	273,30	229,10; 401,5	378,60	304; 513,1	463,3 ^a	370,6; 550,7	434,1 ^a	356; 643	366,20	298,5; 542,3

a: p < 0,05 em relação ao grupo controle saudável.

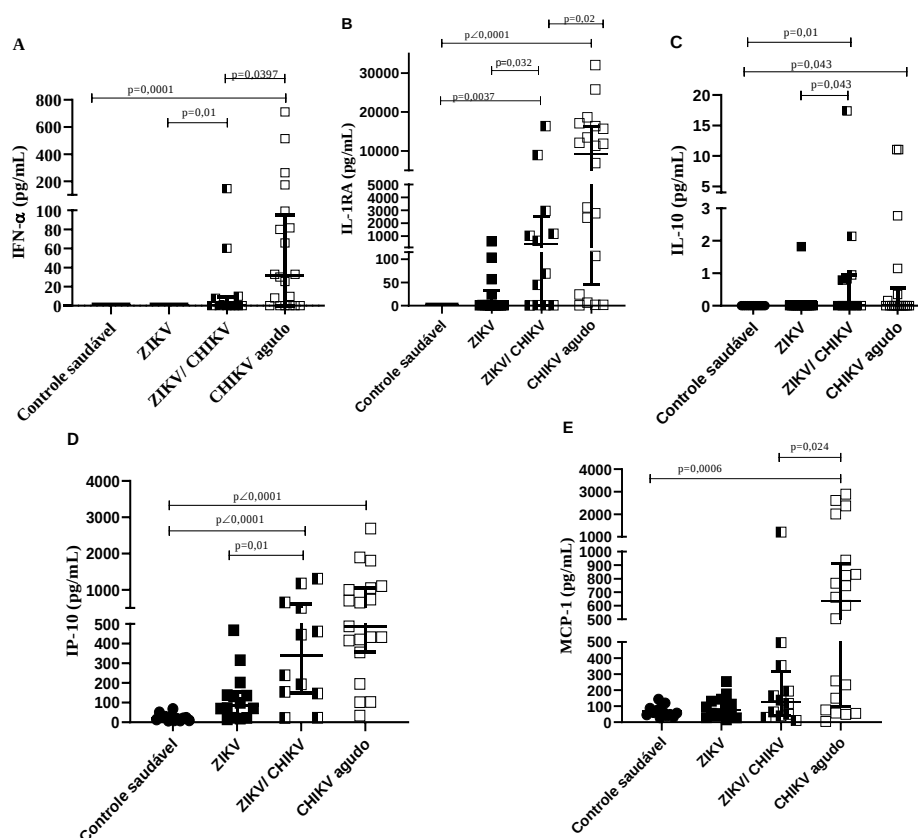
b: p < 0,05 em relação ao grupo coinfectados (ZIKV/CHIKV).

c: p < 0,05 em relação ao grupo CHIKV agudo.

6.2.2 Concentrações de citocinas/ quimiocinas/ fatores de crescimento circulantes em indivíduos monoinfectados (ZIKV ou CHIKV) em comparação com indivíduos coinfectados (ZIKV/CHIKV)

Para avaliar se existiu diferença entre o perfil imunológico apresentado entre pacientes monoinfectados ou coinfectados, os 45 mediadores foram avaliados para os três grupos: pacientes infectados apenas com o ZIKV (n=13), pacientes infectados com ZIKV e CHIKV (n=12) simultaneamente e pacientes infectados apenas com CHIKV. Após a análise estatística, observamos que os pacientes infectados somente com o ZIKV apresentaram menores concentrações de IFN- α , IL-1RA, IL-10 e IP-10 e que os pacientes infectados somente com o CHIKV apresentaram maiores concentrações de IFN- α , IL-1RA e MCP-1 quando comparados àqueles com coinfecção (ZIKV/CHIKV) (Tabela 2 e Figura 4).

Figura 4: Concentrações de citocinas em pacientes coinfectados (ZIKV/CHIKV). Quantificação das concentrações (pg/mL) das citocinas Interferon α (IFN- α), antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA), interleucina 10 (IL-10), proteína 10 induzida por interferon γ (IP-10) e proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) a partir dos soros de pacientes infectados com ZIKV, CHIKV na fase aguda e Coinfectados (ZIKV/CHIKV). Cada ponto no gráfico representa um doador. Diferenças entre dois grupos foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis (Q1; Q3). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

