



Universidade Federal de Sergipe

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

**REGINA ADALVA DE LUCENA COUTO OCÉA**

**AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DA  
CRONICIDADE E DA EXPRESSÃO GÊNICA  
NA FEBRE CHIKUNGUNYA**

**ARACAJU (SE)  
2020**

**REGINA ADALVA DE LUCENA COUTO OCÉA**

**AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS,  
DA CRONICIDADE E DA EXPRESSÃO GÊNICA  
NA FEBRE 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(a): Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

**ARACAJU (SE)  
2020**

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

O15a      Océa, Regina Adalva de Lucena Couto  
Avaliação das manifestações clínicas, da cronicidade e da expressão gênica na febre chikungunya / Regina Adalva de Lucena Couto Océa ; orientador Roque Pacheco de Almeida. – Aracaju, 2020.  
136 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Ciências da Saúde. 2. Febre chikungunya. 3. Artrite. 4. Inflamação. 5. Expressão gênica. 6. RNA-seq. I. Almeida, Roque Pacheco de, orient. II. Título.

CDU 616.98:578.833.1



Universidade Federal de Sergipe

**REGINA ADALVA DE LUCENA COUTO OCÉA**

**AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS,  
DA CRONICIDADE E DA EXPRESSÃO GÊNICA  
NA FEBRE 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.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida  
Universidade Federal de Sergipe

---

1º Examinador: Prof. Dra Ângela Maria da Silva  
Universidade Federal de Sergipe

---

2º Examinador: Prof. Dra Cláudia Diniz Lopes Marques  
Universidade Federal de Pernambuco

---

3º Examinador: Prof. Dr. Lucas Sousa Magalhães  
Universidade Federal de Sergipe

---

4º Examinador: Prof. Dra Marília Vieira Febrônio  
Universidade Federal de Sergipe

**“Quando a gente acha que tem todas as  
respostas, vem a vida e muda todas as  
perguntas...”**

**Luis Fernando Veríssimo**

## AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, por estar sempre ao meu lado, concedendo-me a oportunidade de conquistar mais uma vitória.

Ao meu pai **FREDERICO HOSANAN** por me incentivar e proporcionar a orientação educacional como um dos princípios primordiais ao sucesso na vida.

À minha mãe **MARIA DO SOCORRO**, ensinando-me a lição mais importante da vida “ser mãe”. Agradeço por ser uma avó-mãe essencial na criação de meus filhos.

Ao meu marido **MARCOS**, companheiro, grande pai e meu maior incentivador na realização de mais um sonho. Te amo!

Aos meus queridos filhos **MILENA e FREDERQUINHO**, fonte de alegria e força diária para superação dos obstáculos enfrentados. Vocês são a razão de minha vida. Amo vocês!

À minha querida irmã **MÔNICA**, pessoa iluminada! Sua fé em DEUS nos protege a cada dia!

À minha querida irmã **ANA LUÍZA**, competente cardiologista, humana e exemplo de médica.

A todos amigos, familiares, representados por meu querido **Tio PASSENHOUSE**, médico humano, sempre me incentivando na difícil arte da “Medicina”.

À **DR. ROQUE PACHECO DE ALMEIDA**, meu orientador, pelo incentivo e apoio neste trabalho. Exemplo de mestre, sempre disposto a dividir seus ricos ensinamentos.

À **DR. ENALDO MELO** pelo essencial auxílio da análise estatística, comportando-se como um co-orientador em meu projeto.

À **equipe do Instituto Butantã e USP**, em especial à **DRA. ALESSANDRA SCHANOSKI**, pelo auxílio na coleta e realização dos exames.

À **equipe do setor de imunologia do Hospital Universitário (HU-EBSERH-UFS)**, em especial à **DRA JULIANA ALVES** pelo apoio, e colaboração na realização dos exames.

Aos **colegas reumatologistas e residentes em reumatologia do Hospital Universitário**, em especial à **DR. CAETANO**, primeiro “mestre” na arte de fazer REUMATOLOGIA. Agradeço pelo apoio, cuidado com os pacientes e incentivo na realização deste projeto.

À colega reumatologista, **DRA. ALEJANDRA DEBBO**, minha “ex- residente” que foi essencial na elaboração deste trabalho.

Aos **professores e colegas do doutorado do Núcleo de Pós-Graduação em Medicina**, pelos ensinamentos, troca de experiências e estímulos para a realização deste projeto.

Aos **pacientes portadores de Febre Chikungunya**, doença desafiadora, cujo sofrimento diário foi um incentivo constante na realização desta pesquisa, em busca de conhecimentos que levassem à melhora e conforto para os mesmos.

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DA CRONICIDADE E DA EXPRESSÃO GÊNICA NA FEBRE CHIKUNGUNYA

**Introdução:** A Febre Chikungunya (FC) tornou-se uma epidemia recente no Brasil, em especial, na região Nordeste. Ressalta-se além do quadro de febre, exantema, o aparecimento de artralguas difusas e artrite, muitas vezes incapacitante, com evolução para cronicidade de 40% a 87% dos casos. Apesar disso, existem escassos estudos avaliando os aspectos fisiopatológicos e fatores associados à cronicidade, incluindo a análise de assinaturas moleculares. **Objetivo:** Identificar as características clínicas, os aspectos associados à cronicidade articular e analisar o tipo de expressão gênica na evolução desta doença. **Método:** Estudo de coorte prospectiva acompanhada no serviço de Reumatologia do Hospital Universitário de Sergipe (HU/UFS-SE) durante 24 meses. Foram realizadas avaliação clínica, coleta de exames laboratoriais gerais, e pesquisa da expressão gênica pela análise do transcriptoma, através do sequenciamento do RNA, pela técnica *deep-sequencing* (RNA-seq). Estas coletas foram feitas no laboratório de biologia molecular do HU/UFS-SE em parceria com o Instituto Butantan de São Paulo, onde foi analisado o RNA-seq. Foram comparados os grupos crônicos e não crônicos. As variáveis categóricas foram expressas em frequências absolutas e percentagens. Para a comparação entre os grupos foi utilizado o teste T-Student para dados paramétricos independentes ou teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos. Para os modelos de regressão foi calculado Odds Ratio e a Relação de Risco, sendo realizado posteriormente uma regressão logística multivariável. Para a análise de probabilidade realizou-se a curva de Kaplan-Meier. Foi considerado para todas as análises estatísticas um intervalo de confiança superior a 95% ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Analisou-se 246 pacientes com FC, sendo que 92,3% tiveram o diagnóstico confirmado pelo qRT-PCR, com uma taxa de cronicidade de 54,3%. Os principais fatores associados à cronicidade foram a idade, sexo feminino, artralgia, mialgia, linfadenopatia e uso de AINEs ( $p < 0,005$ ). Após uma regressão logística ajustada identificou-se que apenas a idade, sexo feminino, linfadenopatia e uso de AINEs permaneciam como fatores independentes. A curva de sobrevivência Kaplan Meier identificou que após 90 dias a frequência de cronicidade foi de 10,5%, aumentando gradativamente, chegando a 30% no primeiro ano. Os principais sintomas reumatológicos crônicos foram as doenças não inflamatórias, 25% de DAIC e 5% de doença crônica autoimune (Artrite Reumatoide e Artrite Psoriásica). A positividade do qRT-PCR foi observada em 73% dos casos crônicos, no entanto não foram observadas diferenças clínicas e da evolução na comparação dos pacientes com qRT-PCR positivos e negativos. A análise do transcriptoma foi realizada em 39 pacientes da fase aguda e 6 da fase crônica. Dentre os principais genes observados destacam-se o EIF (fatores de iniciação de tradução eucariótica) e o IRF7 importantes no processo de replicação viral, além do gene DDX3Y e do EIF1AY, relacionados à evolução crônica. **Conclusão:** A morbidade osteoarticular na FC, principalmente devido ao seu aspecto crônico, apresentam incertezas na sua fisiopatologia. Nossos achados demonstram que manifestações agudas exacerbadas, idade avançada, sexo feminino e linfadenopatia são fatores associados à cronicidade. A identificação de alguns genes indutores de IFN e os EIFs na vigência da doença pode fomentar estudos futuros esclarecedores para o tratamento e prevenção da FC.

**PALAVRAS-CHAVE:** febre chikungunya, artrite, resposta inflamatória, expressão gênica, RNA-seq.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF CLINICAL MANIFESTATIONS, CHRONICITY AND GENE EXPRESSION IN CHIKUNGUNYA FEVER

**Introduction:** Chikungunya Fever (CF) has become a recent epidemic in Brazil, especially in the Northeast region. In addition to fever, rash, the appearance of diffuse arthralgias and arthritis, often incapacitating with evolution to chronicity in 40% to 87% of cases. Despite this, there are few studies evaluating the pathophysiological aspects and factors associated with chronicity, including the analysis of molecular signatures. **Objective:** To identify the clinical characteristics, the aspects associated with joint chronicity and to analyze the type of gene expression in the evolution of this disease. **Method:** Prospective cohort study followed up at the Rheumatology Service of Hospital Universitário de Sergipe (HU/UFS-SE) for 24 months. Clinical evaluation, collection of general laboratory tests, and evaluation of gene expression were carried out by analyzing the transcriptome, through RNA sequencing, using the deep-sequencing technique (RNA-seq). These collections were made at the molecular biology laboratory of HU-SE in partnership with the Butantan Institute of São Paulo, where the RNA-seq was analyzed. Chronic and non-chronic groups were compared. Categorical variables were expressed as absolute frequencies and percentages. For the comparison between the groups, the T-Student test was used for independent parametric data or the Mann-Whitney test for non-parametric data. For the regression models, Odds Ratio and Risk Ratio were calculated, and a multivariable logistic regression was subsequently performed. For the probability analysis, the Kaplan-Meier curve was performed. For all statistical analyzes, a confidence interval greater than 95% ( $p < 0.05$ ) was considered. **Results:** 246 CF patients were analyzed, 92.3% of whom had their diagnosis confirmed by qRT-PCR, with a chronicity rate of 54.3%. The main factors associated with chronification were age, female gender, arthralgia, myalgia, lymphadenopathy and use of NSAIDs ( $p < 0.005$ ). After an adjusted logistic regression, it was identified that only age, female gender, lymphadenopathy and use of NSAIDs remained as independent factors. The Kaplan Meier survival curve identified that after 90 days the frequency of chronicity was 10.5%, gradually increasing, reaching 30% in the first year. The main chronic rheumatological symptoms were non-inflammatory diseases, 25% of DAIC and 5% of chronic autoimmune disease (Rheumatoid Arthritis and Psoriatic Arthritis). The positivity of qRT-PCR was observed in 73% of chronic cases, however, no clinical and evolution differences were observed in the comparison of patients with positive and negative qRT-PCR. Transcriptome analysis was performed in 39 patients in the acute phase and 6 of the chronic phase. Among the main genes observed, Eif (eukaryotic translation initiation factors) and IRF7 are important in the viral replication process, in addition to the DDX3Y and EIF1AY genes, related to chronic evolution. **Conclusion:** Osteoarticular morbidity in CF, mainly due to its chronic aspect, has uncertainties in its pathophysiology. Our findings demonstrate that exacerbated acute manifestations and advanced age, female gender, and lymphadenopathy are factors associated with chronicity. The identification of some IFN-inducing genes and the EIFs in the presence of the disease may encourage future studies to clarify the treatment and prevention of CF.

**KEYWORDS:** chikungunya fever, arthritis, inflammatory response, gene expression, RNA-seq.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Disseminação do CHIKV nas células e órgãos .....	22
<b>Figura 2:</b> Imunidade Inata na infecção do CHIKV .....	23
<b>Figura 3:</b> Fisiopatologia da artrite crônica pelo CHIKV .....	27
<b>Figura 4:</b> Critério de classificação de doença articular inflamatória crônica (DAIC) .....	31
<b>Figura 5:</b> Tipo de articulações acometidas em diferentes fases .....	32
<b>Figura 6:</b> Definição de caso de Febre Chikungunya .....	35
<b>Figura 7:</b> Curva de anticorpos anti-CHIKV e carga viral CHIKV .....	37
<b>Figura 8:</b> Campos de integração da Biologia de Sistemas .....	45
<b>Figura 9:</b> Fluxograma e linha do tempo dos pacientes com Febre Chikungunya .....	52

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Frequência dos sintomas da FC na fase aguda .....	30
<b>Quadro 2:</b> Formas atípicas da Febre Chikungunya .....	34
<b>Quadro 3:</b> Resultados de testes diagnósticos de acordo com tempo de doença .....	37

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Fluxograma de realização de exames dos pacientes com suspeita de Febre Chikungunya .....	<b>50</b>
<b>Gráfico 2:</b> Fluxograma de evolução clínica dos pacientes com febre Chikungunya	<b>51</b>
<b>Gráfico 3:</b> Pacientes com suspeita clínica e epidemiológica de arboviroses no Estado de Sergipe – Brasil em 2015/2016 .....	<b>58</b>
<b>Gráfico 4:</b> Percentual de confirmação laboratorial dos pacientes com Febre Chikungunya .....	<b>59</b>
<b>Gráfico 5:</b> Fluxograma de evolução clínica dos pacientes com FC após 3 meses ...	<b>62</b>
<b>Gráfico 6:</b> Frequência de cronicidade articular nos Pacientes com Febre Chikungunya .....	<b>62</b>
<b>Gráfico 7:</b> Análise de sobrevida livre de cronificação ao longo do tempo .....	<b>66</b>
<b>Gráfico 8:</b> Análise de sobrevida da Linfadenopatia e cronicidade .....	<b>67</b>
<b>Gráfico 9:</b> Análise de sobrevida do Antiinflamatório e cronicidade .....	<b>68</b>
<b>Gráfico 10:</b> Tempo em dias de coleta do qRT-PCR CHIKV nos pacientes na fase crônica .....	<b>70</b>
<b>Gráfico 11:</b> Frequência dos exames laboratoriais confirmatórios para Febre Chikungunya nos pacientes crônicos .....	<b>71</b>
<b>Gráfico 12:</b> Evolução do EVA ao longo dos 02 anos de acordo com o tipo de manifestação reumatológica .....	<b>73</b>
<b>Gráfico 13:</b> Evolução do DAS 28 ao longo dos 02 anos de acordo com o tipo de manifestação reumatológica .....	<b>74</b>
<b>Gráfico 14:</b> Tempo de Coleta do RNA-seq em relação ao início da doença .....	<b>75</b>
<b>Gráfico 15:</b> Relação da cronicidade e tempo de coleta do RNA-seq .....	<b>76</b>
<b>Gráfico 16:</b> Sintomas relatados durante a coleta do RNA-seq.....	<b>76</b>
<b>Gráfico 17:</b> Assinaturas moleculares associadas à viremia.....	<b>77</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caracterização clínica para todos os pacientes com Monoinfecção por FC na Fase aguda .....	<b>60</b>
<b>Tabela 2:</b> Diferenças dos antecedentes pessoais na fase aguda de acordo com a amostra analisada .....	<b>61</b>
<b>Tabela 3:</b> Diferenças dos medicamentos utilizados na fase aguda de acordo com a amostra analisada .....	<b>61</b>
<b>Tabela 4:</b> Comparação dos dados clínicos na fase aguda de pacientes com FC que cronificaram e não cronificaram .....	<b>63</b>
<b>Tabela 5:</b> Razão de chances não ajustada para fatores associados à cronicidade articular .....	<b>64</b>
<b>Tabela 6:</b> Razão de chances ajustada para fatores associados à cronicidade articular	<b>65</b>
<b>Tabela 7:</b> Frequência de cronicidade ao longo do tempo .....	<b>65</b>
<b>Tabela 8:</b> Relação de fatores de cronicidade com curva de sobrevida livre de cronificação .....	<b>67</b>
<b>Tabela 9:</b> Caracterização clínica e laboratorial para todos os pacientes crônicos com Febre Chikungunya .....	<b>69</b>
<b>Tabela 10:</b> Comparação das manifestações crônicas dos pacientes crônicos com qRT-PCR positivo e negativo .....	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>A. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
<i>A. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
AINEs	Antiinflamatório não hormonais
AntiCCP	Anticorpos anticitrulinados
AP	Artrite Psoriásica
AR	Artrite Reumatoide
BFV	Vírus do Barmah Forest CARDIF Adaptador CARD
CCL2	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
CD4	Marcador do linfócito Th1/Th2/Th17, co-receptor para molécula MHC classe II
CD8	Marcador do linfócito T citotóxico, co-receptor para molécula MHC classe I
CE	Corticosteroides
CHIKV	Vírus da Chikungunya
DAIC	Doença articular inflamatória crônica
DAS28	<i>Disease Activity Score Calculator for Rheumatoid Arthritis</i>
DC	Célula dendrítica
DM	Diabetes Mellitus
DMCDs	Drogas modificadoras do curso da doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECSA	Leste/Centro/Sul Africano
EpAs	Espondiloartrites
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EVA	Escala Visual Analógica
FAN	Fator Antinuclear
FC	Febre Chikungunya
FR	Fator Reumatoide
GNM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCQ	Hidroxicloroquina
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA B27	Antígeno leucocitário humano B27

IFNAR	Receptor do Interferon
IFN-1	Interferon tipo – 1
IFN- $\alpha$	Interferon – $\alpha$
IFN- $\beta$	Interferon – $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon – $\gamma$
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL-1b	Interleucina 1 $\beta$
IL2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor para IL-2
IL-5	Interleucina 5
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IRF 3	Fatores reguladores do Interferon 3
IRF 7	Fatores reguladores do Interferon 7
ISGs	Genes estimuladores por interferon
JAK/STAT	<i>Transdutor do Quinase-Sinal de Janus e activador da transcrição</i>
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
RNA	Ácido ribonucleico
NSP 1- 4	Proteínas não estruturais
MAYV	Vírus do Mayaro
MAVS	Proteína sinalizadora antiviral mitocondrial
MCP-1	<i>“Monocyte chemoattractant protein-1”</i>
MHC	Complexo de Histocompatibilidad Maior
MIG	Imunoglobulina de membrana
MIP	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MTX	Metotrexate

MYD88	Proteína 88 de resposta primária de diferenciação mieloide
NK	Células <i>natural killer</i>
OA	Osteoartrite
ONNV	Vírus do O'nyong-nyong
OPG	Osteoprotegerina
PAMPs	Padrões moleculares
PCR	Proteína C reativa
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RANK-L	Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B
RIG-I	Ácido retinoico indutor gene I
RNs	Recém-nascidos
RRV	Vírus do Ross River
RT-PCR	<i>Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípide
SES	Secretaria Estadual da Saúde
SINV	Vírus do Sindbis
SSZ	Sulfassalazina
TENS	Estimulação elétrica nervosa transcutânea
Th1	Linfócitos T " <i>helper</i> " classe 1
Th2	Linfócitos T " <i>helper</i> " classe 2
Th17	Linfócitos T " <i>helper</i> " classe 17
TLR	<i>Toll-Like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
VHS	Velocidade de hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 Agente Etiológico .....	18
2.2 Vetor .....	18
2.3 Epidemiologia .....	19
2.3.1 Chikungunya no Mundo .....	19
2.3.2 Chikungunya no Brasil .....	20
2.4 Fisiopatologia da Febre Chikungunya .....	21
2.4.1 Replicação Viral.....	21
2.4.2 Imunidade Inata .....	22
2.4.3 Imunidade Adaptativa .....	25
2.4.4 Patogênese da Artrite Crônica.....	25
2.5 Manifestações Clínicas.....	28
2.5.1 Fase Aguda ou febril .....	29
2.5.2 Fase Subaguda .....	30
2.5.3 Fase Crônica .....	31
2.6 Manifestações Atípicas .....	34
2.7 Diagnóstico .....	35
2.7.1 Isolamento Viral .....	35
2.7.2 qRT-PCR .....	36
2.7.3 Sorologia.....	36
2.8 Diagnóstico Diferencial .....	37
2.9 Tratamento .....	38
2.9.1 Farmacológico .....	38
2.9.2 Não Farmacológico.....	42
2.10 Vacinas .....	43
2.11 Medidas Preventivas .....	43
2.12 Expressão Gênica .....	43
2.13 Biologia de Sistemas .....	44
2.13.1 Bioinformática.....	45
2.13.2 RNA-seq .....	46

2.13.3 RNA-seq e Chikungunya.....	46
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>48</b>
3.1 Objetivo Geral .....	48
3.2 Objetivos Específicos .....	48
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>49</b>
4.1 Campo do Estudo .....	49
4.2 Amostra .....	49
4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão .....	49
4.3.1 Critérios de Inclusão .....	49
4.3.2 Critérios de Exclusão .....	50
4.4 Captação de Amostras:.....	50
4.5 Acompanhamento e coleta de dados.....	51
4.6 Variáveis Estudadas .....	52
4.6.1 Clínicas .....	52
4.6.2 Laboratório Geral .....	54
4.6.3 Laboratório Molecular .....	54
4.6.3.1 qRT-PCR.....	54
4.6.3.2 Sorologia para Chikungunya .....	54
4.6.3.3 Extração do RNA .....	54
4.6.3.4 RNA-Seq .....	55
4.6.3.5 Expressão Gênica.....	55
4.6.4 Evolução.....	56
4.7 Análise Estatística .....	56
4.8 Considerações Éticas .....	57
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>58</b>
5.1 Resultados Clínicos .....	58
5.1.1 Análise da Amostra dos Pacientes com suspeita de Arboviroses .....	58
5.1.2 Resultados da Fase Aguda .....	59
5.2 Evolução dos Pacientes com Febre Chikungunya após 03 meses .....	61
5.2.1 Frequência de Cronicidade.....	62
5.3 Fatores associados à cronicidade .....	63
5.4 Evolução de Cronicidade ao Longo do Tempo .....	65
5.4.1 Fatores associados à cronicidade ao longo do tempo .....	66

5.5 Resultados da Fase Crônica .....	68
5.5.1 Comparação dos pacientes com qRT-PCR positivos e negativos.....	71
5.5.2 Evolução dos pacientes crônicos.....	73
5.5.2.1 Avaliação do EVA .....	73
5.5.2.2 Avaliação do DAS28 .....	73
5.5.2.3 Tratamento Realizado .....	74
5.6 Resultados da Expressão Gênica .....	75
5.6.1 Dados Clínicos e Sorológicos .....	75
5.6.2 Dados Moleculares .....	77
5.6.2.1 Quantificação de Transcriptoma .....	77
5.6.2.2 Associação com Expressão Gênica e Quantidade de Vírus .....	77
5.6.2.3 Análise Molecular na Fase Aguda e Crônica .....	78
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>79</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>90</b>
<b>9 APÊNDICE .....</b>	<b>104</b>
9.1 Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	104
9.2 Apêndice B – Consulta Inicial .....	106
9.3 Apêndice C – Ficha Clínica Chikungunya .....	107
9.4 Apêndice D – Ficha de Seguimento .....	112
<b>10 ANEXO .....</b>	<b>114</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Febre Chikungunya (FC) é uma arbovirose transmitida ao ser humano pelo mosquito *Aedes Aegypti* e *Aedes Albopictus*, inicialmente restrita aos países africanos e asiáticos (POWER; LOGUE, 2007). A partir de 2005 ela começou a se difundir em países da Europa e em 2011 nas Américas, sendo recentemente introduzida no Brasil, acometendo uma grande parcela da população brasileira, principalmente no Norte e Nordeste do Brasil (AZEVEDO et al., 2015; SIMIAO et al., 2019).

Apresenta-se de forma aguda, com quadro febril exantemático e elevado comprometimento osteoarticular. Geralmente é autolimitada, porém pode evoluir para manifestações atípicas e cronicidade, com elevada morbidade (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2016). Alguns fatores de risco estão associados à cronicidade da doença, como idade acima de 45 anos, sexo feminino, pacientes com sintomas agudos proeminentes, títulos mais elevados de anticorpos contra vírus da Chikungunya (CHIKV), elevada carga viral e, presença de doença articular prévia, porém com poucas evidências científicas (ALI OU ALLA; COMBE, 2011; SCHILTE et al., 2013, ZAID et al., 2018).

A patogênese da doença ainda é incerta. Na fase aguda, acredita-se que, a rápida replicação viral, principalmente no tecido osteoarticular e a estimulação de citocinas pró-inflamatórias sejam os principais representantes na fisiopatologia da infecção (MCCARTHY; MORRISON, 2016). Cerca de 40% a 87% dos pacientes evoluem para uma fase crônica, porém ainda não se sabe exatamente se os sintomas articulares crônicos resultam de autoimunidade ou de resposta imune hiperativa aos antígenos virais ou se é resultado de persistente replicação viral e citotoxicidade direta induzida pelo vírus (TENG et al., 2015; ZAID et al., 2018; BRITO et al., 2020).

A avaliação genômica do transcriptoma em doenças infecciosas muitas vezes facilita o entendimento dos perfis de expressão das respostas celulares durante o processo infeccioso. Um dos métodos mais recentes para a realização desse sequenciamento é o RNA-seq, que utiliza o método de *deep-sequencing* (TRAPNELL et al., 2009; MARGUERAT; BÄHLER, 2010; GRIFFITH et al., 2015). Há poucos estudos nos pacientes com FC das assinaturas moleculares, principalmente com a análise do RNA-seq, limitados a modelos animais, *in vitro* e uma pequena coorte de crianças (WILSON et al., 2017; MICHLMAYR et al., 2018).

Devido a sua natureza endêmica, caráter crônico e muitas vezes elevada morbidade osteoarticular, aliado às incertezas que envolvem sua fisiopatologia e evolução clínica, é

importante conhecer dados epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e inclusive o perfil molecular nessa população; bem como as diferenças que envolvem a fase aguda e crônica da doença. Estes registros constituiriam uma ferramenta de entendimento da patogênese da FC e de prognóstico poderoso, facilitando o tratamento preventivo e contribuindo para possíveis estratégias de pesquisas para vacinação.

No Brasil, até o momento, não existem trabalhos publicados que demonstrem os fatores associados às manifestações articulares crônicas na FC e escassez de achados na literatura sobre assinaturas moleculares, especialmente com a utilização do RNA-seq. Portanto, acredita-se que esta pesquisa proporcionará um melhor conhecimento acerca do perfil clínico, diagnóstico, forma de evolução e expressão gênica dos pacientes com FC.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Agente Etiológico

A FC é uma arbovirose que transmite o vírus Chikungunya (CHIKV) que pertence à família Togaviridae de gênero Alphavirus. É um vírus RNA fita simples com polaridade positiva que codifica quatro proteínas não estruturais (NSP 1- 4) e cinco proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K). É considerado como um alfavírus artritogênico, assim como o vírus do Mayaro (MAYV), o Ross River (RRV), Sindbis (SINV), O'nyong-nyong vírus (ONNV) e Barmah Forest vírus (BFV) (ROOSENHOFF et al., 2016).

Os alfavírus podem ser divididos em dois tipos de vírus: o do Velho Mundo, associado a manifestações articulares e cutâneas, e o do Novo Mundo, relacionado às encefalopatias (MADARIAGA et al., 2016). O CHIKV também pode ser enquadrado nesses dois tipos, entretanto o comprometimento articular é o mais comumente relacionado. Todavia, nas epidemias mais recentes foram identificadas algumas formas de comprometimento neurológico relacionados ao CHIKV. Diferentemente dos outros alfavírus encefalogênicos que infectam os neurônios, o CHIKV parece acometer as células estromais do Sistema Nervoso Central e plexo coroide (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; VAIRO et al., 2019).

Existem quatro linhagens de CHIKV com genótipos e características antigênicas distintas: o do grupo filogenético Leste/Centro/Sul Africano (ECSA), o da linhagem Asiática, Oceano Índico e o da África Ocidental (WAHID; ALI; RAFIQUES; IDREES, 2017; ARAGÃO et al., 2019). Durante a epidemia de 2004-2006, onde ocorreu a disseminação para as Américas, a linhagem identificada foi a Asiática (NUNES et al. 2015; MADARIAGA et al., 2016).

A transmissão ocorre através de dois ciclos: o Silvestre, que ocorre entre primatas e os mosquitos e, a Urbana, entre humanos e mosquitos. Há relatos de transmissão vertical, ocorrendo em mães com elevada viremia durante o parto, sendo rara antes da 22ª semana de gestação, com elevada mortalidade nesse período (FRITEL et al., 2010; VAIRO et al; 2019).

### 2.2 Vetor

Os principais vetores que transmitem a FC são o *Aedes aegypti* (*A. aegypti*) e *Aedes albopictus* (*A. albopictus*) (MADARIAGA et al., 2016). Até recentemente, o *A. aegypti* era considerado o vetor primário para transmissão CHIKV, mas em 2006, o *A. albopictus* foi identificado como o segundo maior vetor do vírus em locais onde o *A. aegypti* é considerado raro (Ilhas Reunion) e também em locais onde ambos os mosquitos são prevalentes. A

emergência do *A. albopictus* como vetor do CHIKV se deu por uma mutação no resíduo 226 da glicoproteína-1 E1 do CHIKV, o que facilitou a captação, replicação e transmissão do vírus pelo vetor (SCHUFFENECKER et al., 2006; VAIRO et al., 2019).

O *A. albopictus* tem uma distribuição geográfica mais ampla, encontrado principalmente em zona rural, apresentando longa vida e ovos com resistência às estações secas. Ele invadiu o Brasil na década de 1980 e pesquisas recentes demonstram a sua presença em 59% dos municípios brasileiros, principalmente nas áreas mais frias do sul do país (CARVALHO; MONTEIRO et al., 2014).

Já o *A. aegypti*, mosquito transmissor de outras arboviroses como a Dengue e ZIKA, apresenta-se no ciclo de transmissão urbana, principalmente nas regiões tropicais das regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste do Brasil. A transmissão é feita pela picada da fêmea, que é capaz de transmitir a doença para até 05 pessoas no ciclo de produção dos ovos, os quais apresentam longa vida e durabilidade também, assim como os do *A. albopictus* (AZEVEDO et al., 2015).