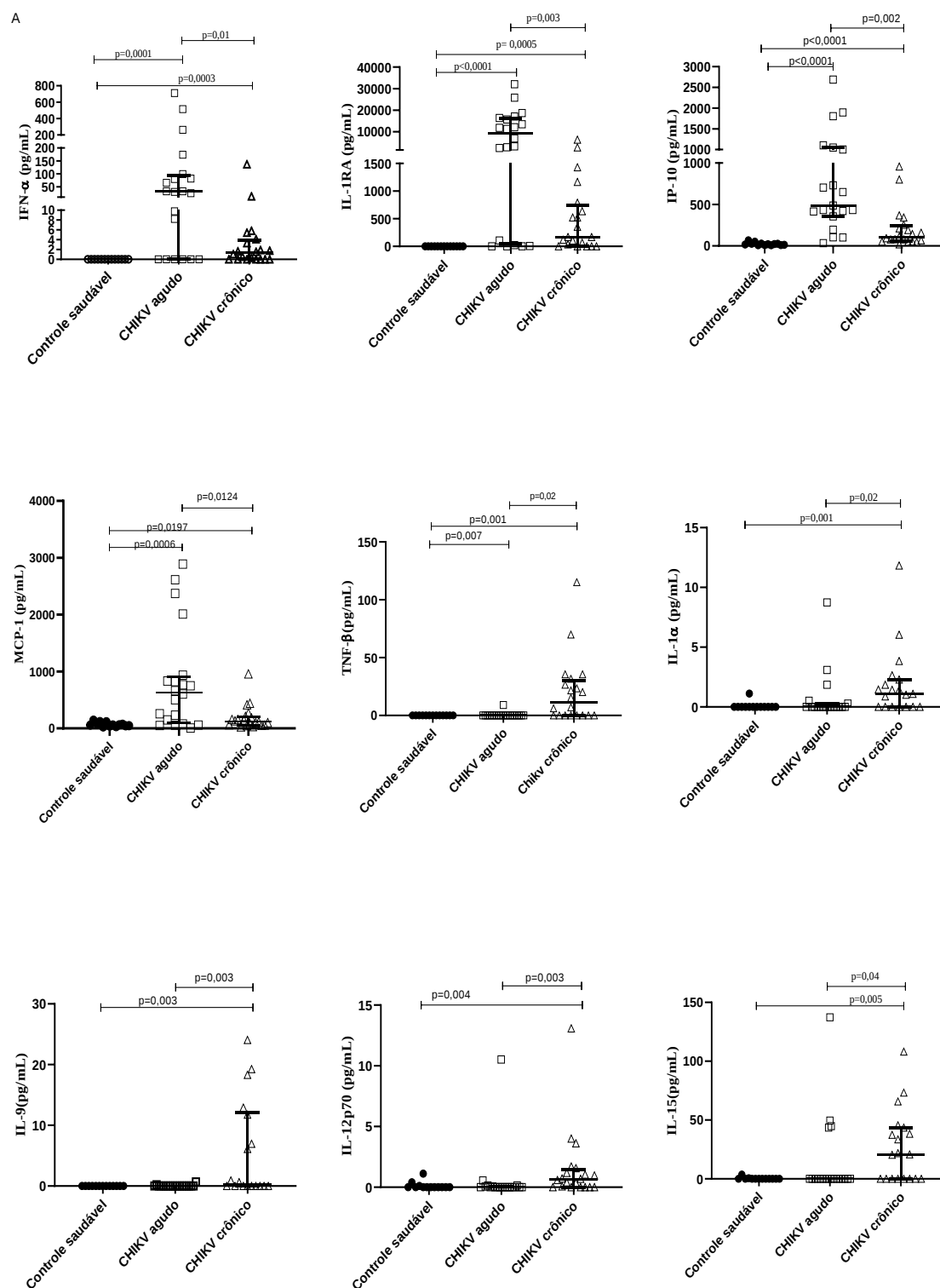


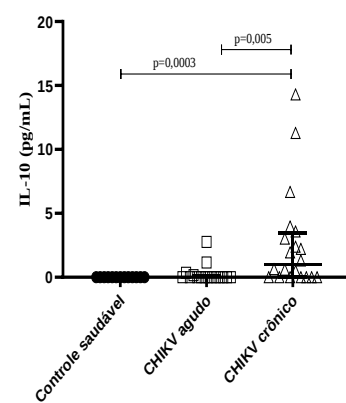
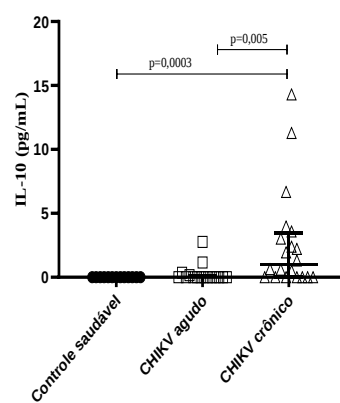
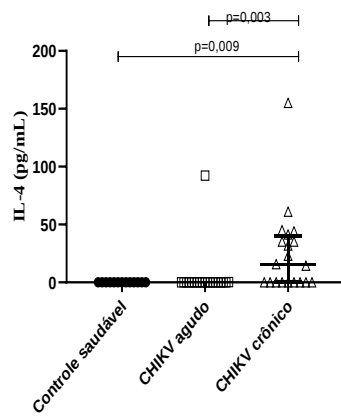
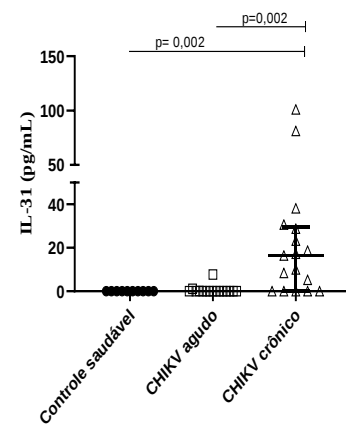
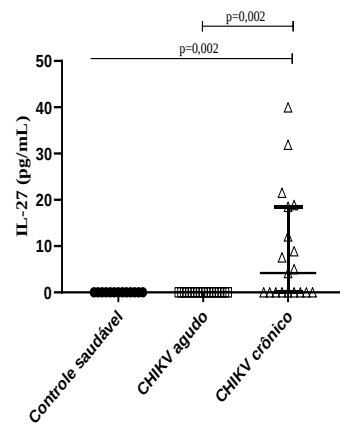
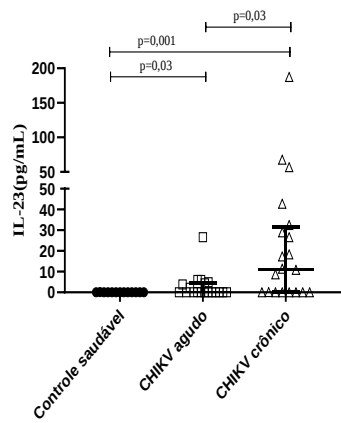
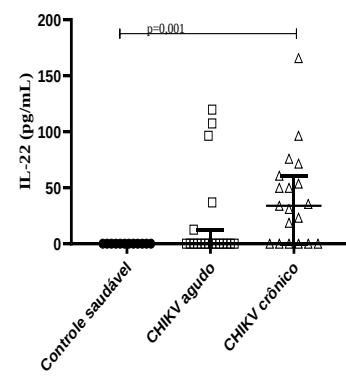
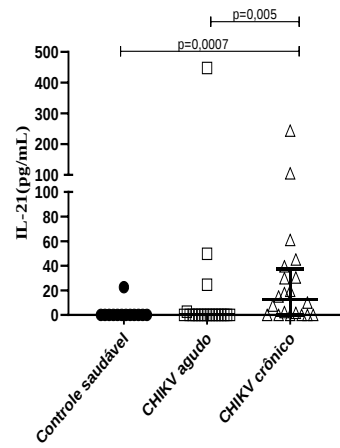
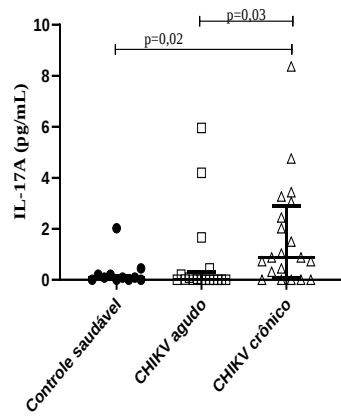
6.2.3 Concentrações de citocinas/ quimiocinas/ fatores de crescimento circulantes em indivíduos infectados pelo CHIKV: comparação entre a fase aguda e a fase crônica da doença

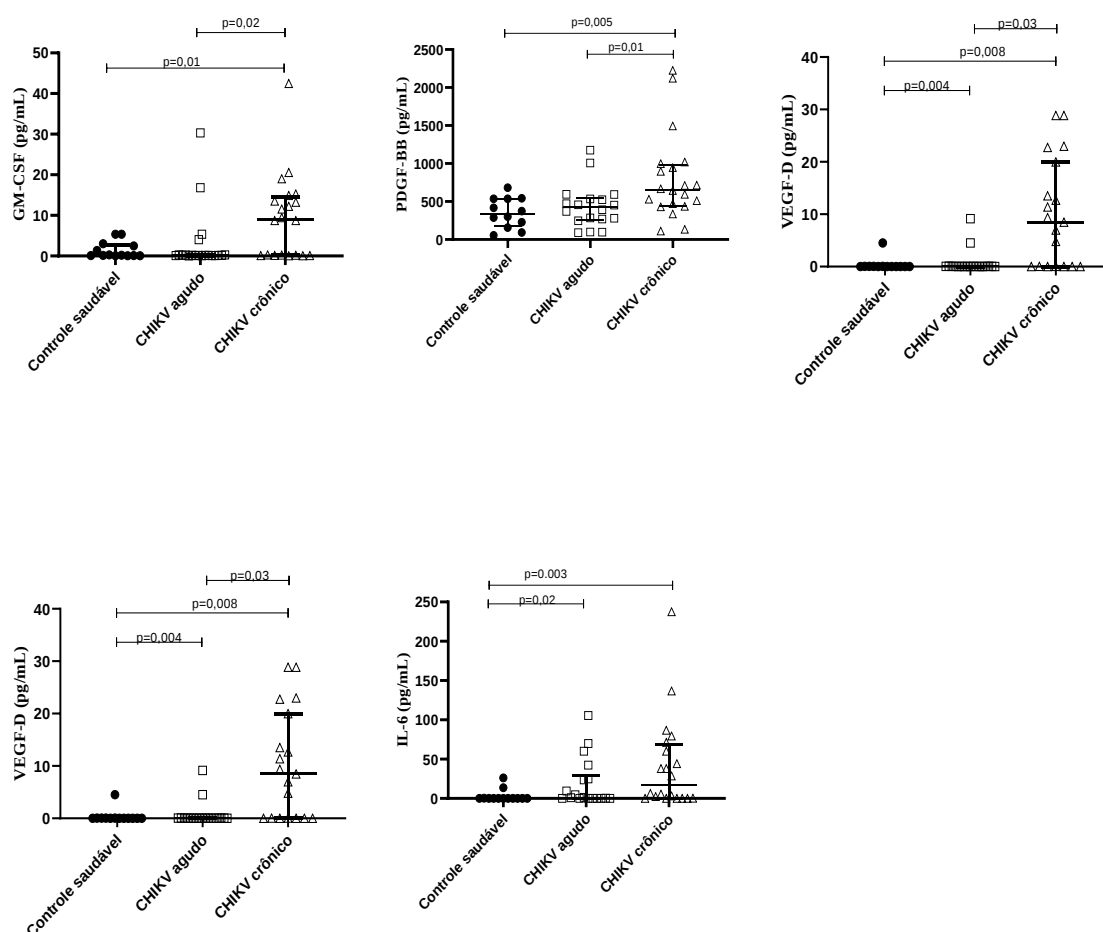
Os pacientes na fase crônica da doença ocasionada pelo CHIKV deste estudo demonstraram uma característica inusitada, mesmo com uma média de 166 dias de início dos sintomas apresentaram RT-PCR detectável para o CHIKV. A partir deste achado, comparamos as amostras de soro desses indivíduos (n=20) com amostras de soros de indivíduos também infectados pelo CHIKV na fase aguda da doença (n=20).

Verificamos que houve uma diminuição significativa nas concentrações das citocinas IFN- α , IL-1RA, IP-10, MCP-1, à medida que houve um aumento significativo nas concentrações de TNF- β , IL-1 α , IL-9, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-21, IL-23, IL-27, IL-31, IL-4, IL-10, GM-CSF, PDGF-BB e VEGF-D nas amostras dos indivíduos com sintomatologia crônica em comparação aos indivíduos na fase aguda da doença. Cabe ressaltar que as concentrações de IL-1 α , IL-9, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-31, IL-4, GM-CSF e PDGF-BB só apresentaram diferenças para o grupo de indivíduos infectados pelo CHIKV crônicos quando comparado aos infectados por CHIKV na fase aguda da doença. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos das fases aguda e crônica da doença, a concentrações de IL-6 foi elevada para os grupos com infecção pelo CHIKV (Figura 5).

Figura 5: Concentrações de citocinas em pacientes infectados com CHIKV nas fases aguda e crônica da doença.







Quantificação de citocinas (pg/mL) em pacientes infectados por CHIKV nas fases aguda e crônica da doença. Cada ponto no gráfico representa um doador. Diferenças entre dois grupos foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. As barras representam a mediana e os intervalos interquartis (Q1; Q3). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6.3 Correlação de citocinas/ quimiocinas/ fatores de crescimento com os Cycle Threshold (Cts)

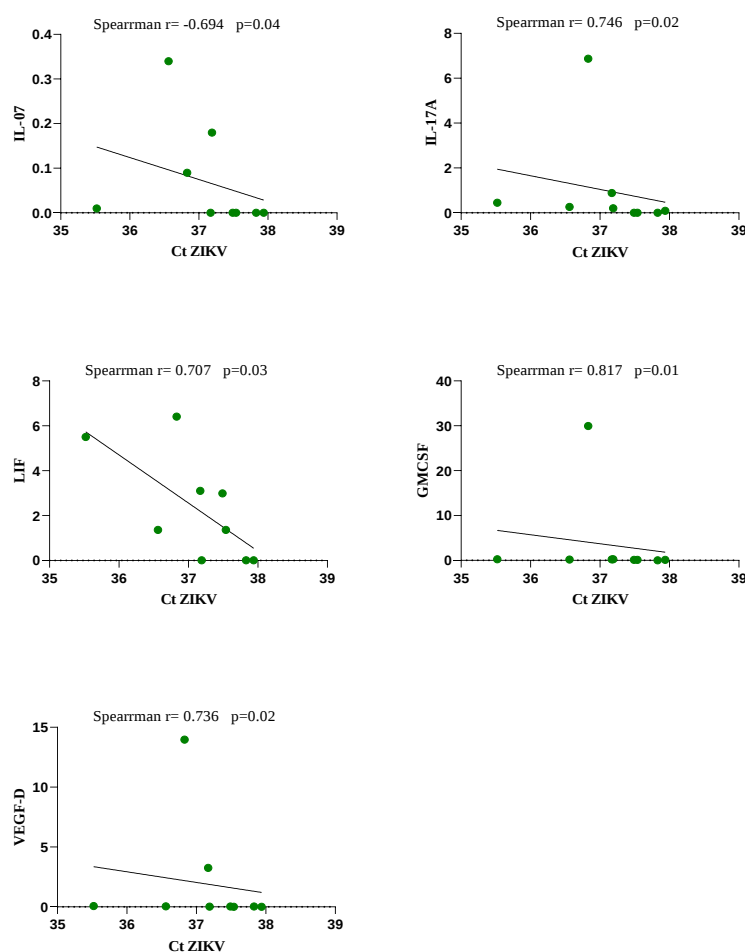
Baseados nos valores dos Cts obtidos por RT-PCR em tempo real de cada grupo (ZIKV, ZIKV/CHIKV, CHIKV agudo, CHIKV crônico) e na análise da correlação R de Spearman, verificamos uma forte correlação negativa dos Cts do grupo de pacientes infectados somente com o ZIKV com as citocinas IL-7 ($R = -0,694$; $p = 0,04$), IL-17A ($R = -0,746$; $p = 0,02$) e os fatores de crescimento LIF ($R = -0,707$; $p = 0,03$), GM-CSF ($R = -0,817$; $p = 0,01$) e VEGF-D ($R = -0,736$; $p = 0,02$). Para o grupo dos pacientes coinfectados, só houve correlação entre os Cts para o CHIKV com as citocinas IFN- γ ($R = -0,867$; $p = 0,01$),

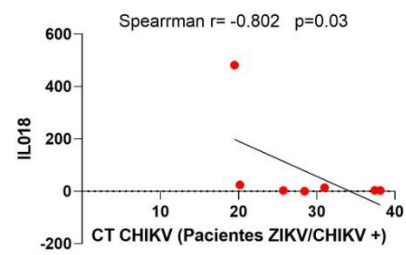
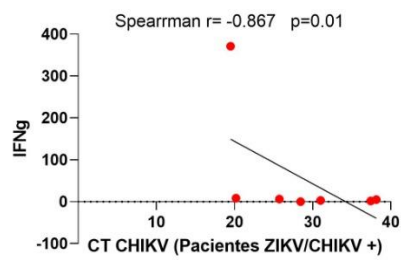
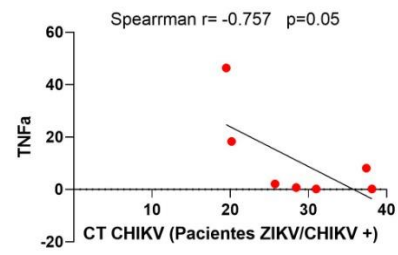
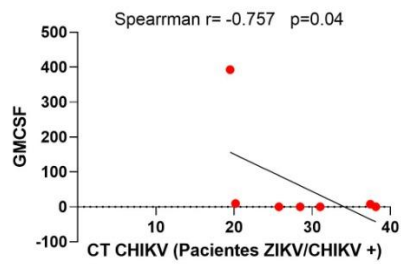
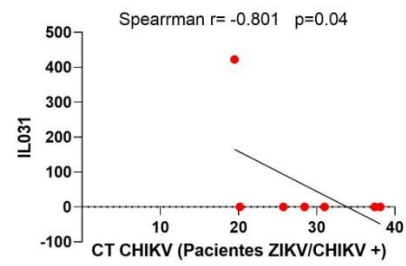
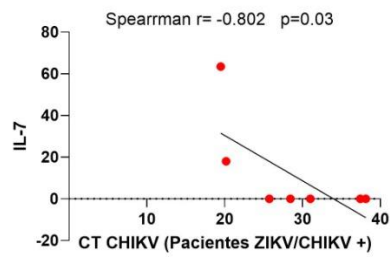
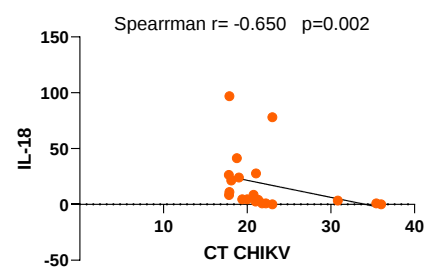
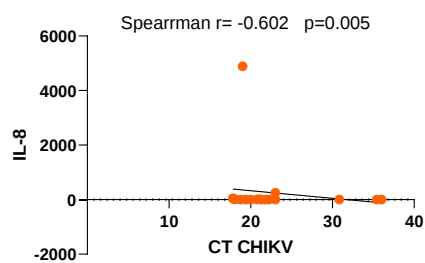
IL-7 ($R=-0,802$; $p=0,03$), IL-31 ($R=-0,802$; $p=0,03$), TNF- α ($R=-0,757$; $p=0,04$), IL-15 ($R=-0,802$; $p=0,03$). Para os Cts do grupo de pacientes infectados com CHIKV na fase aguda da doença houve correlação significativa com as citocinas IL-8 ($R=-0,602$; $p=0,005$) e IL-18 ($R=-0,65$; $p=0,002$). Não houve correlação entre os Cts e as citocinas do grupo CHIKV crônico (FIGURA 6).

Figura 6: Correlações entre mediadores imunológicos e os Cts (Cycle threshold).

Correlações entre as concentrações (pg/mL) de quimiocina/ citocinas/ fatores de crescimento e Cycles Thresholds (Cts) obtidos por RT-PCR em tempo real. Os coeficientes de Spearman (R) e os valores de p são mostrados. **A** Correlação entre os Cts de ZIKV e as concentrações de IL-7, IL-17A, LIF, GM-CSF e VEGF-D em pacientes com ZIKV. **B** Correlação entre os Cts de CHIKV e as concentrações de IL-7, IL-31, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ e IL-18 em pacientes coinfectados com ZIKV e CHIKV. **C** Correlação entre os Cts de CHIKV e as concentrações de IL-8 e IL-18 em pacientes com CHIKV na fase aguda da doença.

A



B**C**

6.4 Análise preditiva das concentrações dos mediadores imunológicos de acordo com os status das infecções

Baseados nos dados obtidos a partir da dosagem dos mediadores imunológicos (citocinas/ quimiocinas/ fatores de crescimento) e das características apresentada pelos indivíduos participantes deste estudo, foram estimados os diferenciais das concentrações em termos percentuais para uma população geral, de acordo com o padrão da infecção (monoinfecção ou coinfecção), do estado clínico durante a infecção (fase aguda ou crônica) e da idade pelo modelo descrito no item 5.4 deste documento.

Os resultados significantes dessa análise preditiva estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Análise preditiva para a população em geral infectada pelos vírus ZIKV e CHIKV.

Base de referência: Indivíduos saudáveis				
	Mediador imunológico	Taxa de incremento (%)	Intervalo de confiança 95%	p-valor
ZIKV	IFN- γ	131,78	0,075 a 2,560	0,038
	IL-8	188,53	0,338 a 3,432	0,018
	IL-22	158,1	0,058 a 3,103	0,042
	IL-23	150,14	0,150 a 2,852	0,03
	IP-10	127,5	0,461 a 2,088	0,03
	RANTES	53,33	0,134 a 0,932	0,01
	GRO- α	90,19	0,003 a 1,800	0,049
Coinfectados (ZIKV/CHIKV)	IFN- α	136,95	0,147 a 2,591	0,029
	IL-6	197,66	0,157 a 3,795	0,034
	IFN- γ	176,02	0,556 a 2,963	0,005
	IL-8	241,8	1,092 a 3,743	0,001
	IL-18	136,13	0,007 a 2,715	0,049
	IL-22	187,22	0,089 a 3,654	0,04
	IL-23	239,71	0,777 a 4,017	0,004
	IL-1RA	442,30	2,121 a 6,724	0,000
	IL-10	114,46	0,122 a 2,167	0,029
	IP-10	252,63	1,638 a 3,414	0,000
	RANTES	75,08	0,390 a 1,111	0
	EGF	151,10	0,421 a 2,600	0,007
	GRO- α	156,31	0,365 a 2,760	0,011
CHIKV agudo	IFN- α	398,38	2,517 a 5,450	0,000
	IL-6	151,34	0,116 a 2,910	0,034
	IFN- γ	139,17	0,529 a 2,254	0,002
	IL-7	129,19	0,262 a 2,321	0,015
	IL-8	191,34	0,772 a 3,054	0,001
	IL-23	89,57	0,172 a 1,618	0,016
	IL-1RA	745,23	5,545 a 9,359	0,000
	IP-10	342,56	2,812 a 4,039	0,000
	MCP-1	187,94	0,788 a 2,970	0,001
	EGF	124,27	0,344 a 2,140	0,008
	GRO- α	152,73	0,547 a 2,507	0,003
	SDF- α	42,53	0,121 a 0,729	0,007
Base de referência: Indivíduos coinfectados (ZIKV/CHIKV)				
	Mediador imunológico	Taxa de incremento (%)	Intervalo de confiança 95%	p-valor
ZIKV	IFN- α	-136,95	[-2,591 a -0,147]	0,029
	IL-7	-107,56	[-2,110 a -0,040]	0,042
	IL-1RA	-318,26	[-5,819 a -0,546]	0,019
	IP-10	-125,13	[-2,255 a -0,247]	0,015
CHIKV agudo	IFN- α	261,42	0,705 a 4,522	0,008
	IL-1RA	302,92	0,064 a 5,994	0,045
	IP-10	89,92	0,048 a 1,749	0,039
	MCP-1	136,85	0,133 a 2,603	0,03
	GM-CSF	-140,26	[-2,792 a -0,123]	0,048
	BDNF	111,31	0,216 a 2,010	0,016