## **2.3 Epidemiologia**

### **2.3.1 Chikungunya no Mundo**

O primeiro isolamento do CHIKV ocorreu em soro humano durante o surto de doença febril na Tanzânia, em 1953 (ROBINSON et al., 1955). A palavra “Chikungunya” é derivada da língua Makonde (Kimakonde), um dos idiomas falados no sudeste da Tanzânia, e significa “curvar-se ou tornar-se contorcido”, referindo-se à postura adotada pelo paciente devido à grave dor articular nas infecções severas causadas pelo CHIKV (WEAVER; LECUIT, 2015).

Entre os anos de 1960 e 1990, o vírus foi isolado durante numerosos surtos em países da África Central e do Sul, assim como em países da África Ocidental. Anos mais tarde, surtos frequentes também foram relatados em países do Sudeste Asiático, como Índia, Malásia, Indonésia, Camboja, Vietnã, Mianmar, Paquistão e Tailândia. Após uma ausência de 20 anos o vírus ressurgiu na Indonésia, entre 2001 e 2003 (POWERS; LOGUE, 2007; SIMIAO et al., 2019).

Até 2004 a FC foi restrita a países africanos e asiáticos, no entanto, em 2005 foi detectada em várias ilhas do Oceano Índico (Comores, Madagascar, Mayotte, Ilhas *Seychelles*, Maurícias, Ilhas da Reunion), resultando em uma grande epidemia nas Ilhas Reunion, entre 2005 e 2006, com elevada morbimortalidade. Observou-se nesta epidemia, casos atípicos, com

comprometimento neurológico, em neonatos, transmissão pelo *A. albopictus* e elevada mortalidade; associados a um novo genótipo viral, o IOL, descendente da linhagem ECSA que contém mutações adaptativas nos genes da proteína do envelope (E1 e E2) (WEAVER; LECUIT, 2015).

A propagação do CHIKV em outras regiões do mundo ocorreu através de viajantes virêmicos que retornavam de regiões endêmicas para países da Europa, Ásia, América do Norte e Austrália. Em 2011, após uma importante epidemia na República Democrática do Congo, com mais de 11.000 casos, houve uma preocupação com a disseminação da doença nas Américas. Fato que em 2013 ocorreu a transmissão autóctone da doença em vários países do Caribe e em janeiro de 2014 foram detectados os primeiros casos em países da área continental da América Central (AZEVEDO et al., 2015).

Em dezembro de 2013, foi diagnosticado o primeiro caso de FC na América, na Ilha de Saint Martin. Nessa época a Ilha estava em uma epidemia de dengue, o que dificultou o diagnóstico de uma nova doença febril aguda com características clínicas semelhantes à dengue (YACTAYO et al., 2016). Posteriormente, a FC se espalhou por 45 países e territórios da América Central, Sul e Norte, causando mais de 2,9 milhões de casos suspeitos e confirmados, assim como 296 óbitos até julho de 2016 (PAHO, 2016).

### **2.3.2 Chikungunya no Brasil**

Os primeiros relatos da FC no Brasil foram de 03 (três) viajantes virêmicos provenientes da Indonésia e Índia, em 2010. Porém, os primeiros casos autóctones só foram identificados em 2014, quase que simultaneamente nas cidades de Oiapoque, no Amapá, no norte do País, e em Feira de Santana, no estado da Bahia. O genótipo circulante do CHIKV no Amapá era o Asiático, como ocorreu no Caribe, enquanto na Bahia, foi o do Leste-Centro-Sul Africano, proveniente de um paciente infectado da Angola (NUNES et al., 2015; DIAS et al., 2018).

Entre 2015 e 2016, época de grande epidemia no Nordeste do Brasil, o Ministério da Saúde demonstrou que até a Semana Epidemiológica 50, foram registrados 265.554 casos prováveis de FC no país, com uma taxa de incidência de 129,9 casos/100 mil hab. Esses casos prováveis estavam distribuídos em 2.785 municípios; destes, 146.914 (55,3 %) foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis (número de casos/100 mil hab.), por regiões geográficas, demonstrou que a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência: 407,7 casos/100 mil hab., destacando-se o Rio Grande do Norte (714,0 casos/100

mil hab.), Ceará (520,9 casos/100 mil hab.), Alagoas (509,7 casos/100 mil hab.) e Pernambuco (510,6 casos/100 mil hab (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Em Sergipe, em 2016 até à Semana Epidemiológica 40/2016, foram notificados um total de 7.791 casos prováveis distribuídos em 71 municípios. Os 05 (cinco) municípios com as maiores taxas de incidências (casos/100.000hab.) foram: São Cristóvão (4.069,95), Umbaúba (2.016,70), São Miguel do Aleixo (1.768,32), Carmópolis (1.478,68) e Santa Luzia do Itanhy (1.120,27). Dos casos notificados, 5.574 foram confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Nos anos seguintes houve uma queda no registro de casos e recentemente o Ministério da Saúde divulgou que, em 2019 até à Semana Epidemiológica 22 (30/12/2018 a 01/06/2019), foram registrados 59.617 casos prováveis de Chikungunya no país. No mesmo período de 2018, foram registrados 59.343 casos prováveis. A análise da taxa de incidência de casos prováveis de Chikungunya (número de casos/100 mil hab.) em 2019 até à SE 22, segundo regiões geográficas, evidencia que as regiões Sudeste e Norte apresentam os maiores valores: 52,4 casos/100 mil hab. e 20,2 casos/100 mil hab. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em 2020 até a semana 29 (29/12/2019 a 18/07/2020) foram notificados 56.717 casos prováveis (taxa de incidência de 27,0 casos por 100 mil habitantes) no Brasil. As regiões Nordeste e Sudeste apresentam as maiores taxas de incidência, 62,1 casos/100 mil habitantes e 21,6 casos/100 mil habitantes, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Em Sergipe, a SES divulgou a presença de 280 casos até o dia 04 de julho de 2020 distribuídos nos seguintes municípios: Estância (100), Aracaju (71), Simão Dias (49), Nossa Senhora do Socorro (12), São Cristóvão (11), Barras dos Coqueiros (8), Lagarto (8), Malhador (6), Salgado (5), Cristinápolis (3), Campo do Brito (2), Boquim (1), Carira (1), Itabaiana (1), Japaratuba (1), Muribeca (1), Neópolis (1) (SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE, 2020). Comparado ao ano passado tivemos um aumento significativo dos casos. Acredita-se que consequências da pandemia do coronavírus, como a ausência das visitas dos agentes de endemias possa ter contribuído para este aumento.

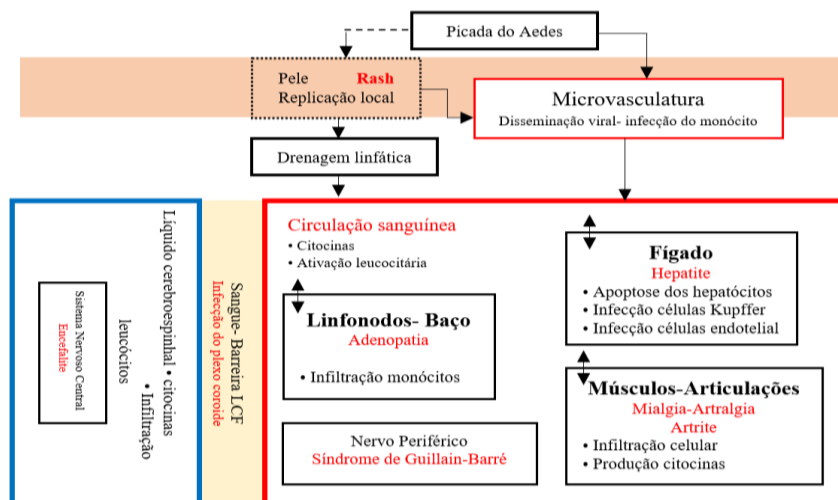
## **2.4 Fisiopatologia da Febre Chikungunya**

### **2.4.1. Replicação Viral**

Após a transmissão pela picada da fêmea do mosquito, o CHIKV se replica na pele e depois se dissemina para as articulações, fígado e sistema linfático através da corrente

sanguínea, podendo acometer o sistema neurológico, principalmente o periférico (Figura 1). O período de incubação é de 2 a 4 dias, seguido por um início repentino de doença clínica sem fase prodrômica. Os sintomas habituais são febre alta, dor articular, mialgia, exantema maculopapular, fotofobia e rigidez articular, porém cerca de 15% podem apresentar uma doença silenciosa, sem manifestações clínicas (LEMANT, 2008; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; MADARIAGA et al., 2016; VAIRO et al., 2019).

**Figura 1. Disseminação do CHIKV nas células e órgãos**



(Adaptado de Dupuis-Maguiraga et al., 2012).

O processo de replicação viral na fase aguda pode ser bastante exuberante, podendo chegar a 108 partículas virais/ml gerando a liberação de vários Interferons tipo I (IFN I) e outras citocinas pró-inflamatórias (GANESAN; DUAN; REID, 2017). Estudos na epidemia das Ilhas Reunion demonstraram correlação positiva entre os níveis séricos da carga viral e concentração do IFN I, ressaltando o importante papel desta proteína no controle da infecção (SCHILTE et al., 2010; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012).

As principais células onde são realizadas esta replicação são as células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, em derivados de monócitos e macrófagos e mais raramente em miócitos (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). Posteriormente ocorre a disseminação viral através dos monócitos para vários órgãos, principalmente os músculos, articulações, fígado e cérebro (HER et al., 2010).

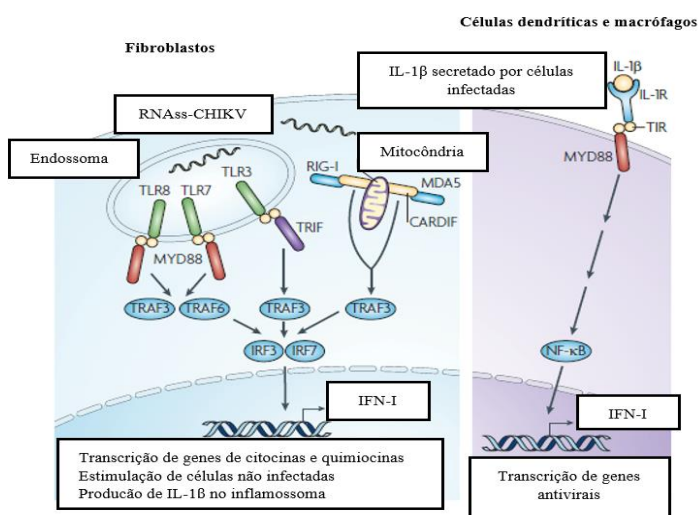
#### 2.4.2 Imunidade Inata

Com o intuito de impedir a replicação viral dá-se o início à imunidade inata: inicialmente através da barreira epitelial com a interação de enzimas, queratinócitos, fibroblastos e melanócitos, gerando um dos primeiros sintomas que é o exantema cutâneo. A seguir ocorre uma interação do vírus com as células não hematopoiéticas, principalmente as células dendríticas e fibroblastos que estimulará a produção de IFN I (ROSENHOFF et al., 2016).

A produção dos IFNs I é acionada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) estimulados por produtos antigênicos moleculares, os padrões moleculares (PAMPs). Dois tipos de PRRs foram identificados na FC: o receptor Toll-like (TLRs), que se encontra na membrana plasmática ou compartimento endossomal e o ácido retinoico, indutor gene I (RIG-I like) que fica no citoplasma. No CHIKV, os principais TLRs associados são o TLR3, TLR7 e TLR8 (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; ROSENHOFF et al., 2016).

A principal célula a ser ativada no controle da FC é a célula dendrítica (DC) que é estimulada pelo TLR7 a produzir IFN I. Estudos *in vitro* e *in vivo* vem demonstrando também que o CHIKV infecta primariamente os fibroblastos sendo regulada pelo CARDIF (adaptador CARD que induz IFN  $\beta$ ) (HER, SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Outra proteína regulatória nessa fase que é estimulada pelos TLRs é a MYD88 (proteína 88 de resposta primária de diferenciação mieloide), a qual seria responsável pelo estímulo na produção das citocinas pró-inflamatórias (SCHITILE et al., SCHWARTZ; ALBERT, 2010) (Figura 2).

**Figura 2. Imunidade Inata na infecção do CHIKV.**



Após a replicação viral ativa-se os receptores de reconhecimento tipo receptor Toll-like (TRL3, TRL7, TRL8) e retinóico. Esses receptores ativam uma cascata de sinalização que leva à ativação do IFN 1 e à transcrição de citocinas e quimiocinas. Evidências recentes sugerem que a ativação dos IFN nos fibroblastos é mediada pelo CARDIF. Nas células dendríticas também existem a produção de IL1- $\beta$ , cujo receptor é ativado pelo MYD88 estimulando as células NK a produzirem também os IFN tipo 1. (Adaptado de Schwartz; Albert, 2010).

A produção do INF I é crucial para o controle da imunidade antiviral, e de fato, modelos animais sem receptores para IFN I demonstraram ter uma doença bem mais severa (COUDERC, 2008). Altos níveis de IFN I (IFN  $\alpha$  e IFN $\beta$ ) foram detectados no plasma de pacientes na fase aguda da FC, nas epidemias da Ilha Reunion e Cingapura, com uma correlação positiva em relação à carga viral (ROOSENHOFF et al., 2016).

Após a produção dos IFN pelas células infectadas, os mesmos se ligam a receptores IFN (IFNAR), os quais vão estimular a transcrição de genes estimuladores por interferon (ISGs) pela via de sinalização JAK/STAT. Existem mais de 300 proteínas desse tipo no genoma humano, sendo que a maioria tem um papel desconhecido, porém existem algumas já bem caracterizadas no papel de defesa do hospedeiro, principalmente a SIN3, ISG15, ISG49, ISG54, ISG56, ZAP e SERPINS (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Na FC é descrito a importância de uma ISG, a 5 oligoadenil-sintetase 3 (5OAS3), a qual controlaria o processo de replicação viral (BREHIN, 2009). Outras proteínas já documentadas com importante papel no controle de outros alfavírus também são estudadas na FC, principalmente a proteína não estrutural 2 (nsP2), que age como inibidor da síntese de proteínas no hospedeiro, entretanto, com ação ainda desconhecida (BRAY et al., 2007).

Não se sabe o real papel dos monócitos na fase aguda, pois parece que não existe uma relação direta do nível de carga viral com a sua presença dentro dos monócitos. Foi demonstrado *in vitro*, que células como monócitos e linfócitos T e B não eram susceptíveis à infecção pelo CHIKV (SOURISSEAU, 2007). Em contraste, outro estudo também demonstrou uma associação positiva entre a carga viral e a presença dos monócitos (HER, 2010; MADARIAGA et al., 2016). Inclusive foi observado em modelo animal o uso de um inibidor de monócito, o Bindarit, o qual bloqueia o recrutamento dos monócitos e diminui a inflamação das articulações, todavia sem comprovação clínica (COUDERC; LECUIT, 2015).

Existem evidências da participação das células natural killer (NK) no controle da FC na fase aguda (COUDERC; LECUIT, 2015). No entanto, parece que essas células também contribuem para os mecanismos de infiltração sinovial da artrite crônica. (MAUCOURANT et al., 2019).

Na fase aguda ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, destacando-se a presença das seguintes: IFN- $\gamma$ , IL-1 RA, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , MCP-1/CCL2, MMP2, IP-10 e CXCL10 (TENG et al., 2015). Acredita-se que o TNF tenha um importante papel no efeito antiviral, e o seu bloqueio ao utilizar-se um inibidor do anti-TNF em um modelo animal contra

o alfavírus RRV desencadeou uma mortalidade de 100%. Por outro lado, o uso de agentes imunobiológicos como o infliximabe, inibidor do TNF, em pacientes com AR e com FC não é associado ao agravamento da doença (ZAID et al., 2011).

A participação das citocinas inflamatórias durante a fase aguda está intimamente relacionada com as manifestações clínicas, onde a presença de aumento de IL-1 $\beta$ , IL6, TNF- $\alpha$  está relacionada a febre, artralgia e severidade da doença. O IFN- $\gamma$ , aumenta a presença de prostaglandina e reabsorção óssea e osteoclastos, participando da artrite, e o aumento da IL1 e IL6 pode estar associada a gravidade da doença (TENG et al., 2015)

### **2.4.3 Imunidade Adaptativa**

O processo de imunidade adaptativa na FC tem a participação da imunidade celular e humoral. Pouco se sabe sobre o papel dos linfócitos na FC, no entanto, cerca de 80% dos pacientes infectados apresentam linfopenia. Acredita-se que isso seja um efeito secundário do IFN I levando à morte celular, já que o CHIKV não infecta diretamente os linfócitos B e T. Outra razão seria a migração dos linfócitos para os tecidos mediada por quimiocinas estimuladas pelo IFN I, principalmente a CXCL10 e CCL5 (SCHWARTZ; ALBERT, 2010, TEO et al., 2013, POO et al., 2014).

Na imunidade celular contra o CHIKV, a principal ativação é dos Linfócitos T CD8 – MHC I, levando ao efeito citotóxico, cujo principal mecanismo é mediado por via liberação de granzimas e perforinas (POO et al., 2014). Contudo, observa-se também a ação das células efectoras Linfócitos T CD4 – MHC II. Acredita-se que a participação dos Linfócitos T CD4 é principalmente na resposta Th1, com a liberação de citocinas inflamatórias como o IFN- $\gamma$ , IL2, TNF- $\alpha$  e IL3. Estudos demonstram que a elevação da resposta Th1 e liberação de IFN- $\gamma$ , e IL12 está associada a dor crônica, e o aumento da resposta Th2, com aumento de IL4 e IL 10 estariam relacionados a remissão do quadro (POO et al., 2014, ROSENHOFF., et al 2016).

A imunidade humoral está bem presente relacionando-se à produção de anticorpos contra o CHIKV na sua fase extracelular. Os Anticorpos são neutralizantes sendo o IgM produzido a partir do 3º dia e persistindo por alguns meses e o IgG iniciando a partir do 10º dia e podendo persistir até anos. Há relatos de pacientes com cronificação que persistem o IgM (VAIRO et al., 2019).

### **2.4.4 Patogênese da Artrite Crônica**

A natureza crônica da doença é um desafio na fisiopatogênese, pois algo acontece na imunidade celular e humoral que deve ser compreendida para explicar a cronicidade articular em cerca de 45% dos pacientes. Mesmo com esse sistema de defesa robusto, pode ocorrer um processo de escape viral levando a cronicidade da artralgia. Foi demonstrado a permanência de RNA viral na sinóvia de pacientes após 18 meses de doença e que o mesmo pode estimular a produção de IFN em até 60 dias após a infecção, caracterizando os sintomas flutuantes da artrite decorrente do processo de replicação viral no tecido sinovial (HOARAU et al., 2010; ZAID et al., 2018). Alguns motivos para essa persistência viral seriam: Modulação genética dos macrófagos, Resistência a resposta do INF-1 e Ineficácia da Resposta Imune, sendo o macrófago, a principal célula responsável pelo escape viral (ROSENHOFF et al., 2016).

A presença das quimiocinas MCP-1/CCL2 promove um recrutamento de macrófagos, e o CHIKV parece conseguir modular o fenótipo do macrófago, impedindo uma imunidade eficiente, induzindo a produção de mais citocinas inflamatórias. (KUMAR et al., 2012; ROSENHOFF et al., 2016).

Outra hipótese para a persistência viral é a resistência a ação do IFN, pois nos estágios iniciais existe uma boa resposta, mas uma vez iniciado o processo de replicação, o vírus torna-se resistente. Observou-se que a proteína não estrutural (nsP2) do CHIKV é capaz de inibir a resposta do IFN bloqueando a sinalização do JAK/STAT (FROS et al., 2010).

Demonstra-se que na fase crônica existem a presença da atividade de citocinas próinflamatórias como IL-2R, IL-4, Eotaxina, MIG, MIP-1 $\alpha$ ; fatores regulatórios incluindo o fator de crescimento do hepatócito (HGF) e; fator estimulante da colônia de granulócitos (G-CSF) (TENG et al., 2015). Contudo, nos pacientes em remissão completa, os níveis da Eotaxina e HGF são maiores que nos pacientes crônicos, contribuindo com a hipótese de que a inibição macrofágica está associada a remissão da doença, pois tanto o HGF como a Eotaxina são citocinas Th2 que bloqueiam a quimiocina CCL2, levando conseqüentemente a redução da ação macrofágica. Outro aspecto é o aumento dos níveis de G-CSF nos pacientes crônicos, que por sua vez aumenta a atividade macrofágica, colaborando mais uma vez com a associação da atividade macrofágica e perpetuação do processo inflamatório articular (CHOW et al., 2009, TENG et al., 2015).

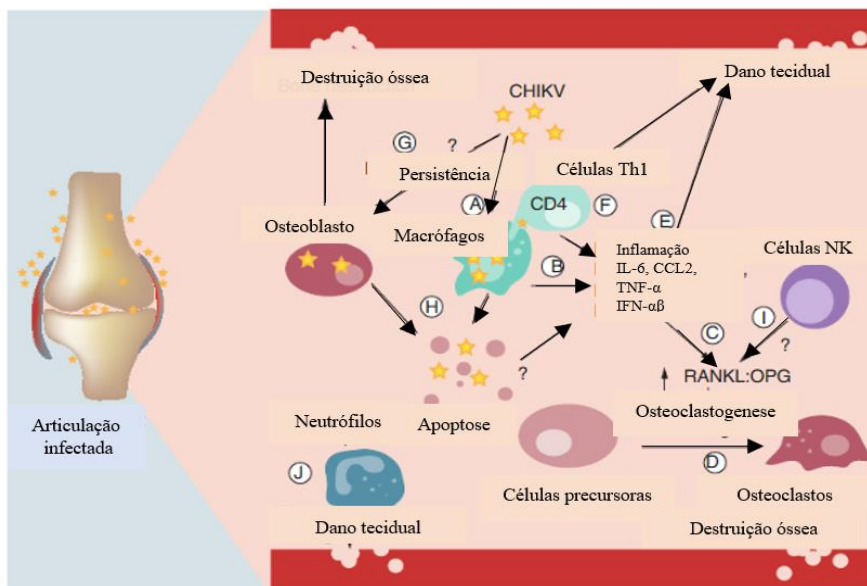
Nos pacientes crônicos foi detectado uma resposta Th1 maior na fase aguda do que naqueles que se recuperaram, inclusive com níveis maiores e persistentes de citocinas Th1

(IFN- $\gamma$  e IL12), diferentemente dos pacientes em remissão que apresentavam níveis mais elevados de citocinas Th2 (IL4 e IL10) (HOARAU et al., 2010).

As complicações articulares observadas na infecção pelo CHIKV variam de artralguas, mialgia, artrite, tenossinovite até destruição óssea. A prevalência para a cronicidade varia de acordo com a população estudada, podendo ser de 40% a 87%. Na grande epidemia da Ilha Reunion, em 2006, a cronicidade chegou a 69% (ARROYO-AVILA; VILA, 2015) e na América Latina, chegou a 47,6% (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2015). Em uma recente revisão sistemática de 38 artigos foi estimado uma prevalência de cronicidade de 43%, com sintomas persistentes em mais de 12 meses em 21% (PAIXÃO et al., 2018).

O CHIKV é capaz de agir em duas vias na patogênese da artrite: a Osteoclastogênese, ou seja, a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos que é mediada pelo equilíbrio entre o RANKL e a Osteoprotegerina e no processo de autoimunidade (PHUKLIA et al., 2013; ROSENHOFF et al., 2016). (Figura 3)

**Figura 3. Fisiopatologia da artrite crônica pelo CHIK**



(A) Persistência em macrófagos. (B) Produção sustentada de citocinas pró-inflamatórias (C) Aumento da proporção de RANKL: OPG e promove (D) osteoclastogênese que resulta em destruição óssea. (E) Dano direto do tecido saudável do hospedeiro. (F) A persistência de CHIKV também pode promover constitutivamente uma resposta Th1, onde as células T CD4 + podem afetar diretamente o tecido ou estimular a produção de fatores inflamatórios. (G) Além disso, o CHIKV poderia promover a persistência nos osteoblastos ou (H) induzindo a morte celular, o que estimula a inflamação. Finalmente, a infecção persistente por CHIKV poderia recrutar (I) células NK e (J) neutrófilos. (Adaptado de Roosenhoff et al., 2016).

A capacidade do CHIKV de afetar vários órgãos e sistemas pode ser por causa da predileção do vírus para infectar os fibroblastos, um tipo de célula presente no tecido conjuntivo, pele, sinóvia e periósteo. Os fibroblastos sinoviais infectados pelo CHIKV secretam RANKL, IL6, IL8 e CCL2 que podem estimular a osteoclastogênese. Estudos relatam que o CHIKV está presente nos osteoblastos e sinoviócitos e podem induzir a expressão do RANKL, aumentando assim a ação de reabsorção óssea dos osteoclastos, determinando a destruição óssea (PHUKLIA et al., 2013; ROSENHOFF., et al 2016).

Assim como ocorre na AR, a infecção pelo CHIKV recruta células para o ambiente sinovial pela ação das citocinas, principalmente os macrófagos, os quais levam a uma produção sustentada de citocinas pró-inflamatórias gerando a artralgia crônica. Na FC o processo imunológico estimula a resposta Th1, com liberação de citocinas inflamatórias que leva um aumento do RANKL ocasionando um desequilíbrio, promovendo a artrite. (ROSENHOFF et al., 2016) (Figura 3). As células Th1 que expressam TNF tem um potencial papel patogênico na Artrite Reumatoide (AR) que tem excelente resposta ao uso do Metotrexate; notavelmente este fármaco tem demonstrado algum benefício no tratamento da artrite induzida pelo CHIKV. (AMARAL; BILSBORROW; SCHOEN, 2018).

O papel da autoimunidade na cronicidade osteoarticular da FC não está claramente definido. Estudos feitos com outros vírus artrítogênicos demonstram que possivelmente a artrite nesses casos é decorrente da habilidade do vírus de se reproduzir e mediar dano tissular na articulação, que é dependente da resposta imune do hospedeiro (RULLI et al., 2007, TANAY, 2017). O papel da resposta Th17 vem sendo relacionado a autoimunidade, a destruição óssea e a remodelação, pois ao destruir a matriz óssea, induz a liberação de IL6 e GNM-CSF, que está aumentada na resposta Th1 (AMARAL et al., 2019). Há relatos do surgimento de doenças autoimune reumatológicas e a infecção por CHIKV, dentre elas destacam-se a AR, as Espondiloartrites (EpAs) e a AP (INAMADAR et al., 2008; JAVELLE et al., 2015). A presença de anticorpos reumatológicos como o Fator Reumatoide (FR), FAN e Anticitrulinados (AntiCCP) são vistos em alguns trabalhos, mas não há referência de associação com a patogênese da artrite crônica (SIMON et al., 2015).

## **2.5 Manifestações Clínicas**

A FC é caracterizada por um início súbito de febre alta (39°C) acompanhada de artralgia moderada à grave. Outros sinais e sintomas podem estar presentes como: cefaleia, mialgia,

náuseas, vômitos, poliartrite, exantema e conjuntivite (PAHO, 2016). Sua evolução ocorre em três fases: aguda, com duração de 07 a 14 dias; subaguda, com duração de até 03 meses e; crônica, com persistência dos sintomas por mais de 03 meses (MARQUES et al., 2017; SUHRBIER, 2019).

### **2.5.1 Fase Aguda ou Febril**

Geralmente a infecção aguda é sintomática em 80% a 97% dos pacientes, sendo os sintomas mais comuns a febre de início súbito, artralgia e/ou artrite (praticamente em 100% dos casos), comumente de padrão simétrico e poliarticular e exantema macular/maculopapular (34% a 50%), com ou sem prurido cutâneo. As queixas articulares acometem sobretudo mãos, punhos, joelhos, tornozelos e pés, e na maioria das vezes são de caráter incapacitante, e podem estar associadas à tenossinovite. A febre pode ser contínua, intermitente ou bifásica, possui curta duração, porém a queda da temperatura não é associada à piora dos sintomas como na dengue (STAIKOWSKY et al., 2009; MARQUES et al., 2017; PATHAK et al., 2019).

O exantema geralmente macular ou maculopapular, acomete cerca da metade dos doentes e surge do 2º ao 5º dia após o início da febre. Atinge principalmente o tronco e as extremidades (incluindo palmas e plantas), podendo atingir a face. O prurido está presente em 25% dos casos e pode ser generalizado ou localizado na região palmo-plantar (JAVELE et al., 2015; SUHRBIER, 2019). Outras manifestações cutâneas também têm sido relatadas como dermatite esfoliativa, lesões vesicobolhosas, hiperpigmentação, fotossensibilidade, eritema nodoso e úlceras orais. Em recém-nascidos (RNs) e lactentes, as lesões vesicobolhosas são as manifestações dermatológicas mais frequentes (BESERRA et al.; FARIAS; PIRES NETO; LEITE, 2019).

Outras manifestações menos frequentes podem incluir astenia, mialgia (60% a 93%), cefaleia (40% a 81%), náuseas/vômitos, diarreia, fotofobia, dor retro orbital, conjuntivite, dor axial, edema de face e extremidades e linfadenopatia cervical ou generalizada (STAIKOWSKY et al., 2009; SUHRBIER, 2019) (Quadro 1).

**Quadro 1: Frequência dos sintomas da FC na fase aguda.**

SINAIS OU SINTOMAS	FAIXA DE FREQUÊNCIA (% DE PACIENTES SINTOMÁTICOS)
Febre	80-100
Poliartralgia	80-100
Cefaleia	30-90
Mialgia	10-85
Fadiga	43-67
Diarreia	25
Vômitos	4-59
Exantema	36-88
Poliartrite	62-100
Conjuntivite	3-56
Edema	22-39

(Adaptado de Staikwosky et al., 2009; Suhrbier, 2019)

A forma grave da infecção aguda da FC tem sido observada em diferentes grupos etários, mas principalmente em pacientes idosos e RNs. Essa forma envolve geralmente o sistema nervoso central, respiratório, urinário e cardíaco. De forma geral a mortalidade nessa fase está ligada à descompensação de doença crônica pré-existente, particularmente cardiovascular, respiratória, renal e doença autoimune (RENAULT et al., 2007). A taxa de mortalidade varia de acordo com a região estudada. Há referências de 0,09% no Brasil e 0,7% na República Dominicana (SUHRBIER; VAIRO et al., 2019; FRUTUOSO et al., 2020).