Base de referência: Indivíduos infectados com CHIKV na fase aguda da doença				
	Mediador imunológico	Taxa de incremento (%)	Intervalo de confiança 95%	p-valor
CHIKV crônico	IFN- α	-254,27	[-4,300 a -0,785]	0,005
	IL-1 β	80,97	0,723 a 1,547	0,032
	TNF- α	102,18	0,236 a 1,807	0,012
	TNF- β	228,35	1,015 a 3,552	0,001
	IL-9	146,61	0,267 a 2,664	0,017
	IL-17	85,61	0,316 a 1,395	0,002
	IL-21	243,96	1,067 a 3,812	0,001
	IL-22	242,87	0,510 a 4,346	0,014
	IL-23	169,43	0,294 a 3,094	0,018
	IL-27	180,81	0,566 a 3,050	0,005
	IL-31	220,04	1,002 a 3,398	0,001
	IL-2	92,9	0,1905 a 1,667	0,015
	IL-4	221,09	0,846 a 3,574	0,002
	IL-5	101,77	0,408 a 1,626	0,001
	IL-13	112,39	0,350 a 1,897	0,005
	IL-1RA	-261,75	[-5,083 a - 0,151]	0,038
	IL-10	82,81	0,145 a 1,510	0,018
	IP-10	-164,45	[-2,431 a -0,857]	0,000
	MCP-1	-123,39	[-2,393 a -0,745]	0,037
	GM-CSF	177,44	0,723 a 2,824	0,001
	VEGF-D	191,3	0,627 a 3,198	0,004
	FGF-2	196,87	1,025 a 2,912	0,000
	LIF	94,47	0,124 a 1,764	0,025

Além disso, como já é conhecido que a idade pode ser um fator de risco para a indução artralgia crônica em pacientes infectados com o CHIKV, também foram considerados os diferenciais de concentrações dos mediadores imunológicos entre pacientes na fase aguda ou crônica da doença pela faixa etária dos indivíduos. Dados significantes ($p < 0,05$) e com intervalos de confiança de 95% obtidos na análise preditiva estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4: Análise preditiva dos diferenciais de concentrações dos mediadores imunológicos de indivíduos infectados pelo CHIKV nas fases aguda e crônica por faixa etária.

Base de referência: Indivíduos infectados com CHIKV na fase aguda				
Mediador Imunológico		Taxa de incremento (%) por faixa etária (anos)		
CHIKV Crônico		18 a 29	30 a 39	Acima de 40
	IL-1 α	291,33	ns	98,14
	IL-12p70	ns	ns	83,89
	IFN- γ	-155,74	ns	ns
	IFN- α	ns	172,21	ns
	IL-9	ns	ns	163,79
	IL-17A	ns	ns	744,79
	IL-21	411,32	ns	268,43
	IL-22	392,1	ns	237,55
	IL-23	ns	ns	161,14
	IL-27	ns	ns	195,37
	IL-31	ns	ns	230,83
	TNF- β	ns	ns	219,04
	IL-4	ns	ns	238,68
	IL-1RA	ns	-618,02	ns
	IL-10	ns	ns	87,99
	IP-10	-142,59	-247,99	-161,26
	MCP-1	ns	-169,46	ns
	GM-CSF	ns	ns	175,02
	VEGF-A	178,27	ns	ns
	VEGF-D	355,51	ns	ns
	PDGF-BB	168,47	ns	ns
	PIGF-1	140,6	ns	ns
	FGF-2	ns	ns	189,98
	LIF	120,55	ns	103,44
	SDF- α	70,6	ns	ns

ns: não significativo.

Como demonstrado na tabela 4, para os indivíduos mais jovens infectados pelo CHIKV na fase crônica da doença há a probabilidade de uma maior produção de fatores de crescimento associados ao remodelamento tecidual (VEGF-A, VEGF-D, PDGF-BB, PIGF-1, LIF, SDF- α) do que em indivíduos infectados com CHIKV na fase aguda da doença, assim como, para os indivíduos com mais de 40 anos, que estão infectados na fase crônica há a probabilidade de exibirem uma resposta imunológica inflamatória exacerbada com respostas via perfil celulares Th1, Th2, Th9, Th17, Th22.

7 DISCUSSÃO

As doenças infecciosas apresentam certas peculiaridades que as diferenciam de outras doenças, como o seu caráter imprevisível e explosivo de disseminação global. As arboviroses causadas pelos ZIKV e CHIKV, que são objeto de interesse deste estudo, além disso, também geram fortes impactos nos âmbitos sociais, econômicos e na qualidade de vida dos indivíduos afetados por essas doenças. Assim, esse estudo é relevante, pois descreve componentes importantes da resposta imunológica de indivíduos com características particulares, de uma área endêmica, com achados ainda não descritos até o momento.

Quando este estudo foi iniciado, no ano de 2016, o Brasil estava passando por uma epidemia de infecções pelos ZIKV e CHIKV, especialmente na região nordeste do país. Nesse período, de acordo com os boletins epidemiológicos emitidos pela secretaria de estado da saúde, o estado de Sergipe registrou mais casos suspeitos de infecções pelo CHIKV do que pelo ZIKV, fato que refletiu diretamente no número de indivíduos participantes por grupo em nosso estudo.

Os pacientes na fase crônica da infecção por CHIKV deste estudo apresentaram uma característica, que até o presente momento foi pouco descrita na literatura, a detecção do material genético viral em sangue periférico tanto tempo depois do início dos sintomas, além de alguns pacientes apresentarem IgM e IgG simultaneamente. É esperado e relatado na maioria dos estudos que a carga viral seja detectada por RT-PCR em tempo real até no máximo sete dias após o início dos sintomas (fase aguda) e detecção do IgM até o décimo quarto dia após o início dos sintomas. Em estudo realizado por Hoarau e colaboradores foi demonstrado que em quatro pacientes infectados pelo CHIKV persistiram com IgM positivo e detecção da expressão de RNA mensageiro (mRNA) de IFN- α em células mononucleares de sangue periférico (PBMC), 12 meses após a infecção. Também descreveram o CHIKV em macrófagos sinoviais perivascularares de um paciente crônico 18 meses após a infecção, sugerindo assim uma persistência viral (HOARAU et al., 2010). Recentemente, foi relatado o acompanhamento de 69 pacientes indianos, dos quais 21 apresentaram persistência de IgM anti-chikungunya por no mínimo 10 meses e a persistência da artralgia em um período que variou de 4 a 12 meses (CHELLUBOINA et al., 2019). Por questões logísticas, não foi possível a realização seriada da RT-PCR em tempo real para acompanhar a eliminação viral circulantes em nossos pacientes infectados por CHIKV crônicos.

Embora atualmente não seja possível falar em suscetibilidade às infecções pelos ZIKV e CHIKV por gênero, nossos resultados estão de acordo com vários estudos em que demonstram uma maior proporção de casos entre mulheres do que entre homens. Essa diferença na apresentação da infecção em mulheres pode ocorrer como resultado das práticas socioculturais que levam as mulheres a procurarem mais pelos serviços de atendimentos clínico-ambulatoriais ou ainda que esteja relacionada aos comportamentos mais domésticos das mulheres e do vetor *Aedes aegypti* que favorecem a um maior risco de exposição.

Já é conhecido que a carga viral detectada em soro ou plasma de pacientes sintomáticos infectados com ZIKV é baixa o que corrobora com o nosso achado. Isso pode ser explicado devido à suavidade dos sintomas apresentados durante a infecção, já que na maioria dos casos, a febre é branda e não é a principal causa da procura por atendimento clínico, gerando um atraso nesse atendimento. No surto ocorrido na Polinésia Francesa, os pacientes geralmente procuravam atendimento médico mediante a apresentação de erupção cutânea. Em nosso estudo, foi observado que os sintomas mais frequentes pelos pacientes infectados pelo ZIKV foram artralgia e mialgia. Também já foi descrito que as cargas virais de ZIKV foram significativamente aumentadas em pacientes pré-sintomáticos em comparação com pacientes sintomáticos, sugerindo assim, que as amostras dos indivíduos sintomáticos foram provavelmente coletadas durante a fase de resolução da viremia (MUSSO et al., 2017).