### 2.5.2 Fase Subaguda

A FC é autolimitada e os sintomas da fase aguda se resolvem em 01 a 02 semanas, porém quando existe a persistência dos sintomas o paciente entra na fase subaguda. Esta fase começa do 14º dia até 03 meses. Nesta fase, predominam os sintomas articulares que ocorrem em até 50% dos casos e caracteriza-se pela persistência da artralgia/artrite, bursite, tenossinovite, associadas a rigidez matinal e astenia, com evolução contínua ou intermitente (PATHAK et al., 2019; BRITO et al., 2020).

Durante essa fase um conjunto de manifestações clínicas não específicas podem ocorrer, como: fadiga crônica, hipo ou hipercromia, alopecia, descompensação de doenças endócrinas e metabólicas, descompensação de outras doenças crônicas preexistentes, tais como hipertensão arterial sistêmica (HAS), depressão e ansiedade; podendo ser uma fase de risco para elevação da mortalidade do paciente. Observa-se também nesse período o aparecimento de sintomas neurológicos como a Síndrome do Túnel do Carpo e depressão. (SIMON et al., 2015; BRITO et al., 2020). Se os sintomas persistirem por mais de três meses, após o início da doença, estará instalada a fase crônica.

### 2.5.3 Fase Crônica

Os sintomas osteoarticulares se dividem em três tipos: as manifestações reumatológicas não inflamatórias, caracterizado pelas tenossinovites, artralguas, patologias de coluna, fibromialgia e bursite; as autoimunes, com o surgimento de doenças autoimunes e; a doença articular inflamatória crônica (DAIC) que é uma artrite inflamatória indiferenciada que não preenche critérios para outras doenças autoimunes (Figura 4). Muitas vezes é difícil separá-las, pois elas geralmente se superpõem. (ARROYO-AVILA; VILA, JAVELLE et al., 2015, MARQUES et al., 2017, BRITO et al., 2020).

**Figura 4: Critério de classificação de doença articular inflamatória crônica (DAIC)**

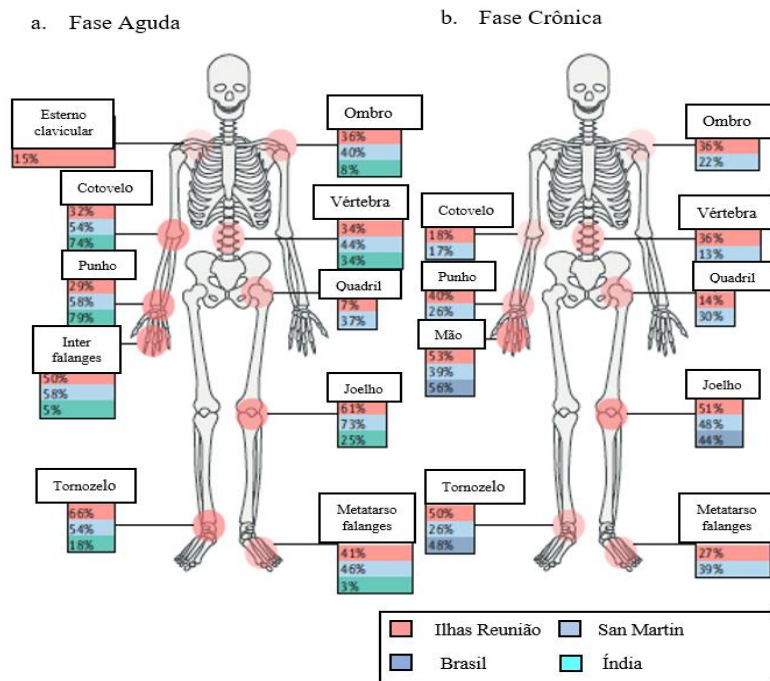
<p>Critérios de classificação de doença articular inflamatória crônica (DAIC) pós-chikungunya</p> <p>&gt; 4 articulações com artrite + duração dos sintomas <math>\geq</math> 6 semanas + ausência de diagnóstico alternativo</p> <p>A. Artrite = 1 critério inflamatório</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinovite <sup>a</sup></li> <li>• Calor e/ou eritema sobre a articulação</li> <li>• Rigidez matinal &gt; 30 minutos</li> <li>• Dor inflamatória – melhora com o exercício e piora com o repouso ou durante a noite</li> </ul> <p>B. Não preenche os critérios de artrite reumatoide ou espondiloartrite, além da eliminação DE outras causas de poliartrite: gota, doenças autoimunes, disfunção da tireoide, hepatite viral crônica, sarcoidose, etc.</p> <p><sup>a</sup> Diferenciar de edema articular sem sinovite</p>
--

(Adaptado de Marques et al., 2017).

Uma metanálise avaliou a prevalência de (DAIC) pós-chikungunya (pós-chik), em 18 estudos selecionados (nove coortes retrospectivas e prospectivas), com 5.702 pacientes. O tempo médio de acompanhamento foi de 17,5 meses e a prevalência da DAIC pós-chik variou de 25,3% a 40,2% (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2016).

Normalmente o padrão de comprometimento articular crônico é de caráter recidivante (60% a 80%), mas pode ser persistente (20% a 40%). A artralgia se apresenta de forma oligo ou poliarticular, de intensidade variável, geralmente simétrica com predomínio em punhos, mãos, tornozelos e joelhos, associadas a edema articular e rigidez matinal e geralmente envolve as mesmas articulações acometidas na fase aguda (SUHRBIER, 2019). (Figura 5)

**Figura 5. Tipo de articulações acometidas em diferentes**



(Adaptado de Suhrbier, 2019.)

Há uma possível associação da cronicidade articular e alguns fatores de risco sendo os principais: sexo feminino, idade acima de 45 anos, envolvimento articular proeminente na fase aguda (edema e rigidez articulares, poliartrite, tenossinovite), (ESSACKJEE et al., 2013; RODRIGUES-MORALES et al., 2016) diagnóstico de doença articular prévia, como osteoartrite (OA), e presença de comorbidades, como diabetes mellitus (DM) (STAIKOWSKY et al., 2009; THIBERVILLE et al., 2013; PATHAK et al., 2019). Do ponto de vista laboratorial, são considerados como preditores de cronicidade os níveis elevados de proteína C reativa (PCR) e de sorologia para CHIKV IgG. A persistência de CHIKV IgM além da fase aguda está associada com artrite erosiva e cronificação dos sintomas articulares (MARQUES et al., 2016).

Existem relatos do desenvolvimento de doenças reumáticas autoimunes crônicas pós-infecção pelo CHIKV. As séries de casos publicadas demonstram que alguns pacientes durante a fase crônica preencheram critérios para AR e EpAs, além da exacerbação de psoríase cutânea e deflagração dessa doença após surto de FC (HORCADA et al., 2015; RODRIGUEZ-MORALES et al., 2015). Estudo retrospectivo realizado nas Ilhas Reunion (França) com 159 pacientes com infecção por Chikungunya e acompanhados durante 06 anos mostrou que 40 (25%) pacientes preencheram critérios para diagnóstico de (AR), 33 (20,7%) desenvolveram

(EpAs) e 21 (13,2%) poliartrite indiferenciada (JAVELLE et al., 2015). Estudo realizado na Índia acompanhando 203 pacientes por 10 meses encontrou taxa de 16,7% de pacientes evoluindo para AR (MANIMUNDA et al., 2010).

Com relação as EpAs, existem alguns relatos da sua associação com a infecção pelo CHIKV. O estudo realizado nas ilhas Reunion com os 159 pacientes detectou 33 casos de Espondilite Anquilosante (EA) (20,7%), sendo 15 pacientes com artropatia psoriática e somente 02 positivos para HLA-B27 (JAVELLE et al., 2015). Outras duas coortes da Índia identificaram padrões de AP, sem psoríase, com sinais de artrite destrutiva, reabsorção óssea e condrólise (MATHEW et al., 2011; CHOPRA et al., 2012).

Outras doenças autoimunes apresentam relação com a FC, porém sem grande evidência estabelecida. Existem relato de dois casos de pacientes já com diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) que desenvolveram síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAAF) catastrófica pós-Chikungunya (BETANCUR et al., 2016). Um abstract do American College of Rheumatology mostrou reativação da doença em 10,7% dos pacientes que já tinham o diagnóstico prévio de LES (56 avaliados) e casos graves como encefalopatia e lesões bolhosas em 7%, independente da gravidade de doença e uso de imunossupressores (BASTIEN, 2015). Na avaliação retrospectiva de 167 pacientes com LES na Martinica foram registradas manifestações graves da FC: quatro pacientes com encefalopatia, três com lesões cutâneas bolhosas, um com acometimento renal e um com falência de múltiplos órgãos que levou a óbito (BIGEARD et al., 2015). No entanto, não existem informações suficientes para definir se o risco de manifestações atípicas/complicações graves é maior nessa população específica.

Similar às outras doenças virais, tais como a hepatite C, a FC tem sido associado com alta prevalência de crioglobulinemia mista. Estudo com pacientes com infecção por CHIKV que haviam retornado das ilhas do Oceano Índico apresentaram positividade para crioglobulinas, pelo menos uma vez, em 94% dos casos durante um período de acompanhamento de 14 meses. A presença de crioglobulinemia coincidiu com persistente artralguas, mas não se associou com púrpura palpável ou outra manifestação de vasculite de pequenos vasos (OLIVER et al., 2009). Em relação a outras vasculites, há um caso descrito na literatura de uma criança com infecção de CHIKV mimetizando a Doença de Kawasaki (LEE et al., 2010).

Algumas complicações oftalmológicas podem ser observadas na FC, principalmente na fase aguda, como a conjuntivite, iridociclite, retinite, uveíte, geralmente, autolimitadas. A

presença de uveíte, também pode ser observada no período subagudo e crônico, podendo ser anterior ou posterior, uni ou bilateral (JAVELLE et al., 2014).

Outro aspecto a ser considerado é a presença da FC em pacientes portadores de doenças reumatológicas crônicas. Em pacientes com doenças crônicas como OA, tendinopatias, lombalgia e síndrome do túnel do carpo, é descrita uma exacerbação das queixas álgicas nos locais previamente acometidos (MANIMUNDA et al., 2010; JAVELLE et al., 2015). Já nos pacientes com doença autoimune prévia como na AR e EpAs, se a doença estiver controlada, parece que o uso concomitante das Drogas modificadoras de doença (DMCDs) e imunobiológicos na vigência da infecção pelo CHIKV, pode ter um efeito protetor com menos manifestações clínicas (BLETTY et al., 2016).

## 2.6 Manifestações Atípicas

Apesar da FC ser considerada uma doença de caráter benigno, cuja principal complicação é o comprometimento osteoarticular, muitas vezes incapacitante, também há relatos de manifestações atípicas de elevada morbidade. Os quadros graves são raros com uma frequência de 0,3%, e estão associados à idade avançada (> 65 anos) e à presença de comorbidades. Evidências demonstram que o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) antes da internação, HAS e doenças cardiovasculares são fatores independentes associados ao aumento da mortalidade (RAJAPAKSE et al., 2010; CROSBY et al., 2016; DEEBA et al., 2019).

As principais manifestações atípicas relatadas são: neurológicas, cardiovasculares, dermatológicas, renais, oculares, transmissão vertical e outras. (Quadro 2)

**Quadro 2: Formas atípicas da Febre Chikungunya**

SISTEMAS/ÓRGÃOS	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ATÍPICAS
Nervoso	Meningoencefalite, encefalite, encefalopatia, convulsão, neuropatia, síndrome cerebelar, síndrome de Guillan Barré
Cardiovascular	Miocardite, pericardite, arritmia, instabilidade hemodinâmica
Renal	Nefrite, insuficiência renal
Cutâneo	Hiperpigmentação, dermatoses vesicobolhosas, ulcerações aftosas, exantema maculopapular, úlceras penianas e escrotais
Ocular	Neurite óptica, iridociclite, retinite, uveíte
Transmissão vertical	Morte fetal, meningoencefalite, CIVD
Outros	Discrasia sanguínea, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, insuficiência adrenal, SIADH

(Adaptado de Rajapakse et al., 2010.)

## 2.7 Diagnóstico

A FC é diagnosticada com base em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, como pode ser visto na figura 6. Uma doença febril de início agudo e grave artralgia ou artrite, não explicada por outra condição médica, é considerada um caso suspeito de FC. Se o paciente tiver morado ou visitado áreas em epidemia, torna-se um caso provável. Mas a confirmação laboratorial através do isolamento viral ou sorologia é necessário para se tornar um caso confirmado (MARQUES et al., 2017).

**Figura 6: Definição de caso de Febre Chikungunya (Marques et al., 2017)**

<b>Definição de caso de Febre Chikungunya</b>
<p>Critérios clínicos: início abrupto de febre &gt; 38,5°C e artralgia/artrite intensa de início agudo não explicada por outras condições médicas</p> <p>Critérios epidemiológicos: indivíduo reside ou visitou área endêmica ou epidêmica no prazo de 15 dias antes do início de sintomas ou tem vínculo epidemiológico com caso confirmado</p> <p>Critérios laboratoriais</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Isolamento do CHIKV por cultura</li> <li>• Presença de RNA do CHIKV avaliada PCR em tempo real</li> <li>• Presença de anticorpos IgM específicos para CHIKV</li> <li>• Aumento de 4 vezes nos valores IgG específicos para CHIKV em amostras recolhidas, pelo menos com 10-14 dias de intervalo.</li> <li>• Detecção de anticorpos neutralizantes contra CHIKV por PRNT em soro</li> </ul> <p>Classificação</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Caso suspeito: o paciente apresenta critérios clínicos e epidemiológicos</li> <li>- Caso confirmado: quando um caso suspeito apresenta pelo menos um dos critérios laboratoriais</li> <li>- Caso atípico: quando há confirmação laboratorial em pacientes com outras manifestações (neurológicas, cardíacas, oftalmológicas, dermatológicas, renais, respiratórias, etc.)</li> </ul>
<p>CHIKV: vírus Chikungunya; PCR em tempo real: real time polymerase chain reaction; PRNT: teste de neutralização por redução de placa; RNA: ácido ribonucleico.)</p>

(Adaptado de Marques et al., 2017)

Dentre os achados laboratoriais destaca-se a linfopenia, e quando está menor que 1.000mm<sup>3</sup> está possivelmente associada à viremia. Outras alterações laboratoriais consistem em trombocitopenia, aumento de transaminases e hipocalcemia (WEAVER; LECUIR, 2015).

Para o diagnóstico confirmatório da infecção por CHIKV existem 03 (três) tipos de testes laboratoriais: 1- isolamento viral; 2- qRT-PCR e; 3- sorologia. Na fase aguda da doença o diagnóstico consiste na detecção do ácido nucléico viral em amostras de sangue por qRT-PCR, isolamento viral, ou detecção da resposta de anticorpos. Já nas fases subagudas e crônicas, o diagnóstico é confirmado normalmente pelos marcadores da resposta imune, as imunoglobulinas (BURT et al., 2012).

### 2.7.1 Isolamento Viral

O isolamento viral pode ser realizado em cultivo de células de linhagem de células de mosquito ou cultura de células de mamíferos, ou por inoculação intracerebral em ratos recém-nascidos. É uma técnica capaz de reproduzir em cultura celular o processo de replicação viral permitindo o seu isolamento. (PAHO, 2016). A positividade do isolamento viral é mais provável nos primeiros dois dias da doença devido a presença de anticorpos negativos que não são capazes de impedir o seu isolamento (BURT et al., 2012).

### **2.7.2 qRT-PCR**

Para a pesquisa do RNA viral uma das principais técnicas moleculares utilizadas é o qRT-PCR (Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative). Ela é uma técnica de biologia molecular empregada para obter-se amplificação exponencial de pequenas quantidades de DNA in vitro, empregando elementos do processo natural de replicação do DNA (HUGGETT et al., 2005).

Após início dos sintomas de FC, a carga viral pode rapidamente chegar a 10<sup>8</sup> cópias do genoma por mililitro de sangue, até no máximo 2,5 x 10<sup>8</sup> cópias por ml em neonatos. Durante os primeiros 5 dias de infecção, o genoma do vírus pode ser detectado no sangue pela qRT-PCR (figura 3). A reação da polimerase em cadeia em tempo real com ensaios fechados deve ser utilizada devido à sua maior sensibilidade e menor risco de contaminação (CDC, 2014).

### **2.7.3 Sorologia**

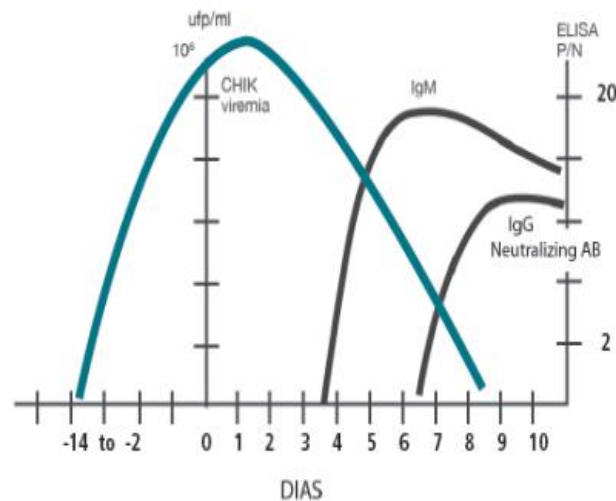
Para a pesquisa de anticorpos específicos, as principais técnicas disponíveis são: o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e o Teste Imunocromatográfico do tipo POC (Point-of-Care). Os testes sorológicos permitem a detecção de anticorpos específicos do tipo IgM, que podem ser detectados a partir do segundo dia após o aparecimento dos sintomas (sendo que o período mais indicado para essa investigação sorológica é a partir do 5º dia) e do tipo IgG, a partir do sexto dia, podendo persistir por anos até o resto da vida (WEAVER, LECUIT, 2015) (Figura 7).

O padrão da viremia e a resposta de anticorpos típicos de amostras de teste em vários intervalos de tempo são ilustradas no quadro 3.

**Quadro 3: Resultados de testes diagnósticos de acordo com tempo de doença**

Dias após início da doença	Teste de Vírus	Teste de Anticorpos
Dia 1-3	RT-PCR: positivo Isolamento: positivo	IgM: negativo PRNT: negativo
Dia 4-8	RT-PCR: positivo Isolamento: negativo	IgM: positivo PRNT: negativo
Dia > 8	RT-PCR: negativo Isolamento: negativo	IgM: positivo PRNT: positivo

PRNT: teste de neutralização por redução de placas\*Adaptado de OPAS 2011, CDC 2014.

**Figura 7: Curva de anticorpos anti-CHIKV e carga viral CHIKV**

(Adaptado de OPAS 2011, CDC 2014).

## 2.8 Diagnóstico Diferencial

O diagnóstico diferencial de FC é feito com outras doenças febris agudas associadas à artralgia. Atualmente, a dengue constitui o principal diagnóstico diferencial, porém outras doenças devem ser descartadas como: Malária, Leptospirose, Febre Reumática, Zika, Artrite Séptica e Mayaro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; PAHO/CDC. 2011). Outras causas de doença viral febril aguda, tais como adenovírus, enterovírus, sarampo, rubéola, parvovírus B19, também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial da FC, devendo ser levadas em consideração história de exposição e área geográfica do paciente, bem como relatos de viagens recentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; PAHO/CDC. 2011).

A Dengue e ZIKA são as principais arboviroses que requerem um diagnóstico diferencial. Embora muitos sintomas e sinais sejam similares, algumas manifestações são consideradas mais características nas doenças, o que pode auxiliar no diagnóstico diferencial

entre essas infecções. A presença de odinofagia, tosse, náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal, anorexia, taquicardia são mais comuns na dengue do que na FC. Além disso, na dengue, a febre costuma ser de menor intensidade, a erupção cutânea surge mais tardiamente (entre o quinto e sétimo dia de doença) e observa-se maior frequência de dor retro orbitária, trombocitopenia e neutropenia. Em relação à ZIKA, a febre geralmente é mais leve e pode até estar ausente; a artralgia e a mialgia não costumam ser debilitantes e a hiperemia conjuntival é comum e pode existir erupção cutânea, que também é pruriginosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; ALVARADO et al., 2019).

Entretanto, devemos também levar em consideração a possibilidade de coinfeção do CHIKV com ZIKV e/ou vírus da dengue (DENV), que pode ocorrer durante as epidemias de arboviroses. Em uma coorte na Venezuela demonstrou 7,6% de coinfeção de Dengue com CHIKV e 1,9% com tripla coinfeção (Dengue, ZIKA e CHIKV) (CARRILLO-HERNANDEZ et al., 2108). Nesses pacientes com infecção parece haver mais presença de trombocitopenia, exantema e artropatia mais severa que na Dengue isolada. Contudo, outros estudos relataram nenhuma exacerbação ou apresentações únicas associadas à coinfeção com os arbovírus mencionados (VILLAMIL-GÓMEZ et al., 2016).

## 2.9 Tratamento

### 2.9.1 Farmacológico

Não existe um tratamento específico para a FC com uso de um agente antiviral. Recomenda-se o tratamento sintomático e estadiamento clínico com o estabelecimento de grupos de risco e acompanhamento de manifestações atípicas e sinais de gravidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

**Na fase aguda** recomenda-se o tratamento sintomático e de suporte, com repouso, uso de antitérmico e analgésico, como dipirona e paracetamol, para alívio da febre e dor. Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) não devem ser utilizados na fase aguda devido ao risco de sangramento e lesão renal. Os corticoides também não são recomendados nessa fase devido ao risco de complicações (MINISTÉRIO DA SAÚDE; MARQUES et al., 2017). O tratamento da dor segue um protocolo baseado na EVA, na qual a intensidade da dor varia de 0 a 10. Cerca de 20% dos pacientes podem apresentar componente de dor neuropática associada à dor articular, que não responderá aos analgésicos habituais (PATHAK et al., 2019; BRITO et al., 2020).

**Nas fases subaguda e crônica** com a persistência dos sintomas álgicos articulares é necessário um planejamento terapêutico especializado. Os dados sobre terapêuticas específicas na artropatia por FC são limitados, pois os estudos publicados apresentam amostras pequenas, grupos de comparação heterogêneos, variabilidade de posologia, tempo curto de seguimento e diferenças na metodologia. Diante dessa necessidade, a Sociedade Brasileira de Reumatologia elaborou uma Recomendação para o Tratamento da FC destinada principalmente aos pacientes que evoluem para as fases subaguda e crônica (MARQUES et al., 2017).

As principais recomendações são as seguintes:

- a-** Na fase subaguda da FC podem ser usados AINEs e/ou medicações adjuvantes para tratamento da dor (anticonvulsivantes ou antidepressivos), nos casos refratários à analgésicos/opioides. Nos pacientes com dor musculoesquelética moderada à intensa ou naqueles com contraindicações ao uso dessas medicações, é recomendado o uso de prednisona ou prednisolona, na dose de até 20 mg/dia, devendo a redução ser feita de modo lento e gradual, de acordo com a resposta do paciente;
- b-** Na fase crônica da FC é recomendado o uso de analgésicos para alívio sintomático. Os opioides fracos (codeína e tramadol) podem ser usados nos sintomas álgicos refratários ou intensos;
- c-** Na fase crônica da FC são recomendados os AINEs, se foram observados o contexto clínico, as contraindicações e a resposta terapêutica;
- d-** Na fase crônica da FC, o corticosteroide por via oral pode ser usado para as queixas musculoesqueléticas e neuropáticas, sendo recomendadas doses baixas (5 a 20 mg/dia de prednisona ou prednisolona). O tempo de uso pode variar de seis a oito semanas, deve a retirada ser lenta e gradual pelo risco de recidiva dos sintomas articulares;
- e-** Na fase crônica da FC pode ser usado antimalárico, preferencialmente hidroxicloroquina, no tratamento dos sintomas articulares, de forma isolada ou em associação com metotrexate (MTX) ou sulfassalazina (SSZ);
- f-** Em pacientes com FC que evoluem para a fase crônica e apresentam quadro articular inflamatório na dificuldade da retirada do CE, sugerimos preferencialmente MTX, nas doses de 10 a 25 mg/semana;
- g-** Na fase crônica da FC pode ser usada a sulfassalazina, na dose de 2 a 3 g/dia, isolada ou em associação, especialmente em pacientes com contraindicação ou falha ao MTX;

- h-** Terapia biológica pode ser prescrita após avaliação do reumatologista em pacientes com quadro articular inflamatório crônico pós-infecção pelo CHIKV, refratário ao uso de CE e DMCDs, de acordo com as recomendações usadas para o tratamento da AR ou EpA;
- i-** Durante a fase aguda, nos pacientes em uso de DMCDs ou terapia biológica para tratamento de sua doença de base, recomenda-se a suspensão da medicação. No entanto, nas fases subaguda e crônica o tratamento pode ser mantido; e
- j-** São recomendadas intervenções de reabilitação em todas as fases da FC como medida não farmacológica complementar. Na fase aguda são indicadas condutas analgésicas e anti-inflamatórias, devendo ser evitado o uso de calor; adicionalmente devem ser recomendadas educação do paciente, orientações posturais e terapia manual, além de exercícios de leve intensidade. Nas fases subaguda e crônica, manter recomendações anteriores, podendo ser incluído calor, além de exercícios ativos livres, resistidos, proprioceptivos e aeróbicos, alongamento, terapia manual e fisioterapia aquática.

Estudos longitudinais têm demonstrado elevado uso de analgésicos na fase crônica: 72% após 36 meses e 93% após 15 meses da febre Chikungunya. No entanto, apenas 34% dos pacientes demonstram estar satisfeitos com essa abordagem farmacológica. Assim, muitas vezes é necessário a associação de AINEs, corticosteroides, infiltração articular ou peritendínea, fisioterapia e uso de antidepressivos e anticonvulsivantes (SCHILTE et al., 2013).

Na presença de dor neuropática, os antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes são opções terapêuticas eficazes, porém podem ser associados com analgésicos para uma maior eficácia. Para melhor custo-benefício e redução dos efeitos adversos, recomenda-se o seu uso na menor dose e tempo possível (MARQUES et al., 2017; BRITO et al., 2020).

Existem ainda algumas controvérsias sobre a efetividade do uso do CE no tratamento da dor na FC, principalmente ao tempo de uso e posologia adequada. Todavia, a maior parte dos pacientes (em torno de 70%) com sintomas crônicos associados à FC usa CE por via oral, com bons índices de resposta clínica e altos níveis de satisfação. A diretriz francesa recomenda o uso de prednisona 10mg/dia por cinco dias e retirada ao longo de 10 dias para casos moderados; para casos graves, 0,5mg/kg/dia por cinco dias e redução da dose em 10 dias (SIMON et al., 2015). No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda 0,5mg/kg/dia (dose máxima 40mg/dia) até a resolução dos sintomas, com retirada gradual, mas sem ultrapassar três semanas de tratamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Na Coorte Chikbrasil houve prescrição de prednisona em 64% dos casos, com dose média de 15mg/dia e os dados observaram uma melhoria mais significativa na avaliação geral, número de articulações dolorosas e edemaciadas e de dor neuropática, além do maior número de recidivas com a retirada brusca da medicação (MARQUES et al., 2017).

Quanto aos DMCDs, as evidências existentes ainda são bem escassas. Sobre o uso de antimaláricos na fase crônica com sintomas refratários a analgésicos, os estudos demonstram uma resposta clínica pouco significativa. Sugere-se que a cloroquina altere o processo de endocitose do vírus, inibindo a entrada e circulação viral, porém não há grandes evidências científicas (KHAN et al., 2010). Um estudo indiano comparou um grupo de pacientes em uso de cloroquina (250mg/dia) com outro grupo com meloxicam (7,5mg/dia) durante 24 semanas. Embora a resposta tenha sido numericamente melhor no grupo com cloroquina, não houve diferença estatisticamente significativa na melhoria da EVA e número de articulações dolorosas (CHOPRA et al., 2014). Apesar das poucas evidências favoráveis referentes ao uso do antimalárico, a recomendação do grupo brasileiro se deve ao seu efeito benéfico secundário, particularmente como droga poupadora de corticoide (MARQUES et al., 2017; BRITO et al., 2020).

O uso do MTX é incluído em muitos estudos longitudinais de acompanhamento de pacientes na fase crônica da FC, embora a maioria deles seja de estudos abertos não controlados ou séries de casos. Nas Ilhas Reunion, dos 159 pacientes que desenvolveram doença reumática estabelecida pós-infecção pelo CHIKV, 77% receberam MTX (dose média semanal de 15mg). Após um período médio de 25 meses, houve resposta positiva ao MTX em 75% dos casos (JAVELLE et al., 2015). Recentemente realizou-se uma revisão sistemática sobre o uso em monoterapia ou terapia combinada do MTX na FC, demonstrando-se sua eficácia em índices de atividade articular (DAS 28), nível de dor (EVA) e qualidade de vida (HAQ) (AMARAL et al., 2019).

Existem poucos estudos que avaliam o uso de SSZ na fase crônica da FC, todos do tipo série de casos e sem uma descrição detalhada sobre a eficácia. O estudo de Ravindran et al. demonstrou uma boa resposta em apenas 12,5% de 16 pacientes que usaram SSZ como monoterapia na fase crônica da febre chikungunya. Quando associado a MTX, a resposta aumentou para 71,4%. Ressalta-se que todos os casos incluídos já tinham feito uso de HCQ (200mg/d) e AINEs (MARQUES et al., 2017).

A utilização da terapia biológica na FC é limitada. Existem alguns relatos de uso de anti-TNF em pacientes com sintomas articulares crônicos de FC, porém esse uso se reserva aos casos refratários ou com evolução para DAIC ou doença articular inflamatória autoimune. Na coorte da Martinica, seis pacientes (23,3%) precisaram usar anti-TNF após falha ao MTX, HCQ e CE, com boa resposta articular e sem eventos adversos (BURNIER et al., 2016). Na coorte das Ilhas Reunion, após seis anos de acompanhamento, foi prescrito anti-TNF em 12 (12,8%) dos 94 pacientes que desenvolveram doença reumática estabelecida, após falha ao MTX (JAVELLE et al., 2015).

Existem relatos de medicamentos experimentais para o tratamento da FC, porém todos em modelos animais, in vitro e em série de casos. O uso da fingolimode (um agonista do receptor 1-fosfato esfingosina) usado para tratamento da esclerose múltipla demonstrou em modelo animal que ao impedir a ação dos linfócitos diminuiria o efeito inflamatório do CHIKV (ZIEMSEN et al., 2019). A Ribavirina, um agente antiviral foi utilizado em uma pequena coorte demonstrando uma redução no edema e dor articular, mas sem relevância estatística (RAVICHANDRAN; MANIAN, 2008). Os derivados de fenotiazinas (clorpromazina, perfenazina, etopropazina, tietilperazina, tioridazina e metilazina) também demonstraram a capacidade de inibir a entrada de CHIKV na célula hospedeira, principalmente ao atravessar a barreira hematoencefálica (POHJALA et al., 2011).

### **2.9.2 Não Farmacológico**

O apoio psicológico é importante em todas as fases dessa doença como forma de aliviar o sofrimento trazido pelo estado de dor e edemas crônicos em consequência da cronicidade e incapacidade desenvolvidas nessa doença (AMARAL; BILSBORROW; SCHOEN, 2019).

A fisioterapia deve ser utilizada em todas as fases. Na fase aguda recomenda-se para o alívio da dor e a redução do edema, podendo contribuir para limitar a persistência desses sintomas e a evolução para os estágios subagudo e crônico da doença. A crioterapia é o principal recurso nessa fase ao favorecer a analgesia e ajudar a reduzir o edema local e a inflamação articular. A estimulação elétrica nervosa transcutânea (TENS) já bem demonstrada no alívio da dor nos pacientes com AR, também pode ser outro recurso útil para o alívio da dor. Os exercícios ativos podem ser orientados com intensidade leve para manutenção das funções articulares, porém, com cautela para não exacerbar os sintomas inflamatórios. (KUCUKDEVECI et al., 2013).

Nas fases subaguda e crônica outros recursos analgésicos também podem ser utilizados como a eletrotermofototerapia, tais como laser de baixa potência e ultrassom, por auxiliarem no controle dos sintomas em processos inflamatórios articulares e tendíneos. A realização de exercícios tanto passivos e ativos são os que mais apresentam benefícios em evidências científicas (MARQUES et al., 2017).

## **2.10 Vacinas**

Com o ressurgimento da FC em 2004, várias abordagens têm sido realizadas na descoberta de vacinas direcionadas ao CHIKV. Há pesquisas incluindo antígenos e vírus atenuados, partículas semelhantes a alfavírus, alfavírus quiméricos e DNA eletroporado. Até o momento 3 vacinas progrediram para ensaios clínicos, entretanto todas apresentaram um grande potencial de imunogenicidade, não evoluindo para produção comercial (THIBERVILLE et al., 2013; VAIRO et al., 2019).

## **2.11 Medidas Preventivas**

É necessário o controle individual com medidas preventivas como uso de roupas e repelentes ao inseto, além dos cuidados domiciliares no repositório das larvas. Ações governamentais como os agentes de endemias, vaporizadores, controle dos viajantes virêmicos e notificação dos casos suspeitos faz-se necessário para melhor controle e estabilização de um surto epidêmico da FC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, VAIRO et al., 2019).

## **2.12 Expressão Gênica**

A expressão gênica é um processo que abrange vários estágios, e foi definida por Lewin como um processo pelo qual a informação hereditária contida em um gene, é processada em um produto gênico (LEWIN, 2004). Estas informações podem ser definidas através de dois processos: a Transcrição, quando as informações que partem do DNA vão para o RNA e Tradução, quando se gera uma proteína a partir do RNA; assim, podemos defini-la como o processo pelo qual a informação codificada no DNA é interpretada pela célula gerando a síntese de proteínas (BRAY et al., 2009).

A transcrição é um processo complexo que envolve diversos eventos de regulação com a ação de proteínas que podem atuar como ativadoras ou repressoras da transcrição, as quais são denominados fatores de transcrição. Portanto, durante a regulação da expressão de um gene,

o que ocorre durante uma infecção viral, pode ocorrer regulação negativa (down-regulated) em que a proteína ligadora impede a transcrição, resultando em diminuição da expressão de um gene, gerando menos cópias de mRNA e menos proteínas; já na regulação positiva (up-regulated) a proteína ligadora promove a transcrição, o aumento da expressão do gene levando a mais cópias de mRNA e conseqüentemente o aumento da proteína correspondente (LODISH et al., 2014).

O objetivo da análise de expressão gênica é estimar um transcriptoma, ou seja, o conjunto de todos os transcritos expressos e a frequência na célula em um dado momento. A caracterização de perfis de expressão gênica de tecidos específicos, ou transcriptomas podem estabelecer relações entre transcritos e funções celulares em condições fisiológicas e fisiopatológicas para a compreensão das funções dos genes e a determinação da totalidade dos genes expressos em uma célula, a um pré-requisito para a compreensão de funções celulares (LODISH et al., 2014).

Várias tecnologias foram desenvolvidas para quantificar o transcriptoma, incluindo abordagens em hibridização com DNA marcado por fluorescência (microarrays), todavia, esses métodos apresentam algumas limitações. Para isso, as ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas para facilitar e agilizar essas análises, transformando dados em informações. Através das técnicas de exploração de dados, pode-se desenvolver aplicações para obter dos bancos de dados informações para investigação e formação do conhecimento (ZHAO et al., 2016).

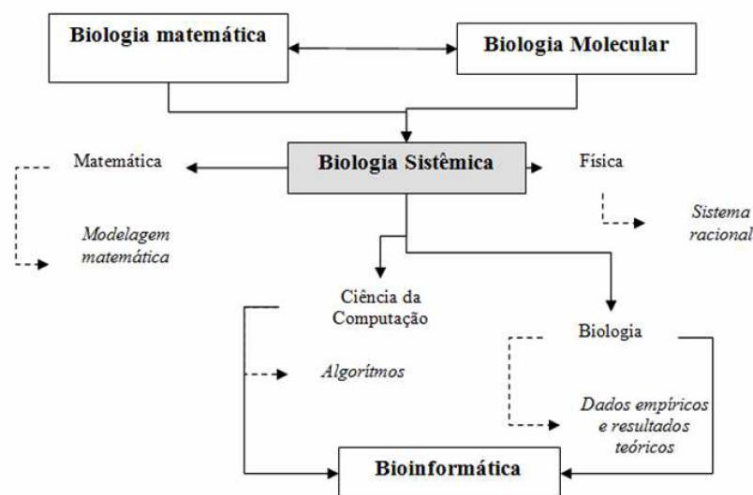
### **2.13 Biologia de Sistemas**

A Biologia de Sistemas é uma ciência interdisciplinar que converge áreas como a genética, biologia, matemática e a informática, a fim de analisar e interpretar dados, modelagem de fenômenos biológicos, e desenvolvimento de algoritmos e estatísticas (THAMPI, 2009; LI et al., 2015). Seu objetivo é procurar entender os organismos biológicos em todos os seus níveis, desde a caracterização de suas partes constituintes (genes, RNAs, proteínas, metabólitos), a elucidação das interconexões entre os distintos membros dessas redes de interações, até a compreensão do organismo como um todo (PIRES, 2015).

Atualmente, a Biologia de Sistemas vem se destacando como um campo inovador de pesquisa que combina medidas globais de expressão gênica e modelagem estatística e computacional visando entender e prever o comportamento de sistemas biológicos.

Particularmente, nas doenças infecciosas, ela tem o papel de estabelecer modelos matemáticos que expressam as alterações das reações imunológicas induzidas pelo agente infeccioso (KWISSA et al., 2015; OLIVEIRA; PFRIMER, 2019). Vários campos estão integrados na Biologia de Sistemas, o que vem auxiliando às ciências médicas, dentre eles destacamos a Bioinformática, Biologia Matemática e Biologia Molecular, como é observado na Figura 8 (PIRES, 2015).

**Figura 8. Campos de integração da Biologia de Sistemas**



(Adaptado de PIRES, 2015).

### 2.13.1 Bioinformática

O campo da bioinformática e biologia computacional passou por uma série de transformações nos últimos anos, estabelecendo-se como um componente-chave da nova biologia. Com a necessidade de criar, armazenar e comparar os dados de sequência de DNA, a bioinformática foi impulsionada formando banco de dados, tais como o GenBank e EMBL. Em 1988 foi criada a primeira organização do Genoma Humano (HUGO), sendo uma organização internacional de cientistas envolvidos no Projeto Genoma Humano. Em 1989, o primeiro mapa completo do genoma da bactéria *Haemophilus influenza* foi publicado. No ano seguinte, o Projeto Genoma Humano foi iniciado, e por volta de 1991, um total de 1.879 genes humanos foram mapeados (THAMP, 2009).

O Projeto Genoma Humano foi realizado com a primeira geração de sequenciamento, conhecida como sequenciamento Sanger (o método de terminação de cadeia), desenvolvido em

1975, por Edward Sanger, sendo considerado o padrão ouro para o sequenciamento de ácidos nucleicos. Entretanto, a procura por métodos de sequenciamento mais baratos e mais rápidos aumentou muito, impulsionando o desenvolvimento de métodos de sequenciamento de segunda geração “Next Generation Sequencing” (NGS) (HEATHER; CHAIN, 2016). As técnicas NGS trouxeram uma evidente revolução no campo da biologia. Determinaram a modernização das pesquisas, possibilitando a varredura e o sequenciamento de um genoma inteiro ou exoma ao nível de pares de bases, com uma baixa taxa de erro, em um intervalo de tempo aceitável e em um menor custo (PAVLOPOULOS et al., 2013). O RNA-seq é uma das técnicas mais recentes e inovadoras de NGS, que utiliza o método de *deep-sequencing* para o sequenciamento dos genomas (ZHAO et al., 2016).

### 2.13.2 RNA-seq

O RNA-Seq é uma abordagem que utiliza tecnologia de sequenciamento de 2ª geração para gerar o perfil do transcriptoma. É um método para sequenciamento de mRNA, gerando milhões de fragmentos de seqüências curtas em uma única corrida. Estes fragmentos chamados de reads são alinhados com o genoma ou transcriptoma de referência e serão usados para calcular níveis de expressão e identificar splicing alternativo (TRAPNELL et al., 2009; MARGUERAT; BÄHLER, 2010).

A técnica de RNA-Seq pode gerar centenas de milhões de transcritos utilizando o sequenciamento massivo. Em experimentos de RNA-seq, o nível de expressão de um transcrito é estimado a partir do número de leituras (reads) que são mapeados na transcrição. Esta técnica apresenta diversas vantagens sobre as tecnologias existentes, pois ao contrário de abordagens baseadas na hibridação como o microarray, o RNA-Seq não está limitado à detecção de transcritos já existentes nas sondas; outra característica é a sua elevada sensibilidade, que permite a detecção da expressão de transcritos de mais de um determinado tipo celular e de novos genes (LI et al., 2015).

### 2.13.3 RNA-seq e Chikungunya

Pouco se sabe sobre a análise do transcriptoma na FC, principalmente através da análise do RNA-seq nesta infecção. Um estudo em modelo animal simulando a FC na fase aguda e crônica foi realizado com o objetivo de identificar genes expressos nas diferentes fases da doença. Foi observado um alto nível da sobreposição de genes e vias regulatórias. A maioria

dos genes supra regulados foram relacionados à inflamação, sugerindo uma boa concordância na expressão gênica pró-inflamatória. Os principais genes supra regulados foram os ISGs, já descritos em outras infecções com efeitos antivirais, tais como o MX1, viperina, ISG15, e IFIT1 nas alfavirose. Dentre as principais proteínas sinalizadoras observadas destacam-se as IRF7, IRF3, USP18, STAT1, IRF1, IRF5, IRF8, Tmem731 (STING) e Trex1, algumas delas já estudadas em outras alfavirose como as IRF7, IRF3, enquanto outras não amplamente estudadas como as IRF1, IRF5, IRF8. Já nas quimiocinas ressalta-se o papel da CXCL10 (WILSON et al., 2017).

A análise de assinaturas moleculares foi realizada em uma coorte de 42 crianças infectadas pelo CHIKV, tanto na fase aguda como na crônica, sendo descrito cerca de 8.000 transcritos expressos diferencialmente. Os principais genes nessa diferenciação foram os EIF4B, XAF1, HERC6 ABCA1, IFI44L e IFI44. Da mesma forma foi observada uma concordância entre a regulação positiva do IRF7 durante a fase aguda, diferentemente do IRF3, semelhante aos modelos animais. Esses dados corroboram com a participação da modulação inflamatória pelos monócitos. Em relação à gravidade dos sintomas foi detectado uma relação com o complexo de histocompatibilidade humana (MHC), em particular no HLA-A, HLA-DMA e HLA-DMB, os quais estão relacionados à persistência viral e ao HLA-B, como uma forma menos grave (MICHLMAYR et al., 2018).

A participação de algumas proteínas classicamente associadas com atividades citolíticas e excretas por células T citotóxicas e NK foram descritas, como a presença a Granzima A, K, B (WILSON et al., 2017). Níveis aumentados da Granzima A já tinham sido observados em outras infecções virais e na Artrite Reumatoide (SPAENY-DEKKING et al., 1998; TAK et al., 1999) e em um modelo animal de primatas com CHIKV (GARDNER et al., 2015). Um estudo de uma pequena coorte de pacientes com FC também evidenciou aumento dos níveis da Granzima A (WILSON et al., 2017). Assim, sugere-se que esta proteína pode ser um mediador pró-inflamatório essencial durante a artrite na FC; o qual pode ser mediado pela liberação da IL-1 $\beta$ . Recentemente, foi realizado um estudo com a utilização de um fármaco anti IL-1 (Anakinra) que diminuiu os efeitos artríticos em modelo animal (LE et al., 2016).

Assim devido às incertezas e lacunas no conhecimento sobre a evolução clínica, fatores associados à cronicidade e características moleculares tanto do diagnóstico como na análise dos transcritos que envolvem a FC; é importante a realização deste estudo na contribuição científica e clínica desses pacientes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Avaliar os aspectos clínicos, laboratoriais e transcritos nos pacientes com Febre Chikungunya.

#### **3.2 Objetivos Específicos:**

- a) Avaliar as diferenças clínicas e laboratoriais na fase aguda e crônica da doença;
- b) Avaliar a evolução dos pacientes com Febre Chikungunya;
- c) Caracterizar o comportamento da cronicidade osteoarticular ao longo do tempo e fatores associados; e
- d) Estudar os transcriptos expressos na fase aguda e crônica da doença e identificar possíveis marcadores e os mecanismos moleculares relacionados à cronicidade da artralgia.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Campo do Estudo

Foi realizado um estudo de coorte, em pacientes portadores de FC, acompanhados no ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU-UFS).

### 4.2 Amostra

A amostra foi não aleatória e consecutiva, onde durante um período de 12 (doze) meses foram incluídos todos os pacientes atendidos com suspeitas de arboviroses, sendo observados tanto o critério clínico como o epidemiológico:

**Critério Clínico:** Febre de início súbito maior de 38,5°C e artralgia ou artrite intensa com início agudo, não explicada por outras condições, podendo estar associados à cefaleia, mialgia e exantema.

**Critério Epidemiológico:** residir ou visitar áreas endêmicas ou epidêmicas até 02 (duas) semanas antes do início dos sintomas; ou residir ou ter visitado, durante o período de transmissão/viremia, áreas onde há registros de casos suspeitos ou confirmados.

A amostra inicial constou de casos suspeitos de arboviroses, mas para seguimento era necessário que o caso suspeito fosse confirmado por um exame laboratorial, seja o molecular ou sorológico para FC.

### 4.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

#### 4.3.1 Critérios de Inclusão

##### a) Fase aguda:

- Pacientes com critérios clínicos ou epidemiológicos para arbovirose com tempo de evolução de até 14 dias.
- Pacientes com exame laboratorial confirmatório, seja sorologia ou qRT-PCR CHIKV.

##### b) Fase crônica:

- Paciente com dor articular associada ou não a edema articular ou periarticular de início ou piora significativa (nos casos de doença articular prévia) posterior à síndrome febril aguda, com evolução > 3 meses.

- Pacientes com exame laboratorial confirmatório, seja sorologia ou qRT-PCR CHIKV

#### 4.3.2 Critérios de Exclusão

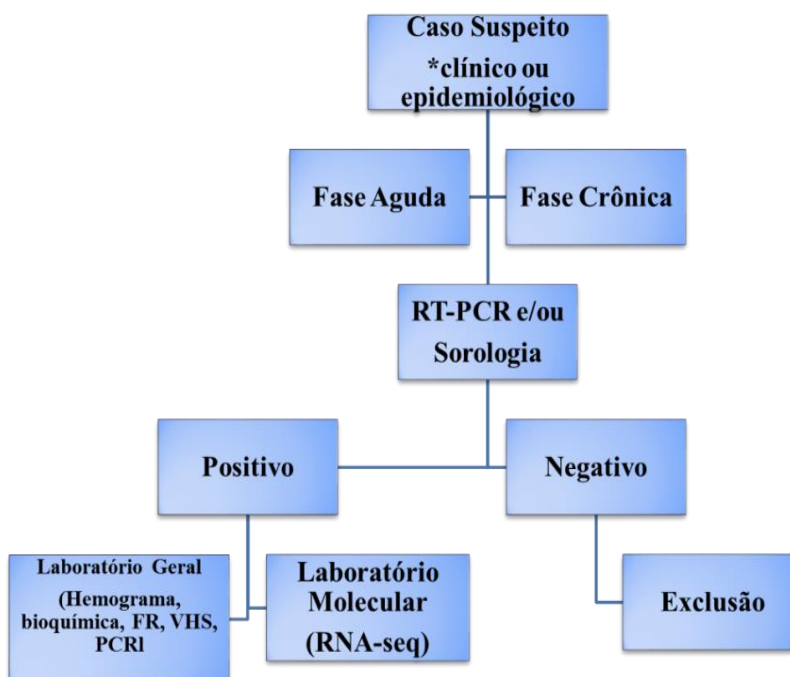
- Não consentimento em participar do estudo.
- Presença de coinfeção com outras arboviroses

#### 4.4 Captação de Amostras

Os pacientes da fase aguda foram selecionados por busca ativa nos municípios com epidemia de Chikungunya, de janeiro de 2016 a janeiro de 2017, onde realizaram o preenchimento de questionário e coleta de exame de sangue periférico para confirmação laboratorial (Apêndice B). Os pacientes foram selecionados em hospitais de urgência, unidades básicas e nos ambulatórios de Reumatologia do Hospital Universitário (HU) (Gráfico 1).

Os pacientes da fase crônica foram compostos pelos pacientes agudos que cronificaram e por demanda espontânea dos pacientes nos ambulatórios de Reumatologia do HU. Os pacientes crônicos que não tinham o exame laboratorial confirmatório foram encaminhados para a realização no laboratório do HU ou LACEN. (Figura 9)

Gráfico 1: Fluxograma de critérios de inclusão e exclusão de Febre Chikungunya

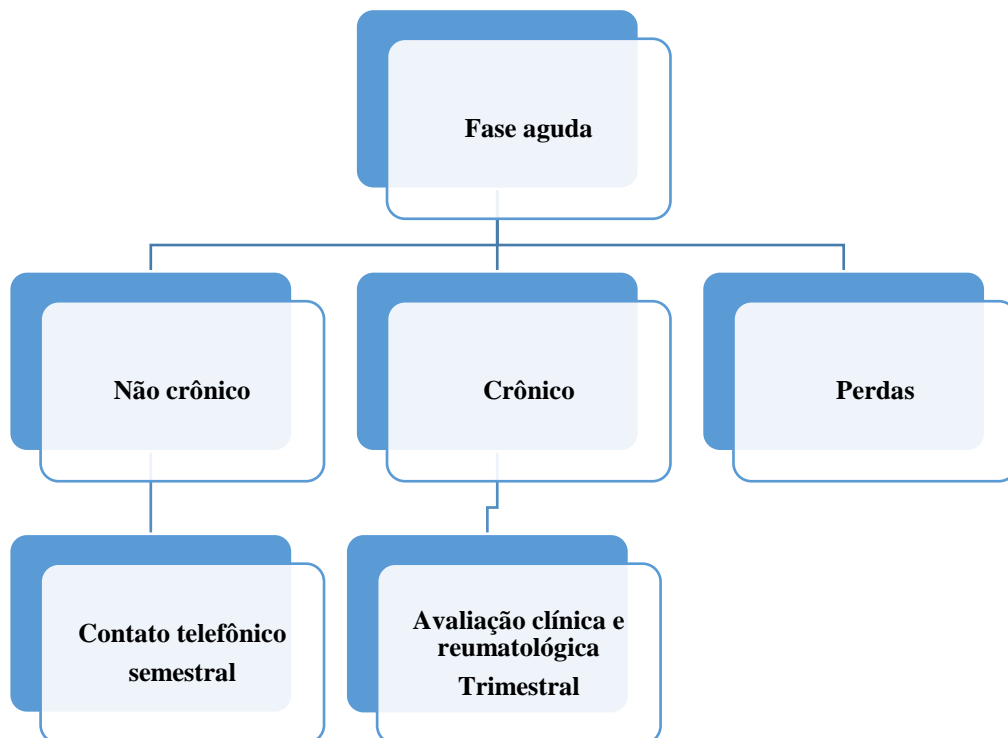


#### 4.5 Acompanhamento e coleta de dados

Após inclusão no trabalho, os pacientes foram contactados por telefone pela pesquisadora, e aqueles que persistiram com quadro articular, e se enquadraram na fase crônica, foram encaminhados para acompanhamento no ambulatório de Reumatologia do HU/UFS. Esse acompanhamento foi realizado de forma presencial trimestralmente pela mesma pesquisadora durante 24 meses. Os pacientes que já chegaram na fase crônica, após serem confirmados laboratorialmente, também foram encaminhados para o seguimento ambulatorial. Foram submetidos ao preenchimento de um questionário, com avaliação reumatológica e encaminhados para a realização de exames laboratoriais (Apêndices C e D). Quando necessário, a depender da manifestação clínica, foram solicitados exames radiológicos ou ultrassonográficos.

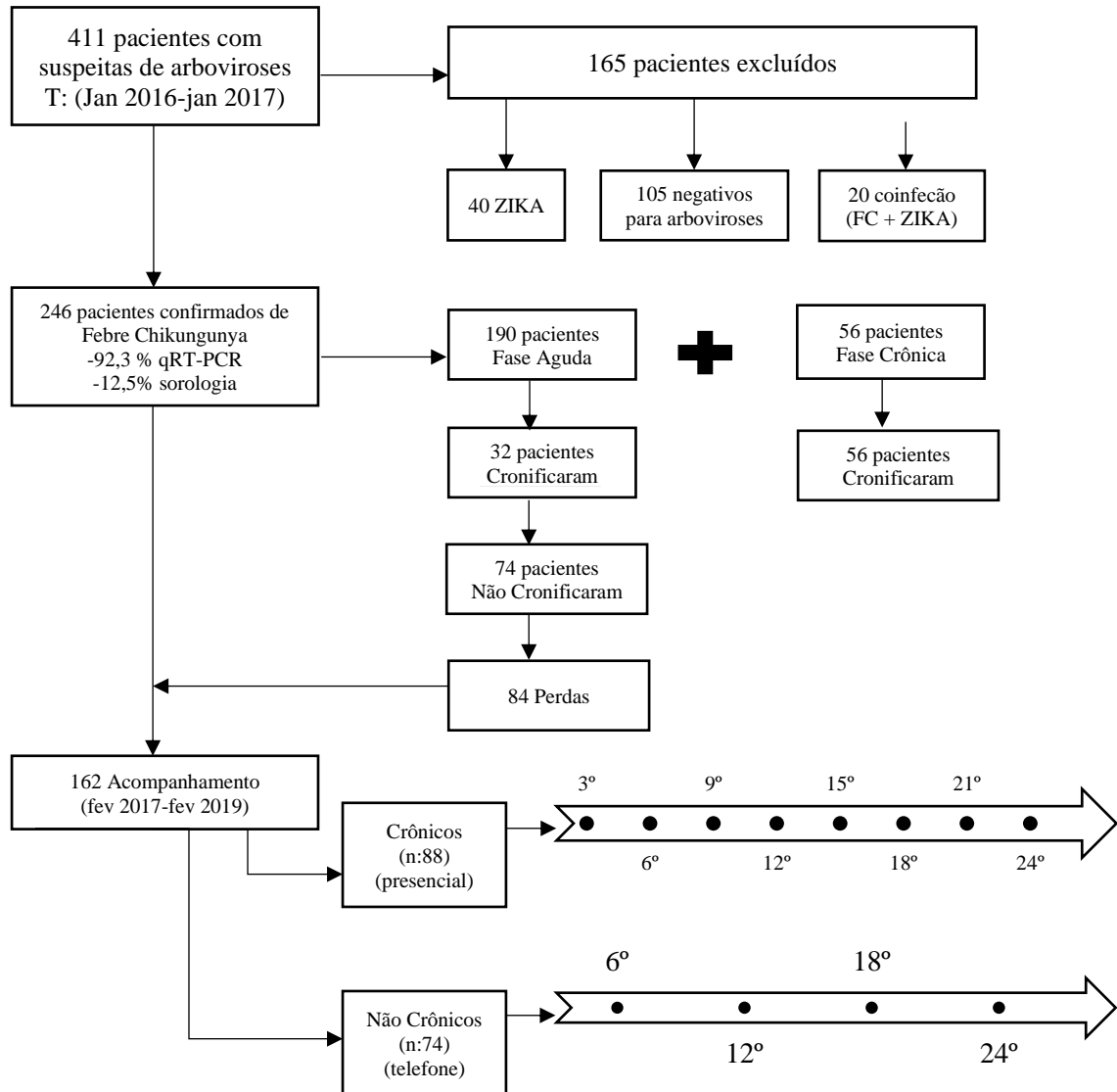
Os pacientes que não cronificaram foram acompanhados semestralmente pela pesquisadora por telefone, a fim de observar sua evolução. Foram considerados perdas, os pacientes que não conseguiram ser contactados (Gráfico 2).

Gráfico 2. Fluxograma de evolução clínica dos pacientes com febre Chikungunya



A figura 9 apresenta o fluxograma e linha do tempo dos pacientes inseridos na pesquisa e sua evolução.

**Figura 9: Fluxograma e linha do tempo dos pacientes com Febre Chikungunya**



#### 4.6 Variáveis Estudadas

As variáveis clínicas, epidemiológicas e laboratoriais foram analisadas através do preenchimento de uma Ficha Clínica previamente estabelecida (APÊNDICES B, C e D).

##### 4.6.1 Clínicas

**Dependentes:** Dor articular ou artrite.

O conceito de artrite segue as diretrizes da Sociedade Brasileira de Reumatologia e amplamente utilizado pelo EULAR (*European League Against Rheumatism*) e ACR (*American*

*College of Rheumatology*). A artrite foi considerada presente com a presença de dor, edema e sinais flogísticos nas articulações.

**Independentes:**

**a) Epidemiológicas:** idade, procedência, sexo, cor, ocupação, afastamento do trabalho.

**b) Clínicas:**

**Fase aguda:** Das manifestações da fase aguda avaliamos a presença de febre, dor articular, tipo de artrite, articulações acometidas, exantema, artralgia, mialgia, dor ocular e linfadenopatia. Comorbidades como tabagismo, etilismo, doença reumatológica prévia, Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS), Diabetes Mellitus (DM), Hipotireoidismo, Dislipidemia, Dermatites e Depressão também foram analisadas. Avaliamos a dor pela (EVA: Escala Visual Analógica, graduada de 0 a 10, sendo dez a dor máxima (leve: 1, 2, 3; moderada: 4, 5, 6; intensa: 7, 8, 9, 10); e observamos o tempo de doença, tempo de coleta de exames, tipo de medicação utilizada (analgésicos comuns, opioides, corticosteroides, anti-inflamatórios não hormonais (AINHs), anti-histamínicos) e evolução para cronicidade.

**Fase crônica:** Foi considerado quando o paciente persistia com os sintomas de artralgia/artrite após 3 meses de evolução. A classificação do tipo e evolução da artrite foi feita quanto: ao local; à intensidade, através da escala de dor (EVA); ao padrão - monoarticular (1 articulação), oligoarticular (2 a 4 articulações) ou poliarticular (a partir de 5 articulações); ao ritmo inflamatório (aditivo ou migratório); à presença ou não de rigidez matinal e tempo de rigidez; à atividade de doença articular; à medida pelo índice DAS28 (Disease Activity Score Calculator for Rheumatoid Arthritis) e; além do tipo de tratamento utilizado. Na evolução da dor articular nos pacientes crônicos podemos identificar três tipos de manifestações reumatológicas: Inflamatórias e Autoimunes (Artrite Reumatoide, Espondiloartrites, Lúpus Eritematoso Sistêmico, Vasculites ou outras Colagenoses); Doenças Reumatológicas Não Inflamatórias (Tenossinovites, Bursites, Fasceíte e Fibromialgia, Dor Local Regional, Algias Vertebrais, Síndrome do Túnel do Carpo e Edemas) e; as DAIC (Doença Articular Inflamatória Crônica), sendo classificada segundo critérios pré-estabelecidos (MARQUES et al., 2017). O tratamento farmacológico realizado foi de acordo com as manifestações clínicas: podendo ser utilizado analgésicos, opioides, AINHs, corticosteroides, antidepressivos, antineuropáticos e DMCDs, sendo os principais a Hidroxicloroquina e Metotrexate. Dentre o tratamento não farmacológico foi prescrito a fisioterapia motora quando pertinente. As complicações foram avaliadas quanto à natureza infecciosa, neurológica, vascular e neoplásica.

#### **4.6.2 Laboratório Geral**

O sangue recolhido por meio de punção venosa foi distribuído em tubos de anticoagulante EDTA, citrato de sódio e tubos com acelerador para separação de soro. As amostras foram centrifugadas e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. Essa pesquisa foi realizada apenas para os pacientes em acompanhamento da fase crônica. Os exames realizados foram: hemograma completo, bioquímica, velocidade de hemossedimentação (VHS), Proteína C Reativa (PCR) e Fator Reumatoide (FR), que foram realizados no laboratório do HU/UFS pelos métodos padronizados.