Kam e colaboradores (2017) analisaram os perfis imunológicos de 95 pacientes infectados com o ZIKV comparando-os com 13 indivíduos. Foi destacado o aumento de 19 mediadores imunológicos em pacientes infectados, entre eles: citocinas pró-inflamatórias (IL-18, IL-8, IL-6 e IL-7, TNF- α , IFN- γ e GRO- α), citocinas anti-inflamatórias (IL-10, IL-1RA e IL-4), quimiocinas (IP-10, MCP-1, MIP-1 β , eotaxina e SDF-1 α), fatores de crescimento (HGF, BDNF, LIF e SCF), em comparação com indivíduos saudáveis (KAM et al., 2017). Em contraste, nós só verificamos aumento das concentrações das quimiocinas IP-10 e RANTES em pacientes infectados com ZIKV quando comparados aos controles saudáveis. Em estudo desenvolvido com pacientes infectados pelo ZIKV durante a fase aguda da doença e na fase de recuperação, observou-se que RANTES estava aumentada na fase aguda da doença, enquanto a IP-10 estava particularmente aumentada na fase de recuperação dos indivíduos (TAPPE et al., 2016).

Como não era esperado o acontecimento da epidemia de ZIKV no estado de Sergipe, muitos dados clínicos foram coletados de maneira incompleta, inclusive o tempo

de início de sintomas até a data da coleta, o que se tornou um fator limitante para esta análise, contudo, os Cts elevados e consequentemente a baixa carga viral apresentada pelos indivíduos infectados pelo ZIKV associados aos dados expostos anteriormente, nos fazem supor que os indivíduos participantes desse grupo estavam em uma fase resolutive da infecção.

Em contrapartida, os pacientes infectados com o CHIKV exibiram uma robusta resposta imunológica. Os pacientes na fase aguda da doença demonstraram 16 mediadores elevados em relação aos controles saudáveis, resultado este que foi semelhante ao encontrado em uma meta-análise realizada comparando dados de 14 estudos com pacientes na fase aguda da infecção pelo CHIKV que apontou maiores concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IFN- α , IFN- γ , interleucina 2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-18), citocinas antiinflamatórias (IL-1Ra, IL-4 e IL-10), as quimiocinas IP-10, MCP-1, MIG, proteína inflamatória de macrófagos (MIP) 1 α e MIP-1 β , e fator de crescimento de fibroblasto básico FGF-2 nesses pacientes. Aqui, verificamos também concentrações elevadas de TNF- β (linfotóxina α), molécula de relato incomum nos estudos existentes relacionados ao CHIKV. Concentrações elevadas de TNF- β foram encontradas no soro e no tecido sinovial de pacientes com artrite reumatoide quando comparados com indivíduos saudáveis ou com pacientes com osteoartrite. Além disso, em modelo *in vitro*, essa molécula induziu a proliferação de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos e ativou o fator de transcrição NF- κ B contribuindo para a expressão de IL-6, IL-8 e metaloproteinase de matriz 3 em células de indivíduos com artrite reumatoide (HIROSE et al., 2018). Como indivíduos infectados pelo CHIKV compartilham algumas condições clínicas semelhantes a artrite reumatoide, portanto, destaca-se o potencial alvo terapêutico para essa molécula que poderá contribuir com a melhoria do tratamento dos pacientes infectados com CHIKV.

Nossos resultados sugerem ainda que os pacientes na fase crônica da doença causada pelo CHIKV apresentaram uma deficiência na resposta antiviral quando comparados com os pacientes na fase aguda da doença devido as menores concentrações de IFN- α apresentadas. A indução rápida da expressão de interferons do tipo I (IFN- α) e interferons do tipo II (IFN- γ) são cruciais para estimular uma resposta inata robusta e promover ainda mais a transição entre a resposta imune inata e adaptativa, respectivamente, visando a eliminação viral (COOK et al., 2019). Associado a isso, observamos também que esses pacientes apresentaram maiores concentrações de IL-10, uma citocina antiinflamatória. Em modelo animal, foi demonstrado que a infecção por

outro arbovírus (West Nile) é diminuída em camundongos deficientes de IL-10 (IL-10^{-/-}) e que o bloqueio dessa citocina aumenta a sobrevivência desses animais infectados. Ademais, foi descrito que a resposta antiviral (IFN- α e IFN- β) é mais eficiente em camundongos IL-10^{-/-}, destacando assim que a sinalização via IL-10 desempenha um papel negativo na resposta antiviral desenvolvida pelo vírus West Nile (BAI et al., 2009).

Neste estudo, não observamos diferença significativa da citocina IL-1 β entre os grupos infectados pelo CHIKV. Entretanto, verificamos aumento da concentração de IL-1 α em pacientes na fase crônica. A citocina IL-1 β é elevada em indivíduos na fase crônica da infecção por CHIKV e é associada à gravidade da doença (NG et al., 2009). Esta citocina ao ligar-se ao seu receptor pode desencadear um processo inflamatório sustentado levando a um dano tecidual extenso (PAOLO; SHAYAKHMETOV, 2017). O antagonista humano do receptor de IL-1 (IL-1RA), Anakinra, foi testado em camundongos infectados com os alfavírus Ross River e CHIKV, onde foi demonstrado uma redução da perda óssea e da osteoclastogênese dos animais tratados (WOLF et al., 2019). Aqui não avaliamos a perda óssea dos indivíduos participantes, contudo, os pacientes na fase crônica da infecção apresentaram menores concentrações do IL-1RA do que os pacientes na fase aguda, gerando um déficit na resposta antinflamatória desses pacientes que pode estar contribuindo para a persistência dos sintomas articulares.

Além disso, algumas citocinas foram características da fase crônica da infecção por CHIKV (IL-1 α , IL-4, IL-9, IL-12p70, IL-17A, IL-21, IL27, IL-31). O desequilíbrio do eixo IL-23 – IL17 também perturba a homeostase óssea induzindo a osteoclastogênese, com consequente erosão óssea, através da estimulação de metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias (BUNTE; BEIKLER, 2019). Aqui estamos relatando o aumento da concentração de IL-17A e a diminuição da concentração de IFN- α em soro de seres humanos com processo inflamatório crônico após infecção pelo CHIKV. Associado a esse fato, recentemente, Neupane e colaboradores relataram a facilitação da infecção por CHIKV pela IL-17A ao inibir a expressão de IFN- α em modelo animal. Neste estudo, foi verificado que a infecção por CHIKV em camundongos deficientes de IL-17A resultou em níveis mais alto de IFN- α , viremia reduzida e inchaço de pata mais suave do que os animais selvagens. Curiosamente, a IL-17A bloqueou seletivamente IFN- α induzida durante a infecção por CHIKV, mas não durante as infecções pelos vírus West Nile e ZIKV (NEUPANE et al., 2020). Este fato, até o momento da escrita deste documento, só foi observado em modelo experimental com animais. Em conjunto, nossos dados sugerem

uma possível persistência viral imunomediada após a infecção pelo vírus CHIKV em indivíduos na fase crônica da doença.

Quando analisamos as citocinas por faixa etária e de acordo com a fase da infecção por CHIKV (aguda ou crônica), observamos o desenvolvimento de uma resposta imunológica inflamatória mais acentuada juntamente com uma baixa produção de fatores de crescimento relacionados ao remodelamento tecidual em indivíduos acima de 40 com sintomatologia crônica. A idade e o gênero do paciente são fatores de risco associado ao desenvolvimento de artralgia severa para os infectados com o CHIKV (DELGADO-ENCISO et al., 2018). Em uma revisão sistemática foram avaliados 37 estudos e concluiu-se que sexo feminino, idade avançada, níveis elevados de IL-6, a gravidade da fase aguda e outras comorbidades estavam associadas à artralgia persistente (VAN AALST et al., 2017). Assim, acreditamos que o desequilíbrio inflamatório esteja contribuindo para a persistência dos sintomas nesses indivíduos.

A detecção de casos de coinfeções (ZIKV/CHIKV) era escassa, pois, não existiam dados na literatura que suportavam esse achado. Em 2016, Waggoner e colaboradores descreveram que menos de 5% (16 amostras) de um total de 346 amostras analisadas na Nicarágua por RT-PCR apresentaram coinfeção pelos ZIKV e CHIKV (WAGGONER et al., 2016). No mesmo ano, no estado da Bahia, que é um estado vizinho a Sergipe, foram confirmados 2 casos de coinfeções pelos ZIKV e CHIKV a partir de 15 amostras analisadas (SARDI et al., 2016). Devido à baixa frequência dos casos e da caracterização dos mesmos, aqui, relatamos dados clínicos, epidemiológicos e a análise da resposta imunológica de 12 indivíduos coinfectados.

Embora nossa análise tenha sido limitada quanto a resposta imunológica desencadeada durante a coinfeção (ZIKV/CHIKV) quando comparada as monoinfeções devido à baixa resposta imune demonstrada pela infecção por ZIKV, verificamos poucas citocinas diferenciadas entre os monoinfectados e os coinfectados, fato que refletiu na sintomatologia apresentada pelos coinfectados onde não apresentaram nenhum sintoma mais grave. Entretanto, as citocinas IFN- α , IL-1RA e MCP-1 foram aumentadas nos indivíduos monoinfectados com CHIKV em relação aos coinfectados. Isso levanta o questionamento se não há interferência negativa entre os dois vírus estudados. Observamos também que houve fortes correlações negativas entre algumas citocinas (IL-7, IL-31, GM-CSF, TNF- α , IFN- α , IL-15) e os Cts do CHIKV nas amostras coinfectadas. Cabe ressaltar, que mesmo com as limitações de análises e o conhecimento

da necessidade de mais estudos, este é o primeiro relato realizado para análise de um painel tão grande de citocinas em indivíduos coinfectados com os ZIKV e CHIKV.