#### **4.6.3 Laboratório Molecular**

Estes exames foram realizados no laboratório de biologia molecular do HU/UFS, no laboratório do LACEN e no laboratório do (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP), tanto para os pacientes da fase aguda, como os da crônica para confirmação diagnóstica da FC.

##### **4.6.3.1 qRT-PCR**

Para a detecção dos vírus CHIKV, ZIKV e DENV, os RNAs virais foram extraídos a partir de 140  $\mu\text{L}$  da amostra utilizando o QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real foi realizada utilizando o kit da Invitrogen, o SuperScript® III Platinum® (One-Step qRT-PCR System): 2x Reaction Mix (13,5  $\mu\text{L}$ ), H<sub>2</sub>O livre de nucleasse (4,5  $\mu\text{L}$ ), Primer Forward (0,5  $\mu\text{L}$ ), Primer Reverse (0,5  $\mu\text{L}$ ), Sonda 10 $\mu\text{M}$  (0,5  $\mu\text{L}$ ), SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix (0,5  $\mu\text{L}$ ) com adição de 5  $\mu\text{L}$  de RNA extraído para cada reação. Amostras com um número de limiar (Ct)  $\leq 38$  foram consideradas positivas para infecções causadas pelos vírus Chikungunya.

A pesquisa de qRT-PCR foi realizada em 92,3% dos pacientes de fase aguda e em 72% na fase crônica, sendo realizada apenas no momento do diagnóstico, não sendo seriadas. Apenas 12 pacientes crônicos que repetiram apenas no primeiro trimestre além da fase aguda.

##### **4.6.3.2 Sorologia para Chikungunya**

A sorologia para Chikungunya foi realizado no LACEN pelo método de enzimaímmunoensaio, tanto o IgM, como o IgG. Foram consideradas positivo as amostras que apresentaram índice superior a 1,1 UR/ ml.

##### **4.6.3.3 Extração do RNA**

As análises de extração do RNA e sequenciamento foram realizadas no laboratório do (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP) em colaboração com a Dra. Alessandra Soares Schanoski, do Instituto Butantan de São Paulo. Foram feitas segundo protocolo do fabricante do kit de purificação de RNA RiboPure-Blood Kit (Thermo Scientific).

#### **4.6.3.4 RNA-Seq**

Utilizou-se 1µg de RNA total extraído dos PBMCs, onde o RNA foi preparado para o sequenciamento da Illumina. Posteriormente foram preparadas bibliotecas de cDNA, de acordo com as instruções do fabricante, as quais incluem: síntese e fragmentação de cDNA, adição de adaptadores, seleção de tamanho, amplificação e controle de qualidade após cada passo.

As análises do RNA seq foram realizadas com o auxílio de programas de informática desenvolvidos no laboratório do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP usando dados de interação proteína-proteína dos bancos de dados: IntAct, REACTOME e Biogrid e as redes visualizadas através do programa Cytoscape e seu plugin MCODE.

Para a preparação de RNA-seq, foram construídas bibliotecas a partir de 39 amostras infectadas de pacientes da fase aguda e 20 controles. As bibliotecas preparadas foram sequenciadas em duas execuções HiSeq Illumina (uma de alta produção e outra de execução rápida modo), onde cada uma das réplicas foi sequenciada em faixas separadas para avaliar variabilidade. O conjunto completo de sequências brutas para cada ensaio gerado no HiSeq Illumina 1500 e depositados no NCBI podem ser acessados através do BioProject: PRJNA507472 e do BioSample De SAMN10847030 a SAMN10847088.

#### **4.6.3.5 Expressão gênica**

Apenas os genes com contagem por milhão (CPM > 1) em pelo menos duas amostras replicadas foram utilizadas nas análises. A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) foi realizada utilizando o pacote Bioconductor edge R versão 3.20.9. Análise de expressão gênica foi realizada em 39 pacientes, comparadas com 20 controles saudáveis, sendo 15 de área endêmica e 5 de área não endêmica.

Para avaliar as vias regulatórias dos genes relacionadas à progressão da doença foi realizado uma Análise de enriquecimento do conjunto de gene (GSEA), utilizando como ranks a correlação entre os genes e Ct invertido. Um conjunto de módulos de transcrição do sangue (BTM), previamente identificados no sangue humano, foram utilizados como base para

identificar o escore de enriquecimento normalizado (NES) pelo GSEA para todos os genes relacionados ao RNA do CHIKV.

A identificação de quais genes estariam expressos positivamente ou negativamente foi realizada através da análise de uma rede online que utiliza um banco de dados de interação proteína-proteína, através do NetworkAnalyst e InnateDB.

#### **4.6.4 Evolução**

Para análise de evolução clínica e laboratorial dos pacientes que cronicaram ao longo dos 24 meses foi realizado trimestralmente a quantificação do EVA para controle da dor e do DAS28 como medida de atividade inflamatória articular.

#### **4.7 Análise Estatística**

As variáveis numéricas foram descritas como média e desvio padrão 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 relativas e intervalo de confiança para 95% quando pertinente. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar o pressuposto de normalidade. Para o teste de hipóteses relativas às variáveis categóricas utilizou-se o teste Qui-quadrado de Pearson ou exato de Fisher quando mais adequado.

Para a análise de amostra dos antecedentes pessoais e uso de medicações na fase aguda foi realizada uma estimativa de frequência com o n disponível para os antecedentes pessoais e comparado com uma simulação da amostra total, sendo observado uma sobreposição dos mesmos através do método de Bootstrap.

A comparação entre os grupos (crônicos vs não crônicos) foi realizada através do teste t de Student para dados independentes no caso das variáveis quantitativas, ou nas categóricas como descrito acima.

Para análise das variáveis associadas à cronicidade articular optou-se pela regressão logística. Para análise dos fatores associados à variável desfecho (cronicidade articular), foi utilizada técnica de regressão logística pelo método “forward stepwise” e “backward stepwise”, considerando-se para entrada no modelo  $p=0,25$  e para permanência no mesmo  $p=0,05$  e calculadas as razões de chances (“*Odds ratio*”) simples e ajustadas.

A evolução de cronicidade ao longo do tempo foi avaliada mediante a técnica de análise de sobrevivência com estimador de Kaplan-Meier.

Para a análise dos DEGs foi utilizado o teste de correlação de Pearson que identificou as associações entre genes e Ct invertido.

Utilizou-se para realizar os cálculos estatísticos o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 24.0 para teste. O nível de confiança foi 0,05 para erro  $\alpha$  e poder de 0,80 e os testes assumidos como bicaudais.

#### 4.8 Considerações Éticas

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe (54835916.2.0000.5546), com o parecer nº 1.486.302.

Todos os pacientes do estudo realizaram a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - APÊNDICE A) e preenchido a Ficha Clínica para inclusão no estudo (APÊNDICE B).

As informações foram preenchidas durante uma consulta médica de rotina, tornando-se confidenciais, sendo divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, sem a identificação dos voluntários. As coletas do sangue foram realizadas por profissionais devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente e com a autorização prévia dos voluntários. Os registros desta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora principal, Dra. Regina Adalva de Lucena Couto Océa.

Os **riscos da pesquisa**: a participação nesta pesquisa não infringe as normas legais e ética, sendo considerados riscos mínimos, inerentes à coleta de exames de sangue. Ressaltando que os pacientes não arcaram com nenhuma despesa econômica no estudo.

Os **benefícios da pesquisa** não se restringem ao indivíduo, pois sua participação no estudo e utilização de seus dados poderão ajudar no melhor entendimento das manifestações reumatológicas associadas à infecção pelo vírus Chikungunya, podendo enriquecer o conhecimento na literatura médica e beneficiar futuros pacientes afetados quanto ao seu manejo. Além disso, todo paciente incluído no estudo permaneceu em acompanhamento reumatológico até a completa resolução das queixas articulares ou nos casos de cronificação, foram incorporados ao atendimento nos ambulatórios de Reumatologia do HU/UFS.

## 5 RESULTADOS

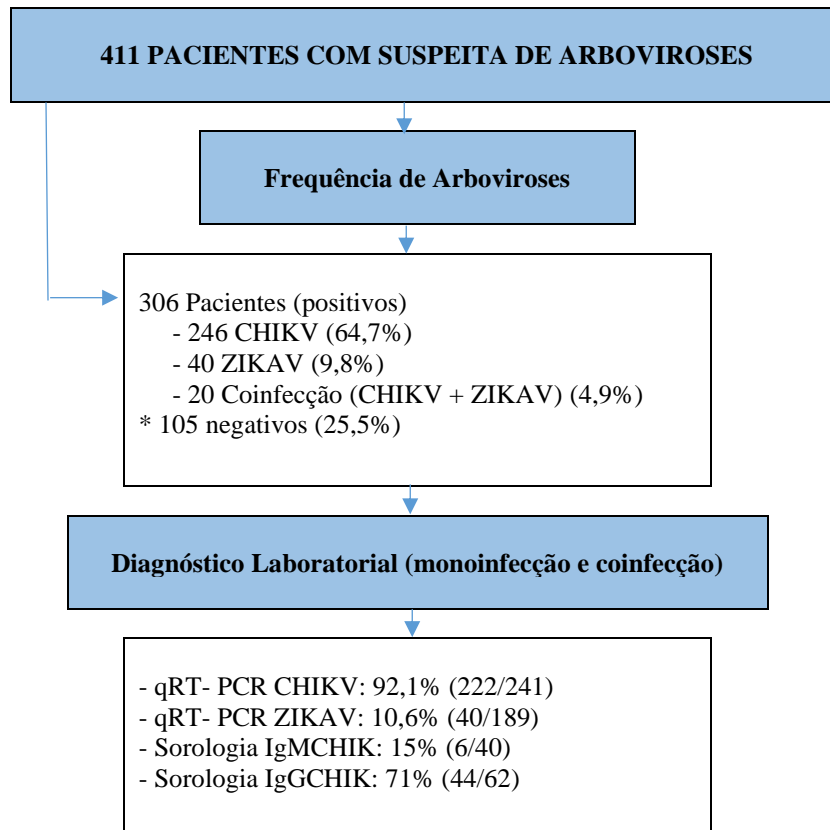
### 5.1 Resultados Clínicos

#### 5.1.1 Análise da Amostra dos Pacientes com suspeita de Arboviroses:

a) **Dados demográficos:** Foram analisados 411 pacientes com suspeita de arboviroses, sendo detectado 64,7% (266 de 411) pacientes portadores de CHIKV, onde 59,8% (246 de 411) apresentavam monoinfecção e 4,9% (20 de 411) coinfecção com ZIKA vírus (ZIKV). Foi encontrado também 9,8% com monoinfecção por ZIKAV e nenhum caso de Dengue, e cerca de 25,5% não foram positivos para as arboviroses estudadas (Gráfico 3). A média de idade da amostra foi de  $41,7 \pm 17,3$  (mínima de 7 e máxima de 89 anos) e predominância do sexo feminino em 69,9% dos casos.

b) **Confirmação diagnóstica:** A frequência da positividade do ZIKV pelo qRT-PCR foi de 10,6% (40 de 189) com IC 95% 7,2 a 14,3 e do qRT-PCR para CHIKV foi de 92,1% (222 de 241) com IC 95% 89,2 a 94,6. Quanto à sorologia de CHIKV, observou-se positividade em 71% da sorologia para IgG (44 de 62) com IC 95% 61,3 a 80,6 e em 15% de sorologia para IgM (6 de 40) com IC 95% 7,5 a 25.

Gráfico 3. Pacientes com suspeita clínica e epidemiológica de arboviroses no Estado de Sergipe – Brasil em 2015/2016.



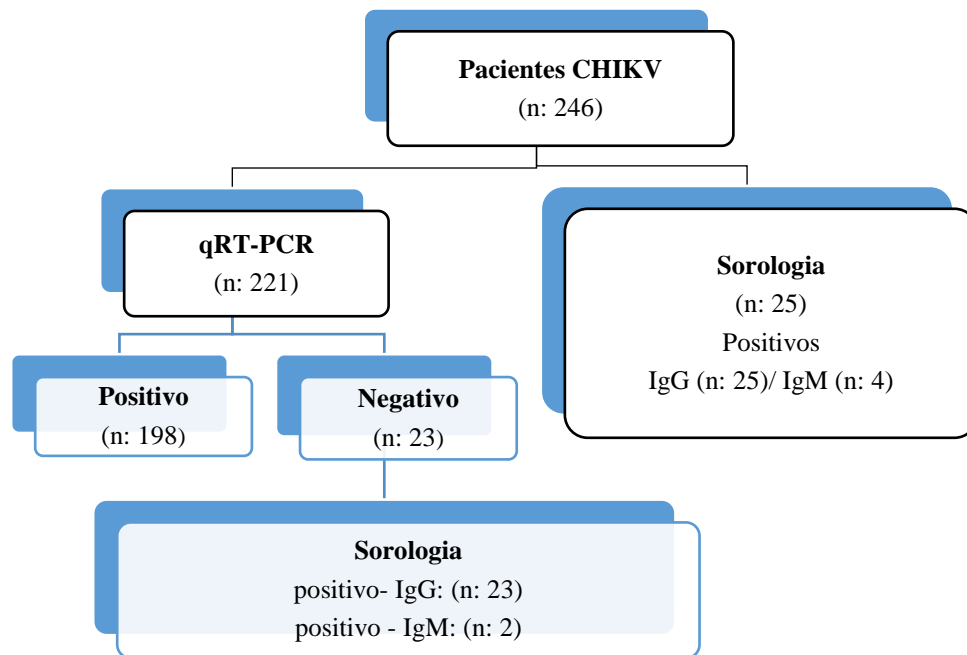
c) **Tipo de manifestação:** Da amostra positiva para FC a prevalência de monoinfecção foi de 92,5 % (246 de 266) com IC 95% 89,5 a 95,1 e de coinfeção de 7,5% (20 de 266) com IC 95% 4,9 a 10,5.

### 5.1.2 Resultados dos Pacientes com Febre Chikungunya – Fase Aguda

Foram identificados 246 pacientes com monoinfecção por FC, destes, 77,2% (190 de 246), estavam na fase aguda na primeira avaliação e 22,8% (56 de 246) já chegaram na fase crônica.

O diagnóstico destes pacientes foi obtido tanto pelo critério clínico como epidemiológico e confirmado pelos seguintes exames laboratoriais: qRT-PCR positivo em 92,3% (198 de 221), sorologia para CHIKV IgM em 12,5% (6 de 48) e CHIKV IgG em 100% (48 de 48) pacientes (Gráfico 4).

**Gráfico 4: Percentual de confirmação laboratorial dos pacientes com Febre Chikungunya**



a) **Dados demográficos:** A média de idade dos pacientes analisados foi de  $41,8 \pm 17,5$  (mínima de 7 e máxima de 89 anos). Identificamos 12 crianças, com idades variando de 7 a 16 anos e idade média de 8,75 anos, e cerca de 64% tinham idade > 45 anos. Observou-se uma maior frequência de pacientes do sexo feminino em aproximadamente 70% dos casos. Cerca de 85% eram procedentes do interior e 76% eram considerados de cor parda, 19% eram de cor negra e 5% brancos. A grande maioria encontrava-se ativo no trabalho (76%) quando adquiriu a doença.

**b) Sintomas e sinais da fase aguda:** Os sintomas mais frequentemente relatados na fase aguda foram: artralgia (87,2%), seguidos de mialgia (82%), febre (76%), exantema (59,4%), dor ocular (32,5%), linfadenopatia (18%) e conjuntivite (15%).

**c) Tipo de artrite e avaliação da dor:** A maioria dos pacientes apresentou manifestação poliarticular em 85% dos casos e nenhum com a forma monoarticular. As principais articulações acometidas foram as mãos (58%), tornozelos (51%), joelhos (49%), pés (40%), punhos (31%), ombros (28%), quadril (21%), cotovelos (16%) e vértebras (11%). Todos os pacientes apresentaram um padrão aditivo. A avaliação do EVA nesta fase demonstrou uma intensidade de dor elevada nos pacientes, onde quase metade deles referiram EVA de 10 (média de  $9,28 \pm 1,00$  e IC 95% de 9,07 a 9,46) (Tabela 1).

**Tabela 1: Caracterização clínica para todos os pacientes com Monoinfecção por FC na Fase aguda**

Característica	N*=246	%
<b>Idade em anos, média <math>\pm</math> DP <sup>1</sup></b>	246	41,8 $\pm$ 17,5
<b>Sexo feminino</b>	246	69,1
<b>Sexo masculino</b>	246	30,9
<b>Sintomas fase aguda</b>		
Artralgia	246	86,9
Mialgia	246	82,1
Febre	246	76,0
Exantema	246	59,3
Dor retroauricular	246	32,5
Linfadenopatia	246	17,9
Conjuntivite	246	15,0
<b>Poliartrite</b>	246	86,0
<b>EVA inicial, média <math>\pm</math> DP <sup>1,2</sup></b>	100	9,28 $\pm$ 1,00
<b>Antecedentes pessoais <sup>2</sup></b>		
Doenças Osteoarticulares	83	60,3
HAS	83	55,4
DM	83	28,9
Depressão	83	4,8
Hipotireoidismo	83	3,6
Asma	140	2,8
Tabagismo	83	1,0
<b>Tempo médio de coleta RT-PCR <sup>3</sup></b>	221	3 (2;60)
<b>Medicação Fase aguda <sup>2</sup></b>		
Antitérmico	205	91,2
Corticosteroides	100	91,0
Analgésico	140	77,9
AINEs	140	47,1
Antihistamínico	140	12,1

1. valor expresso na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Demais valores expressos na forma de percentual (%).

2. valores com perdas no registro

3. valor expresso como forma de Mediana (Q1; Q3)

\* N corresponde ao número de pacientes avaliados em cada variável

**d) Antecedentes pessoais:** Foi observado que 98,7% (82 de 83) dos pacientes referiram algum antecedente patológico. Os principais antecedentes observados foram as doenças osteoarticulares prévias em 60% dos casos, sendo que 12% eram Artrite Reumatoide e o restante doenças mecânicas, osteoartrose e reumatismos de partes moles, seguido por HAS (55,4%), DM (28,9%), depressão (4%), hipotireoidismo (2%), tabagismo (2%) e nenhum paciente com história de etilismo. Foi realizada uma estimativa de frequência com o n disponível para os antecedentes pessoais e comparado com uma simulação da amostra total, sendo observado uma sobreposição dos mesmos (Tabela 2).

**Tabela 2. Diferenças dos antecedentes pessoais na fase aguda de acordo com a amostra analisada.**

Antecedentes	%	IC 95% (n: 246)	IC 95% (n: 83)
<b>Doenças Osteoarticulares</b>	60,3	54,1 a 65,5	49,4 a 68,7
<b>HAS</b>	55,4	49,2 a 60,9	44,6 a 63,9
<b>DM</b>	28,9	23,6 a 33,3	19,3 a 37,4
<b>Depressão</b>	4,8	2,4 a 6,9	1,2 a 7,2
<b>Hipotireoidismo</b>	3,6	1,2 a 5,7	0,0 a 7,2
<b>Asma</b>	2,8	0,8 a 4,5	0,7 a 4,3
<b>Tabagismo</b>	1,0	0,0 a 1,6	0,0 a 1,3

IC 95%: Intervalo de confiança de 95%: estimado pelo método de Bootstrap.

**e) Medicamentos na fase aguda:** Cerca de 96% (204 de 212) dos pacientes utilizaram medicamentos na fase aguda, sendo que as principais foram os antitérmicos (90%), seguidos pelos corticosteroides (89,7%), analgésicos comuns (78%), AINEs (47%) e anti-histamínicos (12%). Semelhante aos antecedentes pessoais também foi realizado uma estimativa do IC 95% com o n disponível, observando da mesma forma uma sobreposição dos mesmos (Tabela 3).

**Tabela 3. Diferenças dos medicamentos utilizados na fase aguda de acordo com a amostra analisada.**

Antecedentes	%	IC 95% (n: 246)	IC 95% (n: 83)
<b>Antitérmico</b>	91,2	87,4 a 93,8	86,8 a 94,2
<b>Corticosteroides</b>	91,0	87,0 a 93,9	85,0 a 95,0
<b>Analgésico</b>	77,9	72,4 a 82,1	70,7 a 83,6
<b>AINEs</b>	47,1	40,7 a 52,0	39,3 a 54,3
<b>Antihistamínico</b>	12,1	8,1 a 15,5	7,2 a 16,4

IC 95%: intervalo de confiança de 95%: estimado pelo método de Bootstrap.

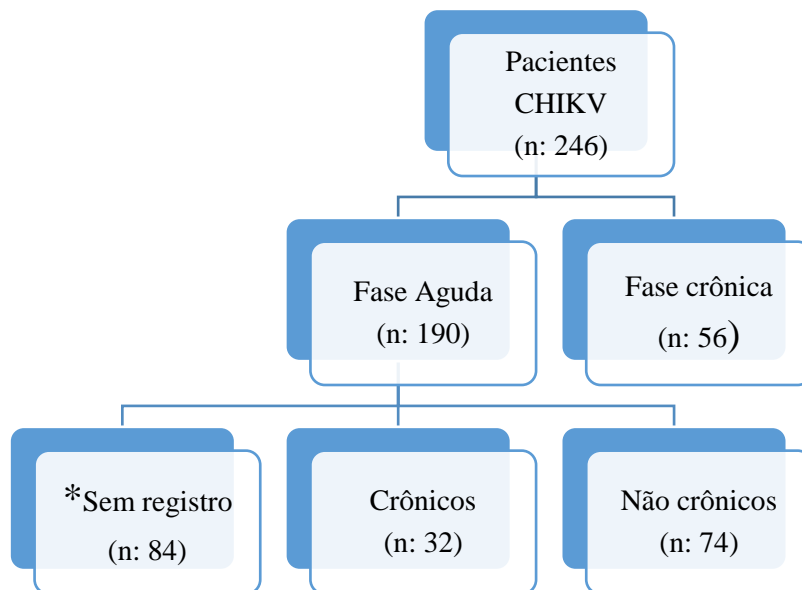
**f) Tempo de Coleta do qRT-PCR:** Metade dos pacientes apresentaram um tempo de coleta até 3 dias, 25% tinha um tempo menor que 2 dias, assim como 25% tinha um tempo maior que 60 dias. Dos pacientes que coletaram na fase aguda foram positivos 89,6% dos pacientes.

## 5.2 Evolução dos Pacientes com Febre Chikungunya após 03 meses

Os pacientes foram seguidos inicialmente por 3 meses a fim de ser observado sua evolução clínica. Daqueles pacientes que chegaram a ser avaliados na fase aguda (190 de 246),

106 pacientes (55,8%) permaneceram em acompanhamento, sendo que 32 de 106 (30,2%) dos pacientes cronicaram e 74 de 106 (69,8%) melhoraram. Cerca de 44,2 % (84 de 190) não retornaram o acompanhamento, inclusive não atendendo ao contato telefônico, portanto não sabendo a sua evolução clínica. Foi observado que 22,8% dos pacientes (56 de 246) chegaram já na fase crônica da doença e todos permaneceram em acompanhamento (Gráfico 5).

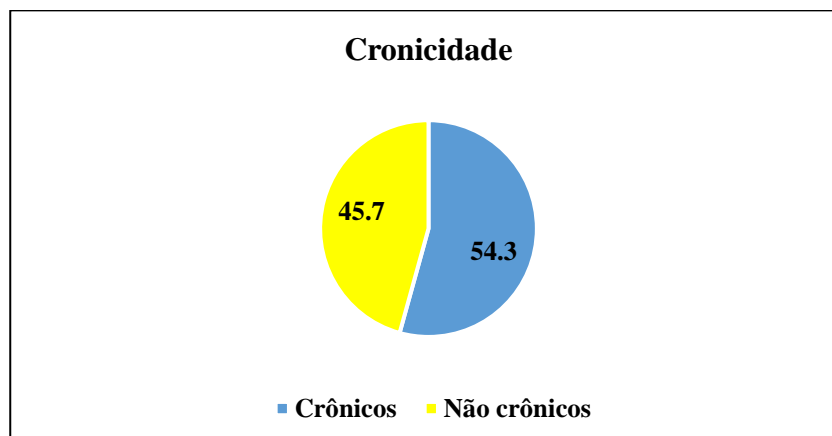
**Gráfico 5. Fluxograma de evolução clínica dos pacientes com FC após 3 meses**



\*pacientes não retornaram ao acompanhamento, não responderam ao contato telefônico, não sabendo a sua evolução.

**5.2.1 Frequência de Cronicidade:** Permaneceram em acompanhamento 66% dos pacientes (162 de 246), onde a frequência de cronicidade foi de 54,3% (88/162) com IC 95% 46,9 a 63,0 (Gráfico 6).

**Gráfico 6. Frequência de cronicidade articular nos Pacientes com Febre Chikungunya**



### 5.3 Fatores associados à Cronicidade

Os pacientes crônicos apresentaram uma idade média de  $53,3\% \pm 13,4$  superior ( $p < 0,0001$ ) aos não crônicos (idade média de  $35,8 \pm 16,1$ ). A diferença média para os crônicos foi de  $17,6 \pm 2,3$  anos com IC 95% para a diferença das médias de 13,0 a 22,15. A predominância do sexo feminino foi maior no grupo crônico, mas sem significância.

Dentre as manifestações agudas aquelas que foram significativamente mais presentes nos pacientes crônicos foram a artralgia, mialgia e linfadenopatia ( $p < 0,005$ ). Houve uma predominância de conjuntivite nos pacientes crônicos, porém sem significância (Tabela 4).

**Tabela 4: Comparação dos dados clínicos na fase aguda de pacientes com FC que cronicaram e não cronicaram**

Dados dos pacientes	Crônicos % (n = 88)	Não crônicos (n = 74)	p
Sexo feminino (%)	80,7 (71)	68,5 (50)	0,06
Idade em anos, média $\pm$ DP <sup>1</sup>	53,3 $\pm$ 13,3	35,8 $\pm$ 16,0	<b>0,0001</b>
<b>Sintomas fase aguda (%)</b>			
Artralgia	100 (88)	79,7 (59)	<b>0,00001</b>
Mialgia	96,6 (85)	79,7 (59)	<b>0,001</b>
Febre	85,2 (75)	82,4 (61)	0,63
Exantema	70,5 (62)	75,7 (56)	0,46
Dor retroauricular	42,0 (37)	33,8 (25)	0,28
Linfadenopatia	34,1 (30)	12,2 (9)	<b>0,001</b>
Conjuntivite	25,0 (22)	12,2 (9)	0,06
<b>Antecedentes clínicos <sup>2</sup>(%)</b>			
Doenças Osteoarticulares	62,3 (43)	50,0 (7)	0,39
HAS	56,5 (39)	50,0 (7)	0,65
DM	26,0 (18)	42,9 (6)	0,20
Depressão	5,9 (5)	0 (0)	0,35
Asma	5,2 (4)	0 (0)	0,06
Hipotireoidismo	2,9 (3)	7,1 (1)	0,44
Tabagismo	2,9 (2)	0 (0)	0,52
<b>Poliartrite (%)</b>	<b>86,4 (76)</b>	<b>85,1 (63)</b>	<b>0,82</b>
<b>EVA inicial, média <math>\pm</math> DP <sup>1</sup></b>	<b>9,4 <math>\pm</math> 1,0</b>	<b>8,6 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>0,0005</b>
<b>Medicação Fase aguda (%)</b>			
Corticosteroides	89,8 (79)	100 (10)	0,29
Antitérmico	87,2 (75)	89,7 (61)	0,63
Analgésico	74,0 (57)	82,5 (52)	0,23
AINEs	61,0 (47)	30,2 (19)	<b>&lt; 0,0001</b>
Antihistamínico	16,9 (15)	6,3 (5)	0,06

1.valor expresso na forma de média  $\pm$  desvio padrão. Demais valores expressos na forma de percentual (%).

2.valores com perda no registro.

3.valores corresponde em tempo médio em dias de coleta

\*Nas variáveis quantitativas utilizou-se o teste T Student e nas categóricas o teste Qui Quadrado ou Exato de Fisher.

A maioria dos pacientes que cronicou teve um tempo de coleta do qRT-PCR superior a 120 dias, já o outro grupo teve uma mediana de 3 dias, já que se tratava de casos agudos que não evoluíram para cronicificação. Foi observado que os pacientes crônicos apresentaram uma diferença significativa na média do EVA inicial crônicos X não crônicos ( $9,37 \pm 1,00$  X  $8,58 \pm$

0,49). Além disso detectamos que 50% dos pacientes relataram nota 10 nos pacientes crônicos e 50% nota 8,5 nos não crônicos.

Dentre as medicações usadas na fase aguda houve uma maior frequência do uso do AINEs no grupo crônico denotando um grupo de pacientes mais sintomáticos.

Após realizar uma regressão linear simples observamos que a idade e o sexo feminino se caracterizaram como fatores independentes para a cronicidade das manifestações articulares. A presença de mialgia e linfadenopatia também foram fortemente associadas a cronicidade articular, assim como o EVA elevado (acima de 9) e o uso de AINEs. Esses dados sugerem que manifestações articulares mais exacerbadas na fase aguda podem evoluir com maior cronicidade (Tabela 5).

**Tabela 5: Razão de chances não ajustada para fatores associados à cronicidade articular.**

Variável	Razão de chances	IC 95%	p
<b>Idade</b>	1,08	1,05-1,10	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Sexo Feminino</b>	2,05	0,97-4,11	0,056
<b>Mialgia</b>	7,20	1,99-25,99	<b>0,03</b>
<b>Linfadenopatia</b>	3,73	1,63-8,52	<b>0,02</b>
<b>HAS</b>	1,30	0,41-4,10	0,65
<b>Antecedente Osteoarticulares</b>	1,65	0,52-5,25	0,39
<b>Tipo de artrite</b>	1,30	0,25-6,78	0,71
<b>EVA inicial</b>	1,84	1,11-3,05	<b>0,018</b>
<b>Uso de AINEs (+ sintomáticos)</b>	3,62	1,79-7,35	<b>&lt;0,0001</b>

Regressão logística por fatores associados à cronicidade. Variável dependente: cronicidade. Variáveis independentes: idade, sexo feminino, mialgia, linfadenopatia, HAS, antecedente reumatológico, tipo de artrite, EVA inicial, uso de AINEs, HAS: hipertensão arterial sistêmica, EVA: escala visual analógica, AINEs: antiinflamatório não hormonal. IC: intervalo de confiança

Foram realizados posteriormente dois modelos estatísticos de regressão logística ajustada, incluindo separadamente a idade e o outro com o sexo feminino. No primeiro modelo observamos que somente a idade, o uso do AINEs e a linfadenopatia permaneceram como fator independente para a cronicidade da doença em nossos pacientes. Já o segundo modelo sugere que o sexo feminino estaria mais fortemente associado à cronicidade (Tabela 6). Do ponto de vista estatístico, o modelo 2 apresentou melhor homogeneidade de razão de chances com IC mais próximos, portanto, isso sugere que esse modelo seja mais ajustado estatisticamente.

**Tabela 6: Razão de chances ajustada para fatores associados à cronicidade articular**

Modelo 1			
Variável	Razão de chances	IC 95%	p
<b>Idade</b>	1,080	1,048-1,114	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Linfoadenopatia</b>	5,007	1,674-14,979	<b>0,004</b>
<b>Uso de AINEs</b>	2,783	1,197-6,469	<b>0,017</b>

Modelo 2			
Variável	Razão de chances	IC 95%	p
<b>Sexo Feminino</b>	2,957	1,168-7,488	<b>0,022</b>
<b>Linfoadenopatia</b>	3,046	1,162-7,982	<b>0,023</b>
<b>Uso de AINEs</b>	2,925	1,379-6,202	<b>0,005</b>

Regressão logística ajustada por fatores associados à cronicidade. Variável dependente: cronicidade. Variáveis independentes: idade, gênero feminino, linfoadenopatia, uso de AINEs. IC: intervalo de confiança, AINEs: antiinflamatório não hormonal.

#### 5.4 Evolução de Cronicidade ao Longo do Tempo

Ao ser realizado uma curva de sobrevivência, observou-se que a evolução para cronicidade em 90 dias foi de 10,5% e aumentou progressivamente ao longo do tempo de acompanhamento, chegando a cerca de 30% no primeiro ano. Posteriormente, essa frequência vai aumentando gradativamente com uma probabilidade de 43,3% em 450 dias (Tabela 7).

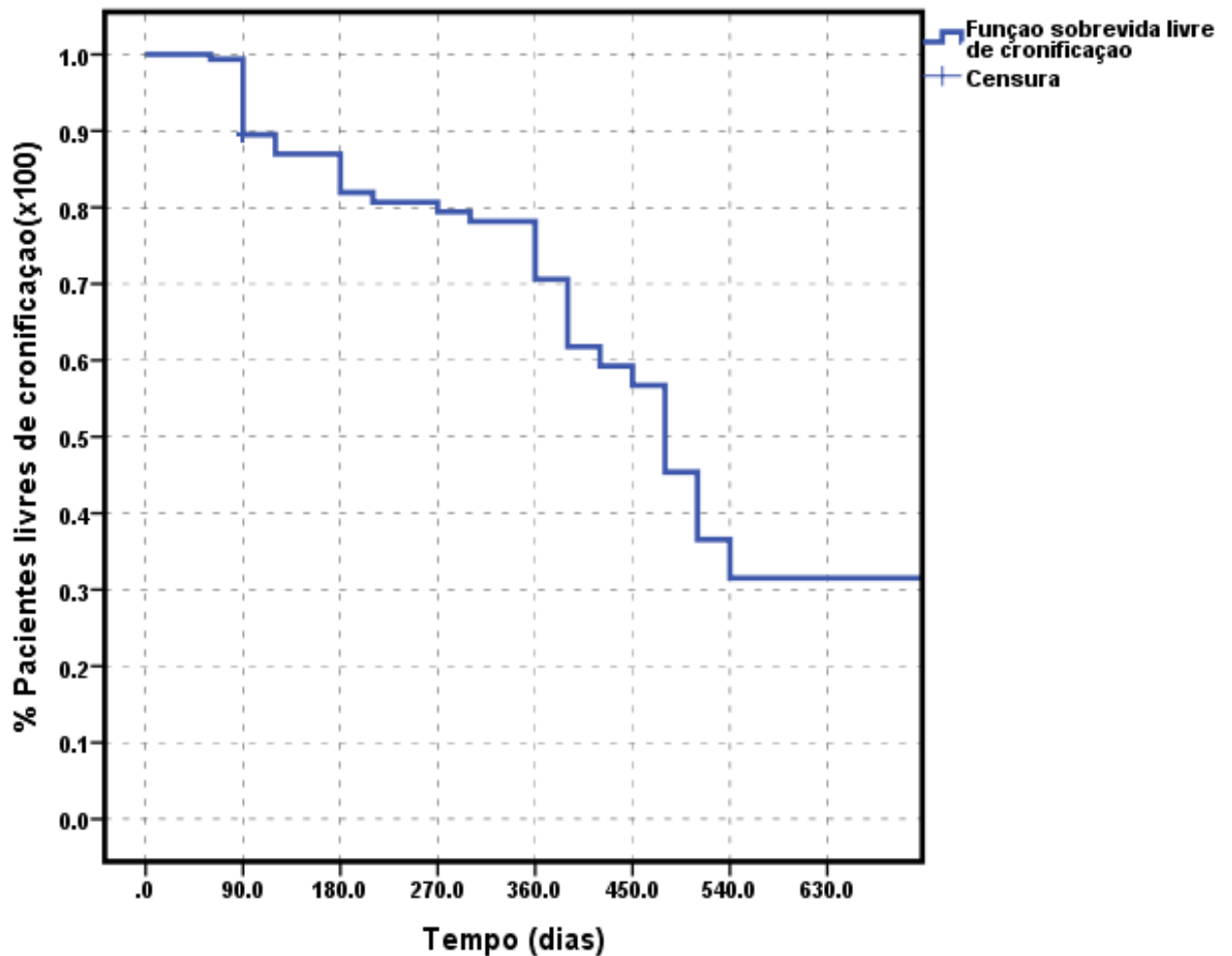
**Tabela 7. Frequência de cronicidade ao longo do tempo**

Tempo	n	%	% não crônicos	% crônicos
<b>90</b>	145	17	89,5 ± 2,4	10,5
<b>120</b>	69	19	87,0 ± 2,9	13
<b>180</b>	65	23	81,9 ± 3,7	18,1
<b>300</b>	62	26	78,2 ± 4,1	21,8
<b>360</b>	56	32	70,6 ± 4,7	29,4
<b>390</b>	49	39	61,8 ± 5,2	38,2
<b>450</b>	43	45	56,7 ± 5,3	43,3

Curva de Kaplan-Meier

Em nossa avaliação podemos identificar que o risco para cronicidade aumenta com o tempo e quando se aproxima de um ano ele aumenta de forma progressiva, chegando a cerca de 44% ao longo de 450 dias e 69% com 540 dias. Pelo gráfico observamos que quanto mais passa o tempo, maior o risco de persistência da cronicidade (Gráfico 7).

Gráfico 7. Análise de sobrevida livre de cronificação na Febre Chikungunya ao longo do tempo



#### 5.4.1 Fatores associados à Evolução de Cronicidade ao Longo do Tempo

Foi realizado uma relação comparativa dos fatores associados à cronificação com a curva de sobrevida e observou-se que: os pacientes que apresentavam manifestações clínicas relacionadas à reatividade do sistema imune, como a linfadenopatia, apresentaram maior frequência de cronicidade articular. Aqueles pacientes que usaram mais AINEs, sugerindo assim, serem os mais sintomáticos, também apresentaram uma diferença na curva livre de eventos, levando a uma maior frequência de cronicidade (Tabela 8) e (Gráficos 8,9).

Tabela 8. Relação de fatores de cronicidade com curva de sobrevida livre de cronificação

a) Linfadenopatia		
Tempo	% com linfadenopatia	% sem linfadenopatia
90	82,1 ± 6,1	91,9 ± 2,5
120	78,5 ± 6,8	90,0 ± 3,1
300	64,2 ± 8,5	84,2 ± 4,3
360	57,1 ± 9,0	76,6 ± 5,4
450	56,2 ± 8,2	62,8 ± 5,3

b) Uso de AINEs		
Tempo	% com AINEs	% sem AINEs
90	92,4 ± 3,3	95,9 ± 2,3
180	90,2 ± 3,9	85,3 ± 6,2
360	72,6 ± 6,4	81,7 ± 6,8
390	58,2 ± 7,4	59,4 ± 7,1

Curva de Kaplan-Meier

Gráfico 8. Análise de sobrevida da Linfadenopatia e cronicidade na Febre Chikungunya

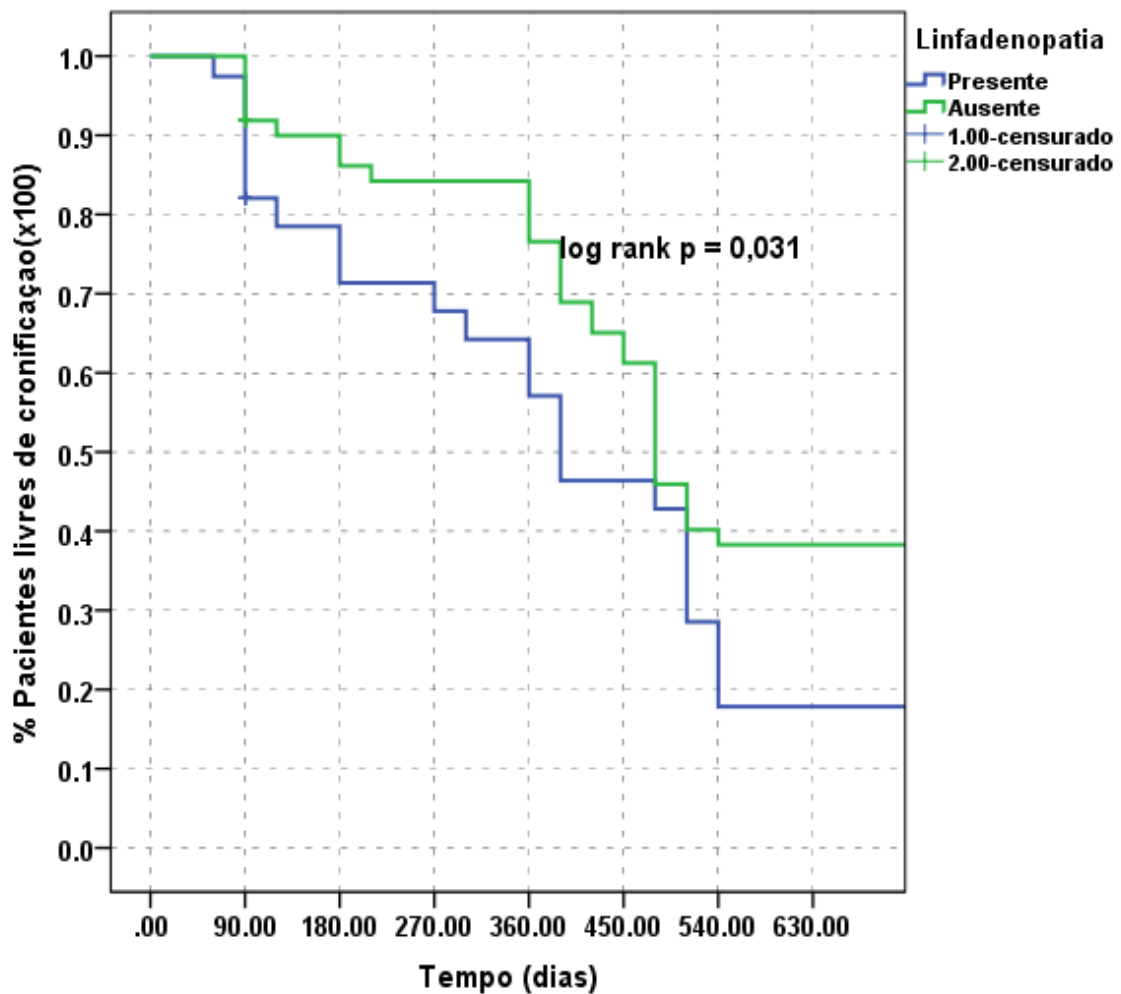
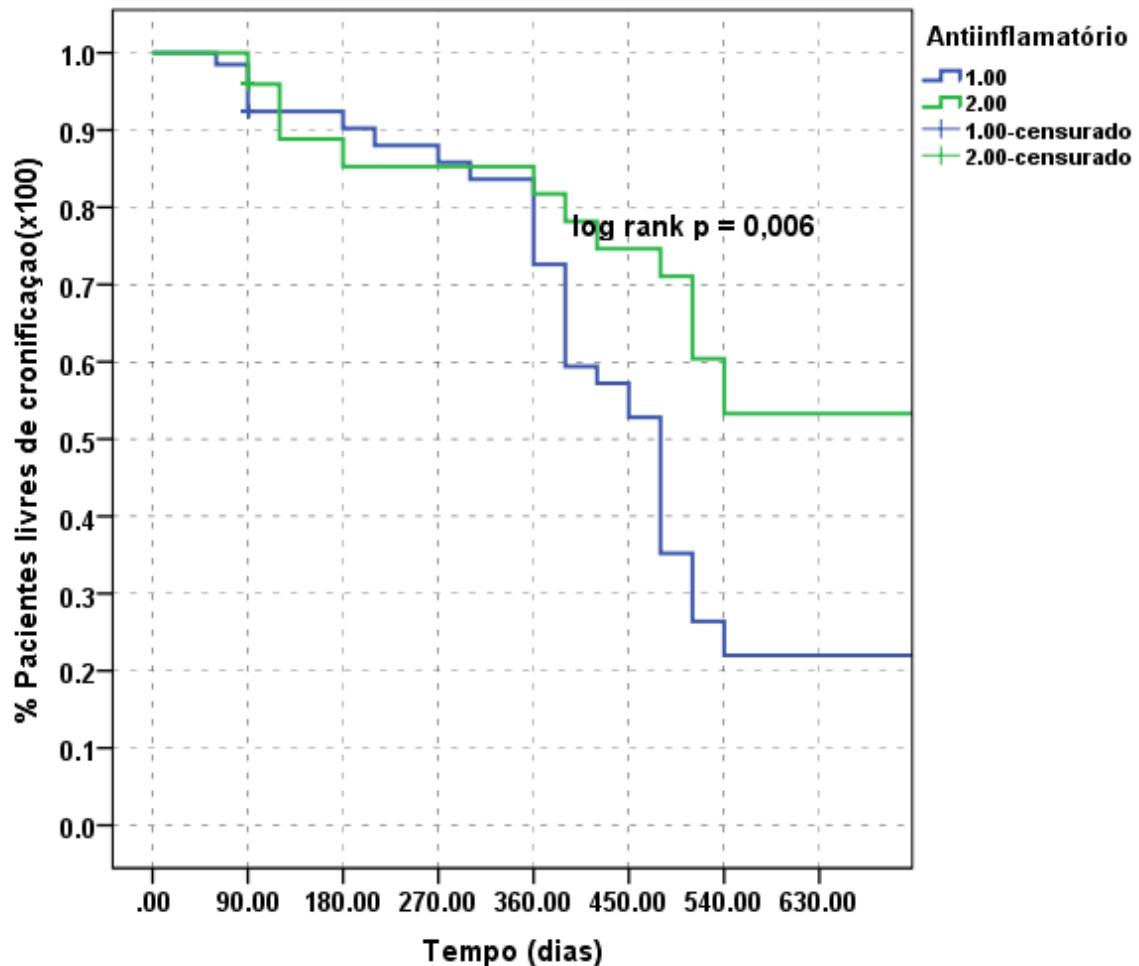


Gráfico 9. Análise de sobrevida do uso do Antiinflamatório e Cronicidade na Febre Chikungunya



### 5.5 Resultados dos Pacientes com Febre Chikungunya- Fase Crônica

Foram identificados 88 pacientes crônicos (88 de 162) que foram seguidos durante 2 anos, sendo observado as seguintes características: (Tabela 9).

**a) Dados demográficos:** A média de idade foi de  $53,3 \pm 13,3$  (mínima de 21 e máxima de 89 anos) e observou-se uma maior frequência de pacientes do sexo feminino em 80,7% dos casos.

**b) Manifestações reumatológicas crônicas:** Todos os pacientes evoluíram com algum tipo de doença reumatológica crônica não inflamatória, que muitas vezes foi concomitante ao quadro inflamatório articular desenvolvido por alguns pacientes. Das principais manifestações reumatológicas crônicas não inflamatórias destacaram-se as artralguas (72,7%), seguido das tendinites (55,6%), patologias de coluna (31,8%), fascíte plantar (25%), fibromialgia (23,8%), artrose (19,3%) e síndrome do túnel do carpo (9,1%). A Doença Articular Inflamatória crônica (DAIC) foi observada em 25% dos casos (22 de 88) e 4,5% (4 de 88) evoluiu para doença

reumatológica crônica autoimune, sendo 3 pacientes para Artrite Reumatoide e 1 para Artrite Psoriásica.

**Tabela 9: Caracterização clínica e laboratorial para todos os pacientes crônicos com Febre Chikungunya**

Característica	n	%
<b>Idade em anos, média ± DP <sup>1</sup></b>	88	53,3±13,3
<b>Sexo feminino</b>	71	80,7
<b>Sexo masculino</b>	17	19,3
<b>Sintomas crônicos</b>	88	100
<b>Doença Não Inflamatória</b>	88	100
Artralgias	64	72,7
Tendinite	49	55,7
Patologias de coluna	28	31,8
Fasceíte plantar	22	25
Fibromialgia	21	23,9
Artrose	17	19,3
Síndrome Túnel do Carpo	8	9,1
<b>DAIC</b>	22	25,0
<b>Crônica Autoimune</b>	4	4,5
<b>Complicações, n pacientes <sup>3</sup></b>	4	3,4
Infeciosa	2	2
Neurológica	0	0
Vascular	3	2
Neoplásica	0	0
<b>Exames laboratoriais</b>		
Fator reumatoide	2	2,3
VHS, média ± DP <sup>1</sup>	88	18,34 ± 13,59
PCR	11	12,5
<b>Índice de atividade- DAS 28, (média ± DP) <sup>1,4</sup></b>	26	(3,63 ± 0,96)
<b>Tratamento Fase crônica</b>	88	
Analgésico comum	88	100
Opioides	39	44,3
Corticoides	36	42,0
AINEs	27	30,7
Cloroquina	23	26,1
Antiartrósicos	14	15,7
Antidepressivo	11	12,5
Metotrexate	10	11,4
Pregabalina	9	10,2
<b>Fisioterapia</b>	41	46,6

1. valor expresso na forma de média ± desvio padrão. Demais valores expressos na forma de percentual(%).

2. n. corresponde ao número relativo de eventos positivos

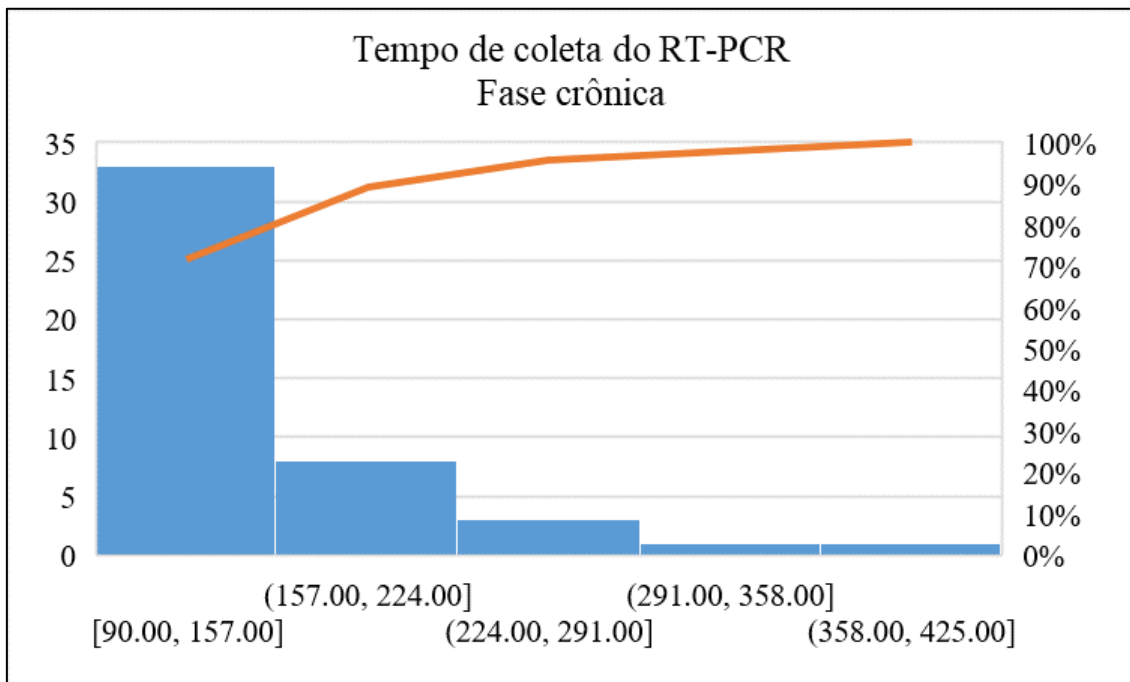
3. valores expressos em número de paciente que tiveram complicações, sendo que um paciente apresentou duas complicações simultâneas

4. a avaliação do DAS 28 (Disease Activity Score Calculator for Rheumatoid Arthritis) só foi realizada nos pacientes com doença autoimune inflamatória e DAIC

**c) Laboratório:** A frequência de positividade do FR foi cerca de 2,3% e da PCR de 12,5%, apresentando uma média de VHS de 18,34 ± 13,5 na primeira avaliação trimestral dos pacientes.

**d) Tempo de coleta do qRT-PCR:** Foi coletado o qRT-PCR de 63 pacientes que estavam na fase crônica e destes 73% (46/63) foram positivos com IC 95% 61,3 a 83,0. Demonstrou-se também que 10% tiveram um tempo de coleta na fase crônica maior que 210 dias (Gráfico 10).

**Gráfico 10. Tempo em dias de coleta do qRT-PCR CHIKV nos pacientes na fase crônica.**



**e) Tratamento da fase crônica:** Os principais medicamentos usados na fase crônica foram os analgésicos comuns (100%), seguido pelos corticosteroides (42%). Ressaltamos que o uso dos corticosteroides nessa fase não era de forma contínua, sendo prescrito somente nas manifestações inflamatórias. Para analgesia crônica destacamos o uso dos opioides fracos em 44,3%, seguido dos AINEs em 30,6%, antidepressivos em 12,5% e antineuropáticos (10,2%). Nos pacientes que evoluíram com a DAIC e Doenças reumatológicas autoimunes foi necessário o uso dos DMCDs (drogas modificadoras de doença). A cloroquina foi a mais usada em 88,5% destes pacientes, seguida pelo MTX em 38,5%, este sempre em associação com a cloroquina. A fisioterapia motora foi instituída em 46,5% dos casos, principalmente para as tendinopatias de ombros e tornozelos.

**f) Complicações:** Dentre as complicações, foi observado uma frequência de 3,4%, em quatro pacientes, sendo um caso de erisipela associado à trombose venosa profunda (TVP), outro de erisipela, um caso de vasculite palmar e outro de TVP isolada, sem nenhum caso de óbito.

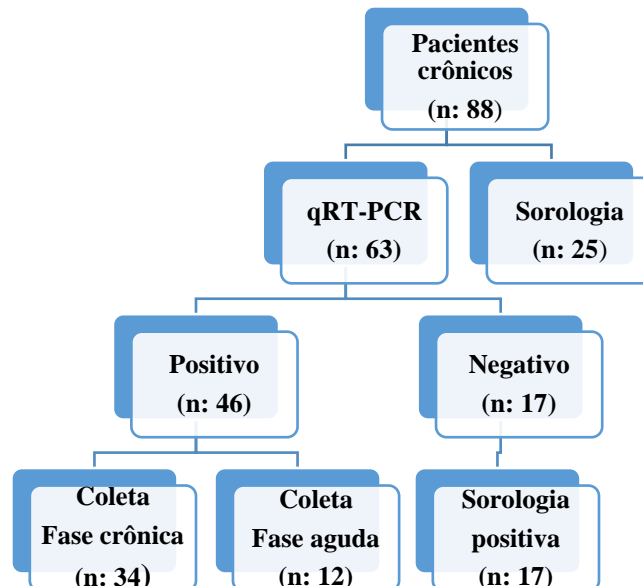
**g) Atividade da doença:** Para os pacientes com manifestação inflamatória (26 de 88) observamos uma média de DAS28 de  $(3,63 \pm 0,96)$  na primeira avaliação trimestral.

### 5.5.1 Comparação dos Pacientes Crônicos com qRT-PCR Positivos e Negativos

Foi observado que dos 88 pacientes crônicos, cerca de 72% fizeram o qRT-PCR na confirmação diagnóstica, e o restante realizou o exame sorológico. Destes 63 pacientes, 46 foram positivos e 17 negativos. Dos pacientes positivos, 34 fizeram a coleta na fase crônica e o restante eram pacientes que coletaram na fase aguda e cronificaram depois e após 3 meses permaneciam positivos. De modo interessante identificou-se que dos pacientes que realizaram o qRT-PCR, 73% (46 de 63) foram positivos com IC 95% 61,3 a 83,0 (Gráfico 11), mesmo estando na fase crônica, já que é um exame que determina a presença do RNA viral, geralmente sendo positivo somente na fase aguda da doença.

Não foi observado diferenças significativas nas manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com qRT-PCR positivos e negativos. Ambos os grupos foram mais frequentes no sexo feminino, a média de idade dos pacientes com qRT-PCR foi de  $51,1 \pm 14,3$ , semelhante ao grupo qRT-PCR negativo com uma média de idade de  $52,4 \pm 9,7$ .

**Gráfico 11. Frequência dos exames laboratoriais confirmatórios para Febre Chikungunya nos pacientes crônicos.**



Quanto às manifestações reumatológicas crônicas identificou-se um discreto aumento da DAIC no grupo qRT-PCR negativo, porém sem significância estatística. Os grupos apresentaram a mesma quantidade de complicações. O FR só foi positivo no grupo qRT-PCR

positivo, porém a frequência foi muito baixa. Da mesma forma a positividade da PCR foi mais frequente nesse grupo, mas sem significância também. O índice de atividade (DAS 28) também foi semelhante nos grupos, demonstrando uma atividade de leve a moderada da doença articular inflamatória nos pacientes crônicos.

Quanto às medicações foi detectado uma frequência elevada de analgésicos e corticosteroides em ambos os grupos, com um maior do uso de AINEs no grupo qRT-PCR positivo, porém sem significância. Ambos os grupos se apresentavam bastante sintomáticos com alta frequência de uso de analgésicos e AINEs (Tabela 10).

**Tabela 10: Comparação das manifestações crônicas dos pacientes crônicos com qRT-PCR positivo e negativo.**

Dados dos pacientes	RT-PCR positivo % (n = 46)	RT- PCR negativo % (n = 17)	p
<b>Sexo feminino, (%)</b>	73,2 (34)	68,9 (12)	0,74
<b>Idade em anos, média ± DP <sup>1</sup></b>	51,1 ± 14,3	52,4 ± 9,7	0,73
<b>Doença Não Inflamatória</b>	100 (46)	100 (17)	
Artralgias	80,4 (37)	70,6 (12)	0,49
Tendinite	58,7 (27)	52,9 (9)	0,77
Patologias de coluna	32,6 (15)	23,5 (4)	0,55
Fasceíte plantar	19,6 (9)	29,4 (5)	0,49
Fibromialgia	17,4 (8)	23,5 (4)	0,71
Artrose	13,0 (6)	23,5 (4)	0,43
Síndrome Túnel do Carpo	8,7 (4)	5,9 (1)	1,00
<b>DAIC</b>	21,7 (10)	41,2 (7)	0,19
<b>Crônica Autoimune</b>	4,3 (2)	5,9 (1)	1,00
<b>Complicações <sup>2</sup></b>	0,46 (1)	0,17 (1)	0,47
Infecciosa	1	0	
Neurológica	0	0	
Vascular	1	1	
Neoplásica	0	0	
<b>Exames laboratoriais</b>			
Fator reumatoide, (%)	4,3 (2)	0 (0)	1,00
VHS, média ± DP <sup>1</sup>	19,9 ± 12,5	13,8 ± 10,20	0,07
PCR positivo, (%)	17,4 (8)	5,9 (1)	0,42
<b>Índice de atividade- DAS 28, (média ± DP) <sup>1,3</sup></b>	4,3 ± 1,2	3,8 ± 0,7	0,21
<b>Tratamento Fase crônica, (%)</b>			
AINH	43,5 (20)	17,6 (3)	0,79
Analgésico comum	100 (46)	100 (17)	
Opioides	43,5 (20)	47,1 (8)	1,00
Corticoides	87 (40)	88,2 (915)	1,00
Cloroquina	23,9 (11)	23,5 (4)	1,00
Metotrexate	6,5 (3)	23,5 (4)	0,07
Antidepressivo	13,0 (6)	29,4 (5)	0,14
Pregabalina	8,7 (4)	0 (0)	0,56
Antiartrosicos	15,2	16,7 (2)	1,00
<b>Fisioterapia</b>	39,1	52,9 (9)	0,45

1. valor expresso na forma de média ± desvio padrão. Demais valores expressos na forma de percentual (%).