8 CONCLUSÕES

- Foi descrito pela primeira vez a resposta imunológica de indivíduos infectados simultaneamente pelos ZIKV e CHIKV a partir da análise de diversos mediadores imunológicos e foram observadas maiores concentrações de IFN- α , IL-1RA e MCP-1 nos indivíduos infectados apenas com CHIKV e menores concentrações de IFN- α , IL-1RA, IL-10 e IP-10 nos indivíduos infectados com ZIKV quando comparados àqueles com coinfeção. Entretanto, serão necessários mais estudos para melhor caracterização da resposta imunológica durante coinfeções (ZIKV/CHIKV) principalmente em relação à monoinfeção por ZIKV.
- A positividade da RT-PCR para o CHIKV, que constata a presença o material genético do vírus nas amostras biológicas analisadas, não apenas em amostras de pacientes da fase aguda mas também nas amostras de pacientes na fase crônica da doença em associação com a diminuição das concentrações de IFN- α , IL-1RA, que configura uma diminuição na resposta antiviral, e o aumento das concentrações de IL-10 e das citocinas do eixo IL-17A/IL-23 podem estar contribuindo para a persistência viral e dos sintomas desses indivíduos na fase crônica da infecção.
- A estimativa realizada pela análise preditiva pôde inferir que indivíduos mais jovens infectados com CHIKV na fase crônica da doença podem apresentar maiores concentrações de fatores de crescimento associados ao remodelamento tecidual (VEGF-A, VEGF-D, PDGF-BB, PIGF-1, LIF, SDF- α), enquanto os indivíduos com mais de 40 anos podem apresentar resposta inflamatória exacerbada via perfis celulares Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 quando comparados com indivíduos nas mesmas faixas etárias durante a fase aguda da infecção.

9 PERSPECTIVAS

- Realizar um estudo com células dos participantes desse estudo que serão expostas a antígenos do ZIKV (ensaio in vitro) para caracterizar a imunofenotipagem, bem como, avaliar as células T funcionais desses pacientes.
- Em um possível novo surto de arboviroses, coletar informações mais precisas sobre o quadro clínico e duração dos sintomas para melhor associação com a gravidade dos sintomas.

10 REFERÊNCIAS

- AMDEKAR, S.; PARASHAR, D.; ALAGARASU, K. Chikungunya Virus-Induced Arthritis : Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. **Viral Immunology**, v. 30, n. 10, p. 1–12, 2017.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 2013, p. 1–11, 2013.
- BADOLATO-CORRÊA, J. et al. Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. **Immunity Inflammation and Disease**, v. 6, n. 2, p. 194–206, 2018.
- BAI, F. et al. IL-10 signaling blockade controls murine West Nile virus infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.
- BARROS, J. B. DE S. et al. Acute Zika virus infection in an endemic area shows modest proinflammatory systemic immunoactivation and cytokine-symptom associations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, p. 1–11, 2018.
- BARZON, L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. **Journal of Clinical Virology**, v. 107, p. 38–47, 2018.
- BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1–30, 2017.
- BRAKS, M. A. H. et al. Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 1, p. 130–139, 2004.
- BRITO, C. A. A. et al. Central and peripheral nervous system involvement caused by Zika and chikungunya coinfection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–6, 2017.
- BUATHONG, R. et al. Detection of zika virus infection in Thailand, 2012-2014. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 2, p. 380–383, 2015.
- BUNTE, K.; BEIKLER, T. Th17 cells and the IL-23/IL-17 axis in the pathogenesis of periodontitis and immune-mediated inflammatory diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 2019.
- CAO-LORMEAU, V. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak caused by ZIKA virus infection in French Polynesia. **Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016a.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016b.

CASTANHA, P. M. S.; MARQUES, E. T. A. A glimmer of hope: Recent updates and future challenges in zika vaccine development. **Viruses**, v. 12, n. 12, p. 25–31, 2020.

CHELLUBOINA, S. et al. Persistence of antibody response in chikungunya. **VirusDisease**, v. 30, n. 3, p. 469–473, 2019.

CHIRATHAWORN, C.; CHANSAENROJ, J.; POOVORAWAN, Y. Cytokines and chemokines in chikungunya virus infection: Protection or induction of pathology. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 1–8, 2020.

CONWAY, M. J. et al. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. **Annual Reviews Virology**, v. 1, n. 1, p. 71–88, 2014.

COOK, L. E. et al. Distinct Roles of Interferon Alpha and Beta in Controlling Chikungunya Virus Replication and Modulating Neutrophil-Mediated Inflammation. **Journal of Virology**, v. 94, n. 1, p. 1–16, 2019.

CORNISH, E. F. et al. Innate Immune Responses to Acute Viral Infection During Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, 2020.

COUDERC, T. et al. A mouse model for Chikungunya: Young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29, 2008.

COUTURIER, E. et al. Impaired quality of life after chikungunya virus infection: A 2-year follow-up study. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 51, n. 7, p. 1315–1322, 2012.

CUNHA, R. V; TRINTA, K. S. Chikungunya virus : clinical aspects and treatment - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017.

DE BRITO, C. A. A. et al. Update on the treatment of musculoskeletal manifestations in Chikungunya fever: A guideline. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, n. December 2019, p. 1–8, 2020.

DEEBA, F. et al. Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 3, p. 5–24, 2015.

DELGADO-ENCISO, I. et al. Smoking and female sex as key risk factors associated with severe arthralgia in acute and chronic phases of chikungunya virus infection. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 3, p. 2634–2642, 2018.

DICK G. Zika isolation and serological specificity. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DIDIER MUSSO ET. AL. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde**

Pública, v. 51, n. 0, p. 10–15, 2017.

DONG, S. et al. Chikungunya virus dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–26, 2017.

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 2536–2543, 2009.

ELIGIO-GARCÍA, L. et al. Co-infection of dengue, zika and chikungunya in a group of pregnant women from tuxtla gutiérrez, chiapas: Preliminary data. 2019. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1–11, 2020.

ELONG NGONO, A.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual review of immunologic**, v. 36, p. 279–308, 2018.

FORATTINI, O. P. Identification of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 20, n. 3, p. 244–245, 1986.

FRANKLINOS, L. H. V. et al. The effect of global change on mosquito-borne disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 9, p. e302–e312, 2019.

FROS, J. J. et al. Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10877–10887, 2010.

GÉRARDIN, P. et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, n. 99, p. 1–9, 2008.

GÉRARDIN, P. et al. Predictors of Chikungunya rheumatism: A prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. **Arthritis Research and Therapy**, v. 15, n. 1, p. R9, 2013.

GOULD, E. A.; HIGGS, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 2, p. 109–121, 2009.

GRANDADAM, M. et al. Chikungunya virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 910–913, 2011.

GRANT, A. et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. **Cell Host Microbe** June, v. 8, n. 196, p. 882–890, 2016.

GUALBERTO CAVALCANTI, N. et al. IL-27 in patients with Chikungunya fever: A possible chronicity biomarker? **Acta Tropica**, v. 196, n. May, p. 48–51, 2019.

GUANCHE GARCELL, H. et al. Clinical relevance of Zika symptoms in the context of a Zika Dengue epidemic. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 2, p. 173–176, 2019.

- GUO, X. et al. Vector Competence and Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 20, n. 5, p. 374–379, 2020.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.
- HEANG, V. et al. Zika virus infection, Cambodia, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 349–351, 2012.
- HIROSE, T. et al. The role of lymphotoxin- α in rheumatoid arthritis. **Inflammation Research**, v. 67, n. 6, p. 495–501, 2018.
- 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, 2010.
- HOLLIDGE, B. S.; WEISS, S. R.; SOLDAN, S. S. The role of interferon antagonist, non-structural proteins in the pathogenesis and emergence of arboviruses. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 629–658, 2011.
- HUSSAIN, A. et al. A Comprehensive Review of the Manifestations and Pathogenesis of Zika Virus in Neonates and Adults. **Cureus**, v. 10, n. 9, 2018.
- JAVELLE, E. et al. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. 1–18, 2015.
- JOHNSON, B. W.; RUSSELL, B. J.; GOODMAN, C. H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 7, p. S471–S474, 2016.
- JOSE, J.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiology**, v. 4, p. 837–856, 2009.
- KAM, Y. W. et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017.
- KAMAL, M. et al. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* under changing climate. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–21, 2018.
- KEESEN, T. S. L. et al. Guillain-Barré syndrome and arboviral infection in Brazil. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 693–694, 2017.
- KRUTIKOV, M.; MANSON, J. Chikungunya Virus Infection: An Update on Joint Manifestations and Management. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 7, n. 4, p. e0033, 2016.

KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. Case report: Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 516–517, 2013.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 764–767, 2007.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LARAS, K. et al. Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 2, p. 128–141, 2005.

LEE, W. W. L. et al. Expanding Regulatory T Cells Alleviates Chikungunya Virus-Induced Pathology in Mice. **Journal of Virology**, v. 89, n. 15, p. 7893–7904, 2015.

LI, Y. G. et al. Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirology**, v. 56, n. 1, p. 6–12, 2012.

LIANG, Y. et al. IL-22 hinders antiviral T cell responses and exacerbates ZIKV encephalitis in immunocompetent neonatal mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2020.

LUM, F. M. et al. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 7, p. 914–920, 2017.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MASMEJAN, S. et al. Zika Virus. **Pathogens**, v. 9, n. 898, p. 1–14, 2020.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53; an additional note on Chikungunya virus isolations and serum antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 3, p. 238–40, 1957.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and Zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, n. January, p. 115–163, 2017.

MCGROGAN, A. et al. The epidemiology of Guillain-Barré syndrome worldwide: A systematic literature review. **Neuroepidemiology**, v. 32, n. 2, p. 150–163, 2009.