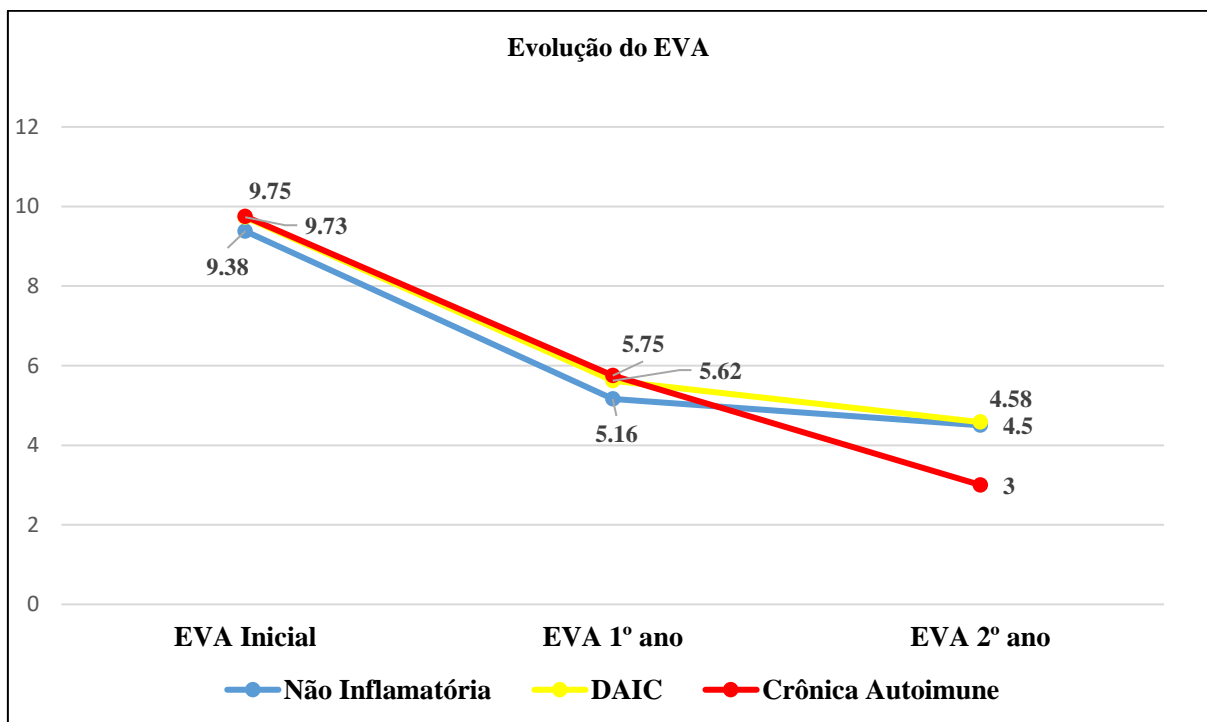
2. valores expressos em número de pacientes que tiveram complicações, sendo que um paciente apresentou duas complicações simultâneas

3. a avaliação do DAS 28 (Disease Activity Score Calculator for Rheumatoid Arthritis) só foi realizada nos pacientes com doença autoimune inflamatória e DAIC

## 5.5.2 Evolução dos Pacientes Crônicos

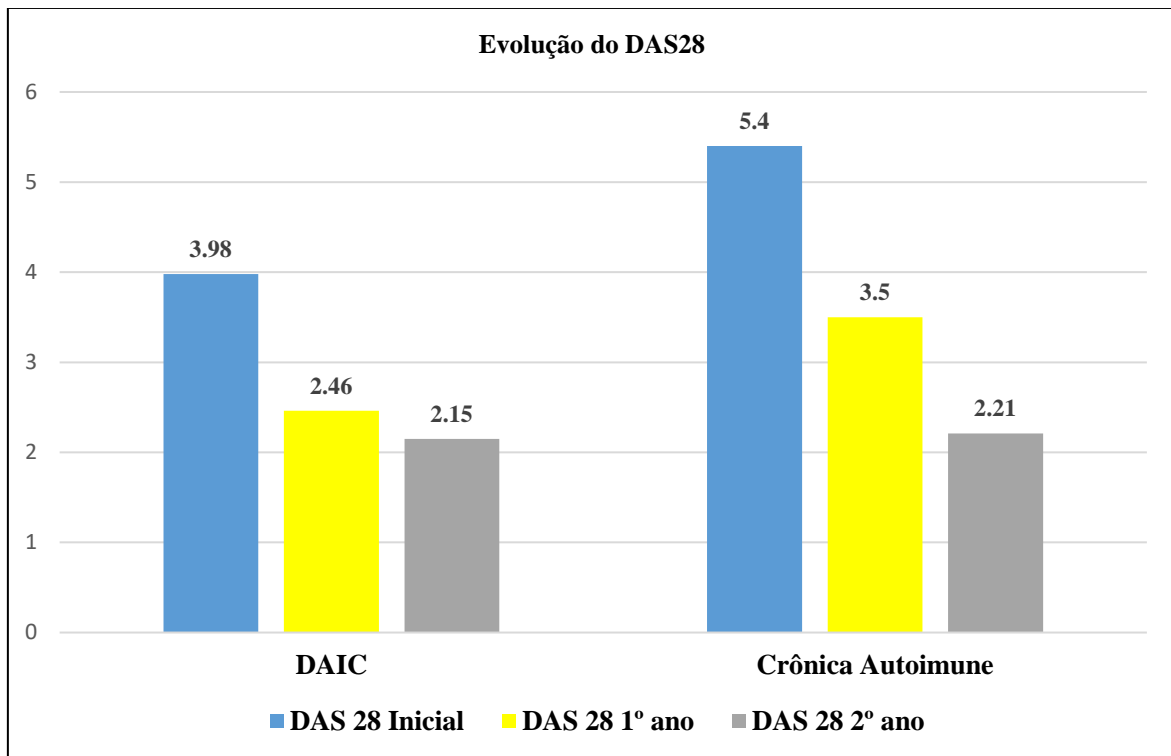
**5.5.2.1 - Avaliação do EVA:** Para avaliação clínica evolutiva da dor utilizamos o EVA. Nos pacientes com doença não inflamatória a média do EVA inicial foi de  $9,38 \pm 0,54$ , evoluindo para o 1º ano para  $5,16 \pm 1,74$  e no 2º ano para uma média de  $4,50 \pm 1,89$ . Nos pacientes com DAIC a média do EVA inicial foi de  $9,73 \pm 0,52$ , já no 1º ano foi de  $5,62 \pm 1,57$  e no 2º ano diminuiu para  $4,58 \pm 1,62$ . Nas Doenças crônicas autoimunes a média da EVA inicial foi de  $9,75 \pm 0,43$ , no 1º ano de  $5,75 \pm 0,82$  e no 2º ano de  $3,50 \pm 1,50$  (Gráfico 12).

Gráfico 12. Evolução do EVA ao longo dos 02 anos de acordo com o tipo de manifestação reumatológica.



**5.5.2.2 - Avaliação do DAS28:** Nas doenças articulares inflamatórias para avaliarmos a atividade de doença utilizamos o DAS28. Nos pacientes com DAIC a média do DAS 28 no 1º ano foi de  $2,46 \pm 0,62$  e no 2º ano foi de  $2,15 \pm 0,81$ ; já na Doença crônica autoimune a média no 1º ano foi de  $3,50 \pm 0,69$  e no 2º ano foi de  $2,21 \pm 0,47$  (Gráfico 13).

**Gráfico 13. Evolução do DAS 28 ao longo dos 02 anos de acordo com o tipo de manifestação reumatológica.**



**5.5.2.3 - Tratamento Realizado:** No 1º ano observou-se uma frequência maior do uso de analgésicos comuns e opioides fracos. O uso dos corticoides foi restrito aos pacientes com DAIC, doença autoimune ou quadros inflamatórios, com dose máxima de prednisona de 20 mg ao dia. A prescrição dos DMCDs foi realizada em 26 pacientes, sendo o mais frequente o uso da cloroquina e em 10 pacientes foi necessário a associação do metotrexate. O uso dos antidepressivos e pregabalina foi feito em 13,1 e 14,8 % dos pacientes respectivamente para tratamento de dor neuropática e fibromialgia. A fisioterapia motora foi recomendada em 52,5% dos pacientes principalmente para tratamento de tendinites de ombros e tornozelos.

Semelhante ao primeiro ano, no segundo ano de acompanhamento a principal medicação utilizada foram os analgésicos comuns e opioides fracos, e o uso dos corticosteroides e DMCDs restritos também aos pacientes com DAIC e doença autoimune. A fisioterapia motora também foi recomendada em 59,5% dos pacientes no tratamento de tendinites de ombros e tornozelos com boa evolução dos pacientes.

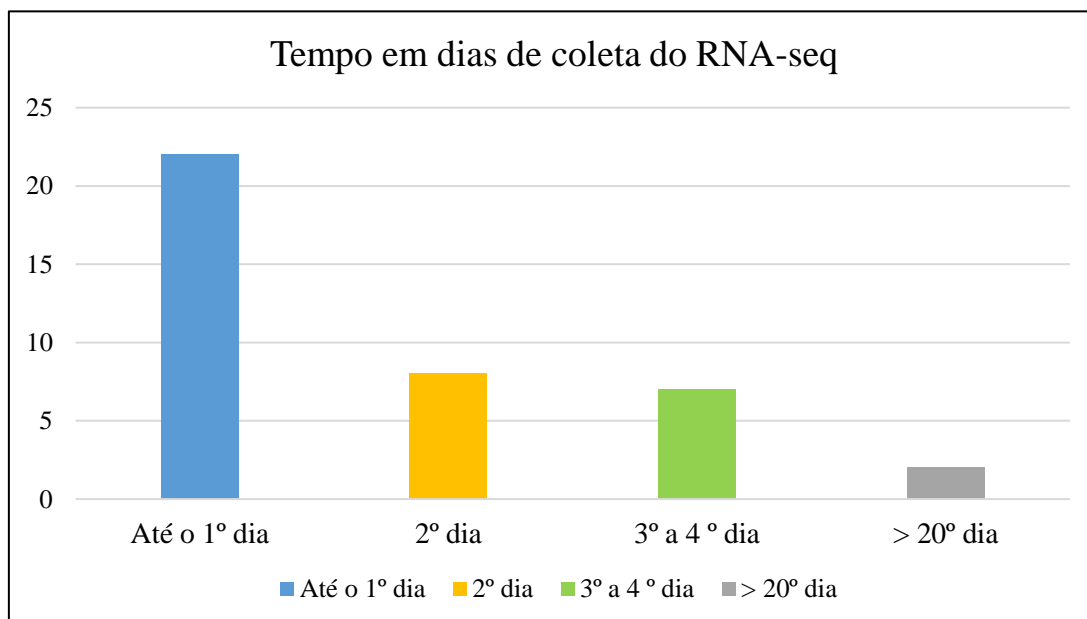
## 5.6 Resultados da Expressão Gênica

Os resultados da avaliação da expressão gênica dos pacientes da FC foram analisados conjuntamente com a pesquisadora Dra Alessandra Schanoski no laboratório do (Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP) em parceria com o e Instituto Butantan e Instituto Adolfo Lutz. Através de nossos dados foi publicado o artigo “**Systems analysis of subjects acutely infected with the Chikungunya vírus**” na revista **Plos Pathogen** em **18 de junho de 2019**. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880>, do qual sou co-autora (ANEXO). Segue abaixo os principais resultados do artigo.

### 5.6.1 Dados Clínicos e Sorológicos

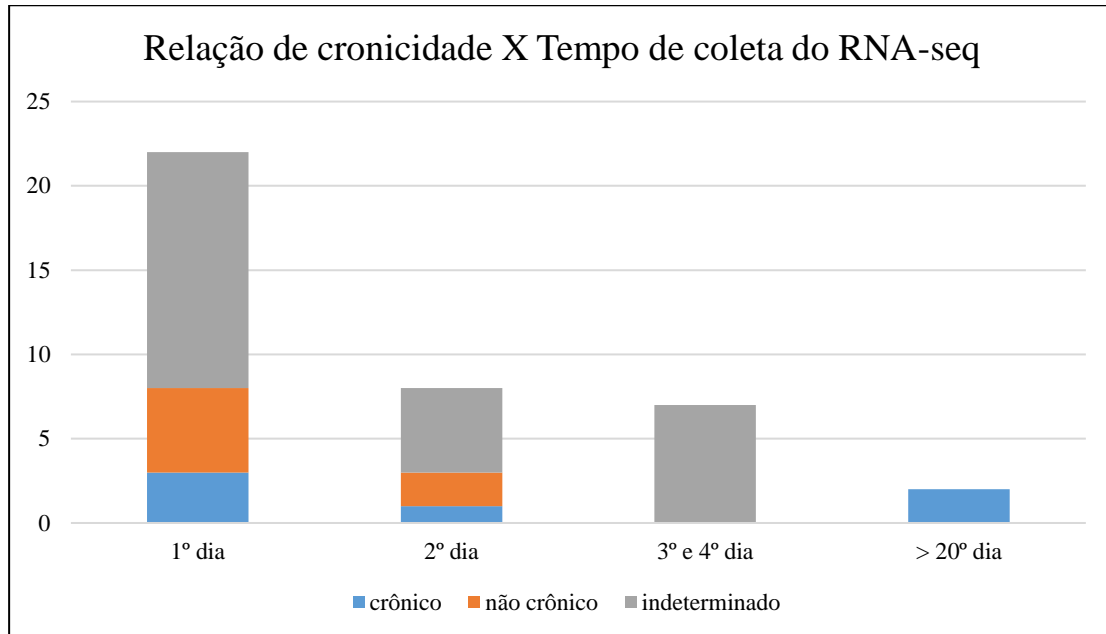
Para a análise das assinaturas moleculares foram avaliados 39 pacientes, onde a maioria dos indivíduos (n = 22) relatou que o início dos sintomas ocorreu no mesmo dia ou 1 dia antes da coleta de sangue, indicando um estágio muito precoce da doença. Oito tiveram sintomas durante 2 dias e sete entre 3 e 4 dias e apenas dois relataram dor por 20 dias ou mais antes da coleta do exame (Gráfico 14). Observou-se que a quantidade de RNA do CHIKV no soro foi maior nos indivíduos que relataram estar no estágio inicial da doença.

**Gráfico 14: Tempo de Coleta do RNA-seq em relação ao início da doença.**



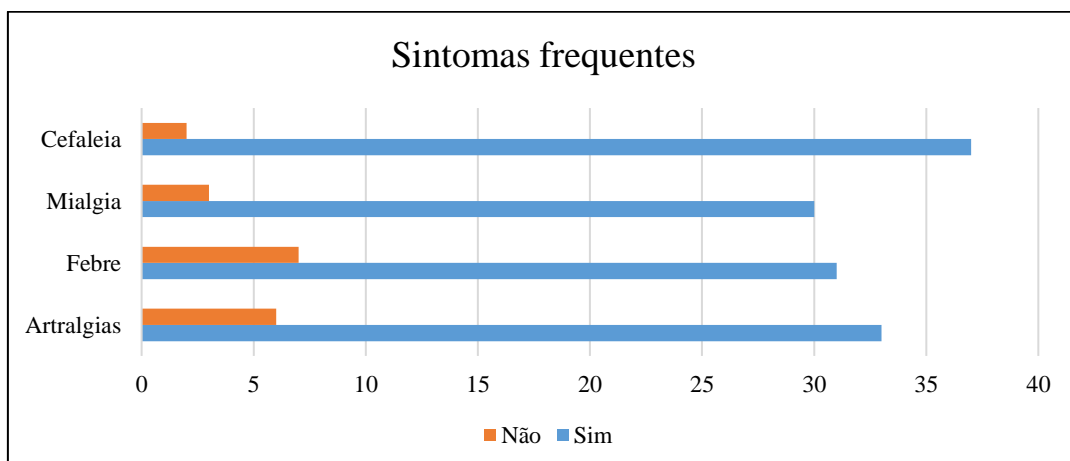
Dos pacientes que coletaram exame no 1º dia de doença, 3 cronificaram e 5 não cronificaram. No 2º dia, 1 cronificou e 2 não cronificaram; já no 3º e 4º dia os pacientes não foram contactados e os dois que coletaram após o 20º dia evoluíram para cronicidade (Gráfico 15).

**Gráfico 15. Relação da cronicidade e tempo de coleta do RNA-seq**



Houve uma predominância do sexo feminino em 61,5% dos pacientes, com uma idade média de  $41,51 \pm 15,84$ . Os sintomas mais frequentes entre os pacientes foram febre, artralgia, cefaleia e mialgia (Gráfico 16).

**Gráfico 16. Sintomas relatados durante a coleta do RNA-seq**



## 5.6.2 Dados Moleculares

### 5.6.2.1 Quantificação do Transcriptoma

Através da análise de correlação entre a expressão gênica e as quantidades de RNA CHIKV no sangue periférico de indivíduos infectados cerca de 3.500 genes foram detectados como associados ao RNA CHIKV. A maioria deles (> 85%) apresentando níveis de expressão negativamente correlacionados com RNA de CHIKV.

### 5.6.2.2 Associação com Expressão Gênica e Quantidade de Vírus

Para a análise de quais transcritos estavam relacionados com a quantidade do CHIKV foi realizado uma Análise de Enriquecimento do Conjunto de Gene (GSEA), utilizando os valores de correlação como rank e Blood Transcription Modules (BTM). Os BTMs associados com células imunes inatas (células dendríticas e neutrófilos), resposta antiviral, inflamação e sinalização de receptores toll-like foram positivamente associados à quantidade de vírus CHIKV. Já os BTMs negativamente associados a quantidade de vírus CHIKV, ou seja, com um escore de enriquecimento normalizado negativo (NES), foram relacionados à resposta imune adaptativa, como proliferação celular, ativação e diferenciação de linfócitos B e linfócitos T, além de quimiocinas e citocinas (Gráfico 17).

**Gráfico 17. Assinaturas moleculares associadas à viremia**

BTNs Expressão Positiva	BTNs com Expressão Negativa
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enriquecido em célula dendrítica ativada (II)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ativação da célula T (I)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Assinatura antiviral de IFN I</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enriquecidos de célula B (I)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detecção viral e imunidade; IRF2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciação de célula T (Th2)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinalização de TLR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enriquecidos em células B (VI)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enriquecidos de receptores mieloides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ativação e sinalização e célula T</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enriquecido em célula dendrítica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Imunoglobulinas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grupo de quimiocinas (I)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ciclo celular (III)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enriquecidos de neutrófilos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•</li> </ul>

(Adaptado do artigo:” Soares-Schanoski et al., 2019.)

Posteriormente com auxílio da bioinformática foi realizado uma rede de genes, sendo observado a conexão daqueles relacionados aos BTMs com escore NES negativo e positivo. Alguns transcritos como CCL5, CD8A e CD8B, CD3D, CD19, CCR7, CAMK4, CD79A e CD79B, CD27, TCF7 entre outros aparecem na rede com expressão negativa. Foi observado que vários desses genes estão relacionados com o recrutamento de linfócitos T efetores/memória, bem como, para a sua ativação e indução do seu estado de memória. De

semelhante forma, o mesmo processo foi realizado para os BTMs com pontuação NES positiva, onde detecta-se a presença de genes como o IRF7, OAS3, IFIT1, MX2, RSAD2 (viperina), SERPING1, por exemplo, todos relacionados à resposta imune inata a infecções viral e alguns são ISGs (genes estimulados por interferon).

Outro gene que foi negativamente correlacionado com a quantidade de RNA do CHIKV foram aqueles relacionados a fatores de iniciação da tradução eucariótica (EIF). Foi construído uma rede com genes EIF, cuja expressão estava correlacionada negativamente ao RNA do CHIKV. Observou-se que apenas o gene EIF2AK2, também conhecido como PKR, teve uma correlação positiva com o RNA do CHIVK no sangue de indivíduos infectados.

### **5.6.2.3 Análise Molecular na Fase Aguda e Crônica**

A análise do transcriptoma na fase crônica foi realizada em apenas 6 pacientes que que cronificaram, comparando com 7 pacientes da fase aguda que não cronificaram.

Dos pacientes que cronificaram, 65% eram do sexo feminino, com uma idade média de  $51,17 \pm 7,38$ ; e dos não crônicos, 71,4% também eram do sexo feminino, com uma idade média menor de  $28,29 \pm 7,04$ . Todos os pacientes crônicos estudados evoluíram com uma doença reumatológica não inflamatória, cujas principais manifestações clínicas foram as tendinites, seguida de artralguas, problemas de coluna e fibromialgia. Nenhum deles apresentou anticorpos positivos e nem evoluíram para complicações.

A diferença no RNA do CHIKV no soro não atingiu significância estatística entre esses dois grupos. Observamos que um total de 1.262 e 1.862 genes foram consistentemente diferencialmente expressos na maioria dos pacientes crônicos e não-crônicos, respectivamente. Destes, 514 foram comumente supra-regulados em ambos os grupos, enquanto 337 genes foram regulados negativamente.

Poucos genes apresentaram uma expressão com comportamento invertido entre pacientes crônicos e não-crônicos. O HLA-DRB5 e NAMPT1 (pseudogene) são alguns exemplos de genes que foram supra-regulados na maioria das amostras não-crônicas e regulados negativamente na maioria das amostras crônicas. Genes como DDX3Y, EIF1AY e LINC00278 foram regulados positivamente na maioria das amostras crônicas e regulados negativamente na maioria das amostras não-crônicas.

## 6 DISCUSSÃO

Devido à grande morbidade osteoarticular que a FC desenvolve com um potencial de cronicidade, a observação de possíveis fatores de risco indutores da artralgia crônica nesses pacientes torna-se de grande importância na evolução dessa doença. Este estudo é de relevância por ser uma coorte de longo seguimento de pacientes com FC ressaltando sua evolução clínica, laboratorial e assinaturas biológicas no contexto dessa infecção.

A cronicidade osteoarticular foi vista em mais da metade dos pacientes acompanhados e os principais fatores associados a ela foram: a idade, sexo feminino, sintomas agudos exacerbados como nível elevado de EVA e mais uso de AINHS na fase aguda; dados condizentes com a literatura. A associação da linfadenopatia com a cronicidade na FC e a positividade do qRT-PCR na fase crônica são achados novos, ainda não descritos.

A pesquisa dos transcritos expressos na FC é relativamente nova, nunca realizada numa coorte brasileira. Esta pesquisa demonstrou que a identificação de genes associados à imunidade inata, principalmente aos ISGs, foi vista na regulação positiva ao RNA CHIKV e diferentemente, os genes com expressão negativa estavam mais associados à imunidade adquirida. Um grupo de genes não associados anteriormente à FC foram os EIFs, o qual demonstrou sua interação de forma complexa na expressão gênica, tanto de forma positiva como de forma negativa nos pacientes; o que deve fomentar interesse para seu estudo na FC.

Na época da investigação inicial do estudo, entre 2015 e 2016 ocorreu uma epidemia de FC no Brasil, especialmente na região Nordeste, com uma taxa de incidência de 127,8 casos/100 mil hab.; sendo que em Sergipe essa taxa chegou a 168,1 casos/100 mil hab., e cerca de 621 casos/100 mil hab em Aracaju, demonstrando uma elevada frequência desta infecção nessa população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Isto pode ser observado nesta pesquisa, já que foi detectado uma frequência aproximada de 65% de FC em pacientes com suspeita de arboviroses.

A possibilidade de coinfeção entre FC e outras arboviroses já foi relatada previamente com a Dengue e a ZIKA. Uma revisão sistemática recente destacou a presença de 43 artigos relacionados à coinfeção das arboviroses, num período de 2008 a 2017 (REBOUÇAS et al., 2018). Há relatos de 73 casos de coinfeção na Nicarágua, sendo mais evidente a associação de FC e Dengue em 43 pacientes e menos frequente da FC com a ZIKA, em apenas 16 pacientes (JESSE et al., 2016). Também há descrições da tripla infecção tanto no estudo da Nicarágua, como em relatos de casos da Colômbia e Estados Unidos (VILLAMIL-GOMEZ; SARDI et al.,

2016). Neste estudo observou-se uma frequência de coinfeção de 5% entre FC e ZIKA. Acredita-se que pelo fenômeno chamado de “aumento dependente de anticorpos”, a exposição de um vírus resulta em doença mais grave quando é sobreposta à infecção por vírus semelhantes. Isto já foi identificado com os diferentes sorotipos da Dengue, porém ainda não está bem esclarecida nas outras coinfeções (WANWISA et al., 2016). Não foi objetivo neste estudo a descrição das manifestações clínicas da coinfeção com ZIKA e FC, porém a raridade da associação deve ser ressaltada nesta pesquisa.

Na fase aguda foi observado uma elevada frequência de artralgia, mialgia e febre com uma média de EVA alta e predominância de poliartrite, denotando um grupo de pacientes bastante sintomáticos, com elevada morbidade osteoarticular. A elevada prevalência do uso de analgésicos e especialmente de corticosteroides, muitas vezes por auto-medicação foi vista nesta pesquisa. Sabe-se que o uso do corticoide e AINEs na fase aguda não é recomendado devido à dificuldade de diagnóstico diferencial entre a FC e outras arboviroses, em especial a Dengue, pois com o risco de sangramento nessa doença, não se deve usar tais medicações nas 02 (duas) primeiras semanas de tratamento. Na época da pesquisa estava ocorrendo uma epidemia em Sergipe, a maioria no interior, e uma grande parte dos pacientes foram tratados em unidades básicas com generalistas, farmacêuticos e até familiares que tinham o desconhecimento do tratamento adequado. A falta de uma recomendação terapêutica padronizada na época e a exacerbada sintomatologia pode ter levado ao uso indiscriminado destes fármacos.

Na atualidade existem recomendações tanto do Ministério da Saúde como da Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) no tratamento da FC, o que deve facilitar o acompanhamento dos pacientes em próximas epidemias (MARQUES et al., 2017; BRITO et al., 2020). No entanto, o uso dos corticosteroides ainda permanece controverso na fase aguda, pois alguns estudos demonstram uma resposta satisfatória com uso de doses baixas de prednisona (10mg/dia) em relação à redução de dor articular e melhora da qualidade de vida (ARROYO ÁVILA; VILA, 2015). Sissoko et al observou que 76% dos pacientes que receberam corticosteroides reportaram satisfação comparadas à 36% dos pacientes em uso somente de analgésicos. Existe uma preocupação se o uso dos corticosteroides iria aumentar a replicação viral levando a uma maior imunossupressão e ativação da doença; entretanto não há um consenso. Estudos com a Dengue não demonstraram alterações significativas na replicação viral na fase aguda com o uso dos corticoides (TRICOU et al., 2010, TAM et al., 2012).

A cronicidade osteoarticular é a principal complicação da FC, denotando uma elevada taxa de morbidade para esta infecção. Foi observado neste trabalho que mais da metade dos pacientes acompanhados desenvolveram uma manifestação articular crônica. Estes dados suportam estimativas anteriores em outras coortes como na Ilha Reunion, a qual demonstrou uma prevalência de cronicidade articular de 45,7% (IC 95 % 45,08 a 50,13), com um tempo médio de acompanhamento de 20 (vinte) meses (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2015). Um estudo de metaanálise envolvendo 38 estudos abrangendo 6532 pacientes portadores de FC, demonstrou que a taxa de cronicidade foi de 43% (IC 95%, 35-52%), e que no primeiro ano de seguimento essa taxa era de 21% (IC 95%,19-22%) (PAIXÃO et al., 2018).

Assim como demonstrado na literatura, também se identificou a persistência de manifestações articulares em pacientes com idade mais avançada e apesar de não ser significativo, uma predominância também no sexo feminino (SISSOKO et al., 2009; ESSACKJEE; GERARDIN et al., 2013). Após a epidemia de 2005-2006 em La Reunion, 36% dos pacientes relataram a persistência dos sintomas 15 meses após o início da doença e 21% relataram pelo menos uma recorrência. Nesse estudo os escores de idade > 45 anos e intensidade da dor demonstraram ser fortes fatores preditores para a cronicidade articular (SISSOKO et al., 2009; ESSACKJEE et al., 2013). Já em Singapura o fator idade não foi considerado relevante, porém ressaltamos o pequeno número de pacientes (n: 30), com uma baixa frequência de cronicidade (13%) nesse estudo (CHOW et al., 2009). Pacientes idosos (> 60 anos) têm carga viral extremamente alta durante a fase aguda em comparação com pacientes mais jovens, isto ocorre devido à dificuldade de depuração viral observada com a imunosenescência caracterizada pela diminuição gradativa da eficácia do sistema imunológico no processo de envelhecimento (ROOSENHOFF et al., 2016). Portanto, esses fatores em idosos pode predispor a persistência de CHIKV e a consequente cronicidade da doença.

Foi visto uma predominância do sexo feminino no grupo que cronicizou, porém sem significância estatística. De maneira consistente, este achado já havia sido relatado anteriormente para artralguas persistentes entre indivíduos infectados pelo CHIKV, na coorte italiana de 2007 (MORO et al., 2012). A força dessa associação também foi postulada na coorte de Gerardin, a qual identificou pelo nível da resposta imune humoral, que os pacientes do sexo feminino apresentaram níveis mais elevados de anticorpos contra o CHIKV do que do sexo masculino (GERARDIN et al., 2013). Acredita-se que os estrógenos estimulam a resposta Th2 para promover a produção de anticorpos ou ao efeito inibitório da dihidro-testosterona (DHS)

no funcionamento das células B (BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005). Por outro lado, também pode ser devido à maior produção de IL-10, que se correlaciona positivamente com o DHS e negativamente com os títulos de IgG3 sérico em pacientes do sexo masculino como observado em outras infecções virais (SUN; TORRES; METZGER, 2010; TORCIA et al., 2012). Esses mesmos mecanismos podem levar à discrepância entre a IgG após a infecção pelo CHIKV entre homens e mulheres. Assim, a possível associação entre níveis elevados de anticorpos IgG CHIKV e persistência de artralguas pode ser mais prevalente em pacientes do sexo feminino, o que foi identificado na coorte italiana, onde 66,5% dos pacientes apresentaram cronicidade, principalmente observadas em idosos, no sexo feminino, com persistência de IgG CHIKV após 12 meses de evolução (MORO et al., 2012).

Hoarau também sugeriu uma ligação entre doença crônica e uma resposta inflamatória Th1 mais forte à infecção aguda (HOARAU et al., 2010). Pacientes com doença crônica apresentaram maior inflamação sistêmica durante a fase aguda (níveis mais altos de PCR) potencialmente associados a níveis elevados de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 e IL-12, embora essas diferenças não tenham sido significativas. Por outro lado, as citocinas Th2 como a IL-4 e IL-13 tenderam a ser produzidas em menor quantidade durante a fase aguda nos pacientes em progresso para doença crônica.