MEDLOCK, J. M. et al. A review of the invasive mosquitoes in Europe: Ecology, public health risks, and control options. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 6, p. 435–447, 2012.

MERCADO-REYES, M. et al. Dengue, chikungunya and zika virus coinfection: Results of the national surveillance during the zika epidemic in colombia. **Epidemiology and Infection**, v. 147, n. e77, p. 1–7, 2019.

MERCADO, M. et al. Zika virus detection in amniotic fluid and Zika-associated birth defects. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v. 222, n. 6, p. 610.e1-610.e.13, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2015. **Boletim epidemiológico**, v. 46, p. 1–9, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 3, p. 1–10, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 50, 2017. **Boletim Epidemiológico - SVS - Ministério da Saúde**, v. 48, n. 28, p. 1–22, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n. 2, p. 1–13, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika). **Boletim Epidemiológico Arboviroses**, v. 51, n. 24, p. 1–13, 2021a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos por Aedes (dengue, chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 53, 2020. **Boletim Epidemiológico**, v. 52, n. 03, p. 1–31, 2021b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Chikungunya: manejo clínico**. [s.l: s.n.]. v. 2ª edição

MOREIRA, J. et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 5, p. 296–305, 2017.

MUSSO, D. et al. Molecular detection of Zika virus in blood and RNA load determination during the French Polynesian outbreak. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 9, p. 1505–1510, 2017.

NAKAYA, H. I. et al. Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatologic**, v. 64, n. 11, p. 1–7, 2012.

NAYAR, S. K. et al. Co-infection of dengue virus and chikungunya virus in two patients with acute febrile illness. **Med J Malaysia**, v. 62, n. 4, p. 335–336, 2007.

NEUPANE, B. et al. Interleukin-17A Facilitates Chikungunya Virus Infection by Inhibiting IFN- α 2 Expression. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. November, p. 1–12,

2020.

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. 1–8, 2009.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, 2015.

OH, S. T. et al. Brief Report: Chikungunya viral arthritis in the United States: A mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatologic**, v. 67, n. 5, p. 1214–1220, 2015.

PAOLO, N. C. DI; SHAYAKHMETOV, D. M. Interleukin 1 α and the inflammatory process. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017.

PASTORINO, B. et al. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in Democratic Republic of the Congo: Identification of a new central African strain. **Journal of Medical Virology**, v. 74, n. 2, p. 277–282, 2004.

PAUL, L. M. et al. Dengue virus antibodies enhance Zika virus infection. **Clinical & Translational Immunology**, v. 5, n. 12, p. e117, 2016.

PAUPY, C. et al. Aedes albopictus, an arbovirus vector: From the darkness to the light. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1177–1185, 2009.

PHOMMANIVONG, V. et al. Co-circulation of the dengue with chikungunya virus during the 2013 outbreak in the southern part of Lao PDR. **Tropical Medicine and Health**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 2016.

PIELNAA, P. et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, v. 543, n. October 2019, p. 34–42, 2020.

PINHEIRO, T. J. et al. Neurological manifestations of chikungunya and zika infections. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 11, p. 937–943, 2016.

POMAR, L. et al. Zika virus during pregnancy: From maternal exposure to congenital Zika virus syndrome. **Prenatal Diagnosis**, v. 39, n. 6, p. 420–430, 2019.

PRATA-BARBOSA, A. et al. Co-infection with Zika and Chikungunya viruses associated with fetal death—A case report. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 72, p. 25–27, 2018.

RAVI, V. Re-Emergence of Chikungunya Virus in India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 83–84, 2006.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.

ROQUES, P. et al. Effectiveness of CHIKV vaccine VLA1553 demonstrated by passive transfer of human sera. **JCI Insight**, v. 7, n. 14, p. 1–15, 2022.

ROSSINI, G.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Evolution and epidemiology of chikungunya virus. **Methods in Molecular Biology**, v. 1426, p. 3–10, 2016.

RÜCKERT, C. et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–9, 2017.

RUIZ SILVA, M. et al. Suppression of chikungunya virus replication and differential innate responses of human peripheral blood mononuclear cells during co-infection with dengue virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–15, 2017.

SARDI, S. I. et al. Coinfections of Zika and chikungunya viruses in Bahia, Brazil, identified by metagenomic next-generation sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2348–2353, 2016.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, 2013.

SCHMIDT, C.; SCHNIERLE, B. S. Chikungunya Vaccine Candidates: Current Landscape and Future Prospects. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 16, n. October, p. 3663–3673, 2022.

SERGIPE, S. DE E. DA S. D. DE P. N. E. (NEST. S. Arboviroses Em Sergipe, 2015-2016. **Boletim Epidemiológico**, p. 1–16, 2017.

SERGIPE, S. DE E. DA S. D. DE P. N. E. (NEST. S. Boletim epidemiológico das arboviroses Dengue, Chikungunya e Zika. n. 79, p. 1–17, 2022.

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

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

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: Host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 2, p. 78–88, 2011.

TAPPE, D. et al. Acute Zika virus infection after travel to Malaysian Borneo, September 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 911–913, 2015.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 906–908, 2015.

TENG, T. S. et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 2015.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 12, p. 1895–1906, 2007.

TSETSARKIN, K. A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. **Nature Communications**, v. 5, n. May, p. 1–14, 2014.

VALDÉS LÓPEZ, J. F.; VELILLA, P. A.; URCUQUI-INCHIMA, S. Chikungunya Virus and Zika Virus, Two Different Viruses Examined with a Common Aim: Role of Pattern Recognition Receptors on the Inflammatory Response. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 39, n. 9, p. 507–521, 2019.

VAN AALST, M. et al. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 15, p. 8–22, 2017.

VAN DEN BERG, B. et al. Guillain-Barré syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 8, p. 469–482, 2014.

VOGELS, C. B. F. et al. Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? **PLoS Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2019.

WAGGONER, J. J. et al. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 63, n. 12, p. 1584–1590, 2016.

WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes and Infections**, v. 6, n. 3, p. 1–6, 2017.

WANG, L. et al. From Mosquitos to Humans: Genetic Evolution of Zika Virus. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 561–565, 2016.

WAUQUIER, N. et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115–123, 2011.

WEAVER, S. C. et al. **Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2016. v. 130

WEAVER, S. C.; CHEN, R.; DIALLO, M. Chikungunya virus: Role of vectors in emergence from enzootic cycles. **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 313–332, 2019.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. **Present and future arboviral threats**. [s.l.: s.n.]. v. 85

WEN, J.; SHRESTA, S. T Cell Immunity to Zika and Dengue Viral Infections. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 37, n. 11, p. 475–479, 2017.

WHEELER, A. C. et al. Developmental Outcomes Among Young Children With Congenital Zika Syndrome in Brazil. **JAMA network open**, v. 3, n. 5, p. e204096, 2020.

WOLF, S. et al. Inhibition of Interleukin-1 β Signaling by Anakinra Demonstrates a Critical Role of Bone Loss in Experimental Arthritogenic Alphavirus Infections. **Arthritis and Rheumatology**, v. 71, n. 7, p. 1185–1190, 2019.

XIA, H. et al. An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

ZEVINI, A.; OLAGNIER, D.; HISCOTT, J. Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 3, p. 194–205, 2017.

Apêndice A

Questionário Arboviroses

DATA: ____/____/____

Nome do paciente: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Município: _____

Telefone: _____

Cartão do SUS: _____

Sintomatologia:

Sintomas	Presente	Ausente	Duração dos sintomas (dias)
Febre			
Artralgia			
Exantema			
Conjuntivite			
Mialgia			
Dor retro-orbitária			
Linfadenopatia			

Se usa ou usou algum medicamento?

Sim () Não ()

Foram específicos para os sintomas da doença?

Sim () Não ()

Quais medicamentos:

Anticoncepcional () Anti-histaminico () Anti-inflamatório ()

Analgésico () Antitérmico () Anti-hipertensivo ()

Anti-diabéticos orais () Outros ()

Se outros, especificar: _____

Tem algum tipo de alergia?

() Rinite () Asma () Dermatite () Urticária () Não

Outros () Se outros, especificar: _____

Tem alergia a medicamentos?

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: *Estudo epidemiológico, clínico e imunológico nas infecções pelos vírus Zika, Chikungunya e Dengue na patogênese de anomalias fetais e em doenças de indivíduos adultos.*

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DO RESPONSÁVEL

1. NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: _____ SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO (dd/mm/aaaa) _____

ENDEREÇO: _____, Nº _____

BAIRRO: _____ CIDADE _____

CEP _____ TEL: () _____

Instituição: _____

Data de preenchimento: (dd/mm/aaaa) _____

Assinatura do pesquisador responsável

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que tem infecção por zika vírus ou febre chikungunya, as doenças e suas complicações, como a microcefalia. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os pacientes diagnosticados serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento. Aproximadamente 500 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo.

Finalidade do estudo: Este estudo visa determinar se a resposta imune do paciente ao parasita tem influência na afecção e identificar fatores do vírus zika ou chikungunya que possam influenciar nas doenças causadas por eles.

Procedimentos: Caso você aceite participar do estudo, um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação e seus hábitos. Um médico o examinará para ver as características de sua doença. Você realizará os exames que já são utilizados de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (PCR). Além disso, seu sangue será utilizado para avaliar a resposta imune frente a antígenos do parasita. Também sequenciar RNA/DNA de suas células a fim de identificar possíveis marcadores genéticos que são responsáveis pelo surgimento da doença.

A participação nesta pesquisa não impede você de participar de outra pesquisa, contanto que não mude o tratamento que vai receber.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

Análise de riscos e benefícios: Todos os exames coletados são partes da rotina utilizada para o diagnóstico de zika, chikungunya ou dengue, os quais você faria mesmo se não participasse do estudo, exceto o sangue obtido ao mesmo momento que será utilizado para os estudos da resposta imune, porém não trará novos riscos para você como os previstos para retirada de sangue em rotina normal. A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. Porém, ocorrendo complicações, os médicos do projeto e do Hospital cuidarão de você. Após o diagnóstico da doença, você será tratado com medicações para reduzir os sintomas das doenças. Não existe tratamento específico para zika ou chikungunya. Este acompanhamento será realizado no Hospital Universitário.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre a resposta imune que poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença, assim como de fatores genéticos de coagulação que interferem na clínica da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)98115-9688). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter o parasito que causa esta doença armazenado para estudos futuros aprovados sobre arboviroses.

☐ **ACEITO** que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre arboviroses.

☐ **NÃOACEITO** que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre arboviroses.

_____	_____	_____
Assinatura ou impressão do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura do pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura da testemunha	Data	Hora

Anexo B

Artigo publicado



RESEARCH ARTICLE



Interleukin-17 Contributes to Chikungunya Virus-Induced Disease

Xiang Liu,^{a,b,c} Yee-Suan Poo,^{a,b,c} Juliana C. Alves,^d Roque P. Almeida,^d Helen Mostafavi,^{a,b,c} Patrick Chun Hean Tang,^{a,b,c} Richard Bucala,^e Mauro M. Teixeira,^f Adam Taylor,^{a,b,c} Ali Zaid,^{a,b,c} Suresh Mahalingam^{a,b,c}

^aMenzies Health Institute Queensland, Griffith University, Southport, Queensland, Australia

^bSchool of Medical Sciences, Griffith University, Southport, Queensland, Australia

^cGlobal Virus Network Centre of Excellence in Arboviruses, Griffith University, Southport, Queensland, Australia

^dDivision of Immunology and Molecular Biology Laboratory, University Hospital/EBSERH, Federal University of Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil

^eDepartment of Internal Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA

^fDepartment of Biochemistry and Immunology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Ali Zaid and Suresh Mahalingam are joint last authors.

ABSTRACT Alphaviral arthritides caused by mosquito-borne arboviruses such as chikungunya virus (CHIKV) can persist for months after the initial acute disease. Here, we investigated the contribution of interleukin-17 (IL-17), a cytokine involved in chronic autoimmune arthropathies such as rheumatoid arthritis, to the development of alphaviral arthropathy. Sera from CHIKV-infected patients who displayed both acute and chronic disease showed high levels of IL-17, IL-6, IL-21, IL-22, and IL-23, especially during the chronic phase of disease. We sought to validate these findings using a mouse model of CHIKV infection and disease using wild-type and IL-17A-deficient mice. Mice were infected with CHIKV, and joint and muscle tissues were harvested at designated time points. Tissue infiltrates were examined by immunohistochemistry, and tissue mRNA and protein expression of cytokines was assessed. Joint and muscle pathology was assessed using histology. CHIKV-infected mice lacking IL-17A showed reduced tissue inflammation and neutrophil infiltration, compared to wild-type mice. These investigations showed a role for IL-17 in the acute phase of CHIKV infection and also during the postacute disease resolution phase.

IMPORTANCE CHIKV has been prevalent in Africa, Asia, and the Indian Ocean Islands for decades. There are currently no clinically approved vaccines or specific antiviral drugs targeting CHIKV. The upregulation of IL-17 detected in CHIKV disease patients and the reduced disease seen in IL-17-deficient mice suggest a correlation between IL-17 signaling pathways and CHIKV-induced arthritic inflammation. With an established role in contributing to the pathogenesis of immune-mediated diseases, such as psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis, IL-17 signaling plays an important role in alphavirus arthritides.

KEYWORDS alphavirus, chikungunya, interleukin-17

Mosquito-borne viruses, or arboviruses, are a group of pathogens of major public health concern in light of several recent outbreaks. Reemerging arboviruses comprise two major families of RNA viruses, i.e., flaviviruses (e.g., Zika virus [ZIKV]) and alphaviruses (e.g., chikungunya virus [CHIKV], Ross River virus [RRV], and Mayaro virus [MAYV]), each with specific geographic distribution, mosquito vector specificity, and disease etiology (1, 2). Arthritogenic alphaviruses, including CHIKV, RRV, MAYV, and o'nyong'nyong virus (ONNV), are primarily associated with rheumatic disease, which is characterized by acute fever and rash, and classically acute and chronic polyarthritis/

Editor Diane E. Griffin, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health

Copyright © 2022 Liu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Suresh Mahalingam, s.mahalingam@griffith.edu.au.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a direct contribution from Suresh Mahalingam, a Fellow of the American Academy of Microbiology, who arranged for and secured reviews by Ralph Tripp, University of Georgia, and Pierre Roques, Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA).

Received 2 February 2022

Accepted 9 February 2022

Published 7 March 2022

ANEXO C

Parecer do comitê de ética

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo epidemiológico, clínico e imunológico nas infecções pelos vírus Zika, Chikungunya e Dengue na patogênese de anomalias fetais e em doenças de indivíduos adultos

Pesquisador: Roque Pacheco de Almeida

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 54835916.2.0000.5546

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.486.302

Apresentação do Projeto:

Os pesquisadores pretendem avaliar a cepa de Zika vírus circulante no estado de Sergipe, possíveis mecanismos imunológicos e genéticos envolvidos na fisiopatologia das doenças associadas com a infecção. Para isso irão estabelecer algumas estratégias. Objetivo 1: Detectar, isolar e analisar Zika vírus e variantes deste em população de Aracaju e de Sergipe. Pacientes adultos e crianças com suspeita de infecções pelo vírus Zika, 10 ml de sangue serão coletados e para pesquisa do vírus por metodologia de PCR em tempo real, metodologia que já está disponibilizada no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário. 2. Desenvolver métodos diagnósticos específicos para Zika vírus. Soros dos pacientes com pCR + serão guardados a -70°C para posterior estudo de sensibilidade e especificidade, utilizando novos kits diagnósticos que surgirão no mercado. Objetivo 3: Avaliar Co-infecções entre Zika, Chikungunya e Dengue e seus efeitos no desfecho destas doenças. Plasma dos pacientes com suspeita clínica de arboviroses serão coletados e submetidos a reação de PCR em tempo real para amplificação de sequência de DNA específica para cada vírus, Zika, chikungunya ou dengue. Objetivo 4: Avaliar a relação causal entre Zika vírus e microcefalia e Guillain-Barré. Serão avaliados por PCR, ou sorologia quando estiver disponível, a

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Município: ARACAJU

CEP: 49.060-110

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



Continuação do Parecer: 1.486.302

presença de zika vírus em mulheres grávidas que apresentem sintomatologia clínica. Para esta finalidade, 10 ml de sangue serão coletados de cada indivíduo para realização do PCR. Todas as grávidas serão acompanhadas para os exames de pré-natal no ambulatório de obstetrícia do Hospital Universitário, assim como seus filhos, caso apresentem microcefalia. Objetivo 5 Realizar estudos para avaliar a resposta imunológica humoral e celular contra os arbovírus circulantes em Sergipe e implicações na fisiopatologia das doenças a eles associadas e isolamento de RNA para analisar a expressão de citocinas pelas células.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a cepa de Zika vírus circulante no estado de Sergipe, possíveis mecanismos imunológicos e genéticos envolvidos na fisiopatologia das doenças associadas com a infecção.

Objetivo Secundário:

1. Detectar, isolar e analisar Zika vírus e variantes deste em população de Aracaju e de Sergipe2. Desenvolver métodos diagnósticos específicos para Zika vírus3. Avaliar Coinfecções entre Zika, Chikungunya e Dengue e seus efeitos no desfecho destas doenças.4. Avaliar a relação causal entre Zika vírus e microcefalia e Guillain-Barré. 5. Realizar estudos para avaliar a resposta imunológica humoral e celular contra os arbovírus circulantes em Sergipe e implicações na fisiopatologia das doenças a eles associadas e isolamento de RNA para analisar a expressão de citocinas pelas células. 6. Avaliar polimorfismo genéticos de citocinas de mães e filhos que tiveram ou não manifestações clínicas da infecção puerperal pelo Zika vírus.7. Elucidar a relação causal do vírus Zika e síndromes trombóticas / hemorrágicas; Analisar potenciais biomarcadores para a prática clínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: não será realizada intervenção, somente coleta de sangue.

Benefícios: entender a fisiopatologia da doença e tratar de forma adequada os pacientes. Diagnosticar precocemente as crianças com microcefalia e encaminhá-las para tratamento precoce, como recomendado pelo ministério da saúde. Identificar teste sorológico com boa especificidade e sensibilidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa extremamente relevante, inclusive para o momento atual em que já estabeleceu uma

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-**



Continuação do Parecer: 1.486.302

epidemia causada pelo vírus Zika no Brasil

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatória adequados

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_692063.pdf	05/04/2016 10:50:24		Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_Zika.pdf	05/04/2016 10:49:20	Roque Pacheco de Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Zika_virus.pdf	05/04/2016 00:13:44	Roque Pacheco de Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Zika.pdf	05/04/2016 00:10:51	Roque Pacheco de Almeida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARACAJU, 07 de Abril de 2016

Assinado por:
Anita Herminia Oliveira Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE **Município:** ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br