O envolvimento articular proeminente na fase aguda com edema e rigidez articular, poliartrite e tenossinovite também vêm sendo apontado como fator de risco para tal cronicidade (STAIKOWSKY et al., 2009; THIBERVILLE et al., 2013). Sabe-se que nas formas agudas severas existe uma correlação positiva entre os níveis séricos da carga viral e concentração do IFN I, levando a uma exacerbada resposta imunológica na tentativa do controle da infecção (SCHILTE et al., 2010). Uma das teorias da cronicidade seria a persistência viral e reduzida depuração, seguida de desregulação dos mecanismos regulatórios da resposta imune. Uma pesquisa revelou que o RNA CHIKV tem uma meia-vida longa de 10 a 11 dias e existe ainda estimulação da resposta do IFN 60 dias pós-infecção, o que pode justificar a associação de sintomas agudos proeminentes e a cronicidade da doença pela elevada resposta do IFN (POO et al., 2014). Esta pesquisa observou que a presença de artralgia e mialgia foram características determinantes nos pacientes que cronificaram, além do EVA elevado e uso de AINEs que foram fatores independentes também; características estas observadas nas formas severas da FC. Não foi realizada a dosagem das citocinas inflamatórias nem da carga viral neste estudo, mas pode-

se sugerir que nas formas agudas mais severas, assim como demonstrado na literatura, existe uma maior carga viral podendo estar associado à cronicidade dessa coorte.

A linfadenopatia também foi identificada neste estudo como fator predominante na cronicidade, apesar de não ser descrita na literatura. Postula-se que o CHIKV seja capaz de modular o fenótipo do macrófago, impedindo um sistema imune eficiente capaz de combater a infecção, levando a sintomas crônicos e persistência do processo inflamatório (LABADIE et al., 2010; KUMAR et al., 2012). Sabendo que a principal célula responsável pelo escape viral é o macrófago, a presença da linfadenopatia encontrada neste estudo, pode inferir uma reatividade do sistema imunológico, colaborando com a teoria da ineficácia do sistema imune na cronicidade da FC.

Dentre as manifestações reumatológicas crônicas destaca-se a presença das doenças não inflamatórias. Há relatos de persistência de artralguas acima de 79% (DUVIGNAUD, 2018), alopecia, depressão, fadiga e distúrbios do sono, sintomas comuns na fibromialgia; patologia também observada em nosso estudo. As principais articulações acometidas foram as das mãos e tornozelos, semelhantes às de outras coortes (SURBHIER, 2019) e geralmente comprometem as mesmas articulações da fase aguda. A presença de DAIC nesta pesquisa se assemelha ao da literatura, com a presença de uma poliartrite inflamatória indiferenciada, caracterizada por tendinite e tenossinovite (JAVELLE et al., 2015). Foi observado a presença também de 04 (quatro) casos de doenças reumatológicas autoimunes, concordando com evidências que indicam o desenvolvimento destas doenças pós-infecção pelo CHIKV. Acredita-se que o CHIKV pode ser um gatilho no desenvolvimento da Artrite Reumatoide e das Espondiloartrites, principalmente pela autoimunidade e produção de anticorpos durante a infecção. Neste estudo a frequência de positividade do Fator Reumatoide foi baixa, porém as prevalências na literatura são bem variáveis (MARQUES et al., 2017).

Antecedentes de doenças osteoarticulares foi associado à persistência de sintomas articulares em pacientes após infecção por FC (YASENN et al., 2014). Em pacientes com doenças crônicas como artrose, tendinopatias, lombalgia e síndrome do túnel do carpo, é descrita uma exacerbação das queixas álgicas nos locais previamente acometidos. Entretanto, na presença de doenças de caráter inflamatório como AR, EPAs e LES, uma avaliação de pacientes na Martinica não identificou casos de exacerbação de AR pós-chik, questionando-se um possível efeito protetor da terapia prévia com drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) e/ou imunobiológicos (BLETERRY et al., 2016). A presença de antecedentes

reumatológicos apesar de ser mais frequente nos pacientes que cronicaram, não foi considerado fator independente para cronificação neste estudo.

A positividade do qRT-PCR na fase aguda é esperada pois é um exame que denota a replicação viral, e quanto mais precoce a coleta maior sua positividade (JOHNSON; RUSSELL; GOODMAN, 2016). Observou-se neste trabalho que cerca de 75% foram positivos na fase aguda até o 3º dia de coleta. De forma interessante foi notado que 73% dos pacientes que fizeram este exame na fase crônica também foram positivos. Isso pode estar associado à teoria de persistência viral na patogênese crônica da FC. Há relatos de isolamento viral na sinóvia de pacientes 18 meses após a infecção, além da presença do CHIKV em primatas não humanos três meses após a infecção (HOARAU et al., 2013; ROSENHOFF et al., 2016).

Esta pesquisa é a primeira vista na literatura que demonstra a presença de positividade do qRT-PCR em humanos na fase crônica da FC. Só foi coletado o qRT-PCR na primeira consulta e devido às limitações financeiras e operacionais não se conseguiu o acompanhamento trimestral de tal exame, portanto não se pode ver a evolução durante os 02 (dois) anos. Entretanto, apesar de ser encontrado uma alta frequência de positividade do qRT-PCR nos pacientes crônicos, não foi identificado diferenças significativas nas manifestações clínicas e evolução destes pacientes em relação aos pacientes crônicos com qRT-PCR negativos. Talvez não tenha sido observado diferenças pelo fato deste exame não ser seriado, portanto, não ser conhecido a evolução dele. Outra razão é que o perfil bastante sintomático dos pacientes, independente da positividade do exame, pode sugerir que não só a persistência viral, mas outras alterações do sistema imunológico, genéticas e demográficas estariam associadas à cronicidade osteoarticular na FC.

A maioria dos estudos direcionados ao tratamento específico da artrite crônica pós-chikungunya apresentam muitas limitações metodológicas, com falta de randomização, população heterogênea e diferentes doses terapêuticas, o que dificulta uma análise adequada (BRITO et al., 2020). Nesta pesquisa, o tratamento na fase crônica foi realizado no serviço de reumatologia o que facilitou o diagnóstico e o tratamento adequado dos pacientes.

O uso de analgésicos comuns e opioides, inclusive com a associação de antidepressivos e anticonvulsivantes foi utilizado para as formas refratárias de dor crônica, e com presença de dor neuropática; que pode estar presente em cerca de 30% dos pacientes, sendo muitas vezes negligenciadas (SCHILTE et al., 2013; BRITO et al., 2020).

Ressalta-se que o uso dos corticoides foi visto em quase metade dos pacientes (42%), e apesar das baixas evidências de eficácia, foi observado uma boa evolução e índices de satisfação, com redução da nota do EVA no seguimento dos dois anos; o que foi identificado também em outros estudos (SISSOKO et al., 2009; SCHITLÉ et al., 2013; JAVELE et al., 2015; ROSARIO et al., 2015).

Apesar de não haver um consenso sobre dose, tempo de uso e qual tipo de DMCDs é recomendado na artrite crônica da FC, neste estudo foi recomendado o uso da cloroquina e metotrexate, porém restritos aos pacientes com manifestações inflamatórias, com objetivo de modular a resposta inflamatória e ser poupador de corticoide. O estudo de Ravindran avaliando o uso da HQ na FC randomizou dois grupos: 37 pacientes permaneceram com HCQ em monoterapia (400 mg/dia) e 35 passaram a receber um esquema combinado de HCQ, metotrexate (MTX, 15 mg/semana) e sulfassalazina (SSZ, 1 g/dia). Após 24 semanas, o grupo que usou a terapia combinada apresentou melhoria significativa em todos os parâmetros de atividade de doença (RAVINDRAN; ALIAS, 2016). Outro estudo com duração de 24 semanas, comparou o uso de um AINH com a cloroquina nos pacientes crônicos de FC. No fim do tempo de acompanhamento foi observada melhoria geral da dor por EVA, número de articulações dolorosas e edemaciadas, função articular e VHS nos dois grupos, sem diferenças estatísticas entre eles (CHOPRA et al., 2014). Esses resultados sugerem que em um paciente com contraindicação para o uso de AINE, e quando necessário o uso de medicação por longo prazo o uso do antimalárico poderia ser uma opção efetiva no tratamento da dor articular crônica da FC.

Muitos estudos longitudinais de acompanhamento de pacientes na fase crônica da FC incluem o MTX no manejo dos sintomas articulares, embora a maioria deles seja de estudos abertos não controlados ou séries de casos. Nas Ilhas Reunion, dos 159 pacientes que desenvolveram doença reumática estabelecida pós-infecção pelo CHIKV, 77% receberam MTX (dose média semanal de 15 mg). Após um período médio de 25 meses, houve resposta positiva ao MTX em 75% dos casos (JAVELLE et al., 2015). Na Martinica, 27 pacientes que apresentaram artropatia crônica ocasionada pela FC (sem diagnóstico reumatológico prévio) receberam MTX (dose média de 21 mg/sem), com boa resposta em 21 casos (77,7%) e tempo médio de acompanhamento de seis meses (BLETTYERY et al., 2016). Enfim, não existe um consenso nos diversos estudos sobre qual seria o tempo ideal em que o MTX deve ser usado na fase crônica ou quando deve ser interrompido. No acompanhamento da atividade inflamatória

nesta pesquisa foi observado uma redução do índice do DAS28 e do EVA com o uso da associação dos corticosteroides e DMCDs.

A morbidade da FC é sobretudo osteoarticular, porém há relatos de complicações neurológicas, infecciosas e vasculares, podendo elevar a mortalidade dessa doença (FRUTUOSO et al., 2020). O estado de hipercoagulabilidade é visto em outras infecções virais, ao liberar substâncias pró-coagulantes que aumentam a adesão plaquetária (GOEIJENBIER et al., 2012). Acredita-se que na FC não somente as injúrias endoteliais, como as restrições locomotoras e uso de medicações que afetam o estado de coagulação sanguínea estão associadas ao risco de Trombose venosa nesses pacientes (RAMACCIOTTI et al., 2019). Nesta pesquisa foi identificado dois casos de Trombose Venosa Profunda de membros inferiores, favorecendo essa relação do CHIKV com alterações vasculares.

Esta pesquisa realizou uma curva de sobrevida para analisar a cronicidade ao longo do tempo, sendo detectado que a partir de 01 ano a probabilidade de cronificação aumenta significativamente. A maioria dos estudos avalia apenas a frequência de cronicidade e seus fatores associados (PAIXÃO et al., 2018), todavia, até o momento não tinha sido observado uma curva de sobrevida nesses pacientes, portanto desconhecia-se o comportamento da evolução da cronicidade; o que torna estes dados interessantes e inovadores.

Atualmente, o estudo da fisiopatologia das doenças infecciosas tornou-se mais eficaz através de alguns métodos como as ferramentas biológicas, as quais levam a um melhor entendimento da imunidade induzida por infecção. Ainda permanecem obscuros alguns aspectos da fisiopatologia da FC e através desse estudo podemos investigar a resposta inicial do hospedeiro à infecção aguda por Chikungunya usando uma abordagem biológica sistêmica.

Existem outros estudos relevantes relacionados à infecção natural pelo CHIKV, mas são focados na análise dos níveis de proteína com um número ainda limitado de análises do transcriptoma (SIMARMATA et al., 2016; WILSON et al., 2017). Recentemente um estudo abrangente usando ferramentas biológicas de sistemas também trouxe informações essenciais sobre a resposta imune do CHIKV, porém de uma população pediátrica (MICHELMAYR et al., 2018). É importante salientar que as características clínicas, laboratoriais e aspectos fisiopatológicos parecem ser diferentes entre adultos e crianças na FC, ressaltando a importância do estudo em uma população adulta. Este estudo descreveu algumas assinaturas moleculares que foram correlacionadas às cargas virais e ao início dos sintomas, várias

modificações do transcriptoma sanguíneo produzidas pela infecção pelo CHIKV e DEGs em pacientes crônicos e não crônicos.

Semelhante a outras infecções virais, na tentativa de controlar rapidamente o processo infeccioso, foi observado na fase aguda uma maior frequência de genes com regulação positiva para o RNA-viral que desempenham papéis na resposta imune antiviral, sendo muitos deles ISGs (CHIRATHAWORN et al., 2013; LIAN et al., 2014; WILSON et al., 2017; MICHLMAYR et al., 2018). Consistente com outros relatos que investigaram subgrupos de células imunes durante a infecção por CHIKV (HOARAU et al., 2010 ; HER et al., 2010; MICHLMAYR et al., 2018), os genes supraregulados mais frequentes foram relacionados a produção e diferenciação de neutrófilos e populações mielóides, especialmente células dendríticas e monócitos. Interessante, pois os monócitos têm sido relatados recentemente como importantes mediadores inflamatórios e reguladores da resposta imune inata de diferentes arbovírus (KWISSA et al., 2014; MICHLMAYR et al., 2017). Além disso, estes resultados também trazem novas assinaturas moleculares relacionadas a subpopulações celulares que pertencem à resposta imune adaptativa.

Por outro lado dentre os módulos com regulação negativa destacaram-se aqueles que compõem a ativação, diferenciação, assinatura e sinalização de linfócitos T e/ou B. É intrigante notar que alguns genes importantes que poderiam preparar o hospedeiro para uma resposta imune adaptativa satisfatória são regulados negativamente no início da doença. De fato, o papel dos linfócitos T na fisiopatologia da infecção pelo CHIKV ainda é incerto.

Dentre os genes regulados positivamente a presença do IRF7 é relevante por ser um importante indutor de resposta IFN tipo I, assim como os OAS3, IFIT1, MX2, RSAD2 (viperina) que são efetores antivirais já descritos em outras alfaviroses (BREHIN, 2009; SCHWARTZ; ALBERT, 2010) . A presença do SERPING1 (inibidor do C1) é um achado novo, pois ao inibir a via clássica do complemento agiria no controle do processo inflamatório vascular, porém não havia associação com vírus artritogênico, apesar de ser descrito em monócitos na infecção do HIV (SANFILIPPO et al., 2017). Assim, estes genes poderiam ser considerados em estudos futuros de mecanismos moleculares específicos de infecção por CHIKV, pois sua sintomatologia é diferente de outras infecções virais.

A expressão de vários fatores de iniciação da tradução eucariótica foi negativamente correlacionada com a quantidade de RNA do CHIKV, indicando que esses genes podem desempenhar um papel importante na replicação viral ao controlar o processo de iniciação da

tradução e síntese de proteínas virais (WALSH, MOHR, 2011). Curiosamente este estudo observou que o gene EIF2AK2, também conhecido como PKR (proteína quinase R), teve uma correlação positiva com o RNA do CHIKV no sangue de indivíduos infectados, pois esta proteína é ativada pela infecção do alfavírus levando a uma tradução preferencial do RNA viral em detrimento das proteínas da célula hospedeira. Isto ocorre pois o CHIKV induz a fosforilação da eif2 $\alpha$  ao ser ativada pela PKR o que gera uma inibição da tradução do mRNA da célula do hospedeiro, aumentando a replicação viral.

A análise de RNA-Seq destacou alguns potenciais marcadores candidatos à cronificação da artralgia. Na comparação entre os pacientes crônicos e não crônicos, poucos genes apresentaram um comportamento invertido, porém foi visto que alguns genes foram supregulados na forma crônica e infraregulados nos não crônicos. O gene DDX3Y que é uma RNA helicase já foi descrito como um importante efetor da replicação e propagação do vírus do herpes (KHADIVJAM et al., 2017), mas não havia sido descrita no contexto do CHIKV. Outro gene é o EIF1AY, que pertence à família de fatores de iniciação da tradução eucariótica e tem um papel importante como regulador da tradução de mRNA viral em células infectadas com diferentes vírus (WALSH, MOHR, 2011). Além disso, a correlação negativa e forte entre a viremia e a maioria dos genes membros da família EIFs observada aqui, não havia sido descrita anteriormente em infecções por CHIKV, e especula-se se isto não poderia ser um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra a replicação do vírus.

Por ser extremamente difícil adquirir dados suficientes de indivíduos naturalmente infectados, para serem utilizados em modelos biológicos de análise de sistemas, este tipo de pesquisa é relativamente nova. Assim através destes resultados, pode-se considerar os fatores de iniciação da tradução eucariótica como marcadores atraentes da cronicidade da artralgia do CHIKV, mas ainda faltam estudos mais profundos para melhor caracterizar suas funções durante as diferentes fases da infecção.

## 7 CONCLUSÕES

Neste estudo, a FC apresentou-se como uma doença bastante sintomática na fase aguda, com elevada morbidade e uma frequência de cronicidade em cerca de metade dos casos. Os principais fatores associados à cronicidade foram a idade, sexo feminino e sintomas de fase aguda mais exacerbada como a artralgia, mialgia, linfadenopatia e uso de AINEs.

A positividade do qRT-PCR, que denota a presença do CHIKV, foi observada não somente nos pacientes da fase aguda, mas em 73% dos casos crônicos, todavia, não foram observadas diferenças clínicas e da evolução na comparação dos pacientes com qRT-PCR positivos e negativos.

Na análise do comportamento da cronicidade em relação ao tempo, identificou-se que após 90 dias a frequência de cronicidade foi de 10,5%, aumentando gradativamente, chegando a 30% no primeiro ano.

Os principais sintomas reumatológicos crônicos foram as doenças não inflamatórias, seguido das DAICs e das doenças crônicas autoimunes. Com a terapêutica realizada ao longo de dois anos utilizando analgésicos, corticosteroides, antidepressivos, antineuropáticos e quando necessário os DMCDs, foi observado uma redução do EVA, e do DAS28, principalmente nos pacientes com doença inflamatória e autoimune.

O estudo da expressão pelo RNA-seq foi fundamental para a pesquisa da variedade dos transcritos relacionados à infecção do CHIKV, inclusive com a descoberta de novos genes. Na tentativa do controle da infecção, foi identificado que a presença de genes regulados positivamente foram aqueles relacionados à produção de neutrófilos e populações mielóides, especialmente células dendríticas e monócitos como IRF7 e o SERPING1. De forma contrária os genes regulados negativamente para o RNA viral, foram os associados a diferenciação dos linfócitos, além dos EIFs, com exceção do EIF2AK2; destacando seu importante papel na replicação viral, mas que não tinham sido associados à FC até o momento. Alguns genes associados à cronicidade também foram encontrados, como o DDX3Y e EIF1AY, também ainda não relacionados à FC.

A morbidade osteoarticular na FC, principalmente devido ao seu aspecto crônico, apresentam incertezas na sua fisiopatologia e evolução, havendo poucos relatos de fatores preditores de cronicidade osteoarticular na FC. Esses achados clínicos e de assinaturas moleculares podem contribuir e fomentar estudos futuros esclarecedores para o tratamento e prevenção da FC.

## 8 REFERÊNCIAS

ALI OU ALLA, S.; COMBE, B. Arthritis after infection with chikungunya virus. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 25, n. 3, p. 337-46, 2011. doi: 10.1016/j.berh.2011.03.005.

ALVARADO, L.I.; LORENZI, O.D.; TORRES-VELÁSQUEZ, B.C.; SHARP, T.M.; VARGAS, L.; MUÑOZ-JORDÁN, J.L. et al. Distinguishing patients with laboratory-confirmed chikungunya from dengue and other acute febrile illnesses, Puerto Rico, 2012-2015. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 7, e0007562, 2019. doi.10.1371/journal.pntd.0007562.

AMARAL, J.K.; BILSBORROW, J.B.; SCHOEN, R.T. Brief report: the disability of chronic chikungunya arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 38, n. 7, p. 2011-14, 2019.

AMARAL, J.K.; SUTARIA, R.; SCHOEN, R. Treatment of chronic Chikungunya arthritis with methotrexate: a systematic review. **Arthritis Care Res**, v. 70, n. 10, p. 1501-8, 2018.

AMARAL, J.K.; TAYLOR, P.C.; TEIXEIRA, M.M.; MORRISON, T.E.; SCHOEN, R.T. The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. **Viruses**, v. 11, n. 3, 2019.

ARROYO–AVILA, M.; VILA, L.M. Rheumatic Manifestations in patients with chikungunya infection. **P R Health Sci J**, v. 34, n. 2, p. 71–77, 2015.

AZEVEDO, R.S.; OLIVEIRA, C.S.; VASCONCELOS, P.F., et al. Risco do chikungunya para o Brasil. **Rev Saúde Pública**, v. 49, n. 58, p. 1-6, 2015. doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049006219.

BASTIEN, B. Systemic Lupus Erythematosus and Chikungunya Fever: Interactions during the 2014 outbreak in Martinique. **Meeting: 2015 ACR/ARHP Annual Meeting** Date of first publication: ABSTRACT NUMBER: 1842, September 29, 2015.

BESERRA, F.L.; OLIVEIRA, G.M.; MARQUES, T.M.; FARIAS, L.A.; SANTOS, J.R., et al. Clinical and laboratory profiles of children with severe chikungunya infection. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, n. 3, e20180232, 2019.

BETANCUR, J.F.; NAVARRO, E.P.; ECHEVERRY, A., et al. Hyperferritinemic syndrome: Still's disease and catastrophic antiphospholipid syndrome triggered by fulminant chikungunya infection: a case report of two patients. **Clinical of Rheumatology**, v. 34, n. 11, p. 1989-92, 2015.

BETANCUR, J.F.; NAVARRO, E.P.; BONILLA, J.H., et al. Catastrophic antiphospholipid syndrome triggered by fulminant chikungunya infection in a patient with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatology**, v. 68, n. 4, p. 1044, 2016.

BIGEARD, B.; POLOMAT, K.; JAVELLE, E.; ARFI, S.; BRUNIER-AGOT, L.; MOINET, F., et al. Systemic lupus erythematosus and chikungunya fever: interactions during the 2014 outbreak in Martinique [abstract]. **Arthritis Rheumatol**, v. 67, suppl 10, 2015.

BLETTERY, M.; BRUNIER, L.; POLOMAT, K.; MOINET, F.; DELIGNY, C.; ARFI, S., et al. Management of chronic post-chikungunya rheumatic disease: the Martinican experience. **Arthritis Rheumatol**, v. 68, n. 11, p. 2817–24, 2016. doi: 10.1002/art.39775.

BOUMAN, A.; HEINEMAN, M.J.; FAAS, M.M. Sex hormones and the immuneresponse in humans. **Hum Reprod Update**, v. 11, n. 4, p. 411-423, 2005.

BRAY, A.; JOHNSON, H.; RAFF, L.; WALTER, R.; BREAKWELL, L., et al. Essential cell biology. 3rd ed. 2009 Semliki Forest virus nonstructural protein 2 is involved in suppression of the type I interferon response. **J Virol**, v. 81, n. 16, p. 8677–8684, 2007.

BREHIN, A.C. The large form of human 2', 5'oligoadenylate synthetase (OAS3) exerts antiviral effect against chikungunya virus. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 216–222, 2009.

BRITO, C.A.; MARQUES, C.D.; FALCÃO, M.B.; CUNHA, R.V.; SIMON, F.; VALADARES, L.D.; et al. Update on the treatment of musculoskeletal manifestations in chikungunya fever: a guideline. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 53, n. 4, e20190517, 2020.

BRUNIER, L.; POLOMAT, K.; DELIGNY, C.; DEHLINGER, V.; NUMÉRIC, P.; JEAN BAPTISTE, G., et al. Chikungunya virus infection in patients on biotherapies. **Joint Bone Spine**, v. 83, n. 2, p. 245–6, 2016.

BURT, F.J.; ROLPH, M.S.; RULLI, N.E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M.T., et al. Chikungunya: a re-emerging vírus. **Lancet Infect Dis**, v. 379, n. 9816, p. 662-71, 2012.

CARRILLO-HERNANDEZ, M.Y.; RUIZ-SAENZ, J.; VILLAMIZAR, L.J.; GOMEZ-RANGEL, S.Y. & MARTINEZ-GUTIERREZ, et al. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and Zika viruses in patients with febrilesyndrome at the Colombian–Venezuelan border. **BMC Infect Dis**, v. 18, n. 61, p. 1-12, 2018.

CARVALHO, R.G.; OLIVEIRA, L.R.; BRAGA, I.A., et al. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 787–96, 2014. doi.org/10.1590/0074-0276140304.

CDC, 2014 a. Clinical Evaluation & Disease. **Center for Disease Control and Prevention**. <http://www.cdc.gov/chikungunya/hc/clinicalevaluation.html>. Acesso em 08/09/2014

CHIRATHAWORN, C.; POOVORAWAN, Y.; WUTTIRATTANAKOWIT, N.; LERTMAHARIT, S., et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pac J Trop Med**, v. 6, n. 8, p. 631–4, 2013. doi: 10.1016/S1995-7645(13)60108-X.

CHOPRA, A.; ANURADHA, V.; GHORPADE, R., et al. Acute chikungunya and persistent musculoskeletal pain following the 2006 Indian epidemic: a 2-year prospective rural community study. **Epidemiol Infect**, v. 140, n. 5, p. 842–50, 2012.

CHOPRA, A.; SALUJA, M.; VENUGOPALAN, A., et al. Effectiveness of Chloroquine and inflammatory cytokine response in patients with early persistent musculoskeletal

pain and arthritis following chikungunya virus infection. **Arthritis Rheumatol**, v. 66, n. 2, p. 319–26, 2014. doi: 10.1002/art.38221.

CHOW, A.; HER, Z.; ONG, E.K.; CHEN, J.M.; DIMATATAC, F., et al. Persistent arthralgia induced by chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **J Infect Dis**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2009.

COUDERC, T. A mouse model for chikungunya: Young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, e29, p. 1-12, 2008.

COUDERC, T.; LECUIT, M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. **Antiviral Research**, v. 121, p. 120-131, 2015. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.07.002.

CROSBY, L.; PERREAU, C.; MADEUX, B.; COSSIC, J.; ARMAND, C.; HERRMANN-STORKE, C., et al. Severe manifestations of chikungunya virus in critically ill patients during the 2013-2014 Caribbean outbreak. **Int. J Infect Dis**, v. 48, p. 78–80, 2016. doi: 10.1016/j.ijid.2016.05.010.

DEEBA, I.M.; HASAN, M.M.; AL MOSABBIR, A.; SIAM, M.H.; ISLAM, M.S.; RAHEEM, E., et al. Manifestations of Atypical Symptoms of Chikungunya during the Dhaka Outbreak (2017) in Bangladesh. **Am J Trop Med Hyg**, v. 100, n. 6, p. 1545-48, 2019. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0122>.

DIAS, J.P.; COSTA, M.C.; CAMPOS, G.S.; PAIXÃO, E.S.; NATIVIDADE, M.S.; BARRETO, F.R., et al. Seroprevalence of chikungunya virus after its emergence in Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 24, n. 9, p. 1773, 2018.

DUARTE, A.L.; MARQUES, C.D.; SANTOS, P.R.; RANZOLIN, A.; CAVALCANTI, N.G.; OCÉA, R.A., et al. Chikungunya outbreak in Brazil: demographic and clinical characterization of 732 patients – chikbrazil cohort. **Annals of the Rheumatic Diseases**. EULAR. 17 June, p. 987-988, 2017

DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; MARION, N; BRUN, S; LE GRAND, R; ROQUES, G; GRAS, P., et al. Chikungunya Disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 3, e1446, p. 1-10, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001446.

DUVIGNAUD, A. Rheumatism and chronic fatigue, the two facets of post-chikungunya disease: the TELECHIK cohort study on Réunion Island. **Epidemiol Infect**, v. 146, n. 5, p. 633–641, 2018. doi: 10.1017/S0950268818000031.

ESSACKJEE, K.; GOORAH, S.; RAMCHURN, S.K.; CHEENEESHASH, J.; WALKER-BONE, K. Prevalence of and risk factors for chronic arthralgia and rheumatoid-like polyarthritis more than 2 years after infection with chikungunya virus. **Post Grad Med J**, v. 89, n. 1054, p. 440–7, 2013. doi: 10.1136/postgradmedj-2012-131477.

FARIAS, L.A.; PIRES NETO, R.D.; LEITE, R.D. Extensive vesiculobullous exanthema following chikungunya fever in a 13-year-old patient. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, n. 4, e20190015, 2019.

FRITEL, X.; ROLLOT, O.; GÉRARDIN, P.; GAUZERE, B.A.; BIDEAULT, J., et al. Chikungunya virus infection during pregnancy, Réunion, France. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, n. 3, p. 418-25. doi: 10.3201/eid1603.091403.

FROS, J.J.; LIU, W.J.; PROW, N.A., et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. **J Virol**, v. 84, n. 20, p. 10877–10887, 2010. doi: 10.1128/JVI.00949-10.

FRUTUOSO, L.V.; FREITAS, A.R.; CAVALCANTI, L.P.; DUARTE, E.C. Estimated mortality rate and leading causes of death among individuals with chikungunya in 2016 and 2017 in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 53, e20190580, 2020.

GANESAN, V.K.; DUAN, B.; REID, S.P. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 368-72, 2017. doi:10.3390/v9120368

GARDNER, J.; RUDD, P.A.; PROW, N.A.; BELARBI, E.; ROQUES, P.; LARCHER, M., et al. Infectious chikungunya virus in the saliva of mice, monkeys and humans. **PLoS One**, v. 10, p. 10, e0139481, 2015. doi.org/10.1371/journal.pone.0139481.

GÉRARDIN, P.; FIANU, A.; MICHAULT, A.; MUSSARD, C.; BOUSSAÏD, K.; ROLLOT, O.; GRIVARD, P.; KASSAB, S.; BOUQUILLARD, E.; BORGHERINI, G.; GAÜZÈRE, B.A.; MALVY, D.; BRÉART, G.; FAVIER, F. Predictors of chikungunya rheumatism: a prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. **Art Res Ther**, v. 15, n. 1, 2013. R9

GOEIJENBIER, M.; WISSEN, M.; VAN DE WEG, C., et al. Review: viral infections and mechanisms of thrombosis and bleeding. **J Med Virol**, v. 84, n. 10, p. 1680-96, 2012.

GRIFFITH, M., et al. Informatics for RNA Sequencing: A Web Resource for Analysis on the Cloud. **PLoS Computational Biology**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2015.

HEATHER, J.M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1-8, 2016. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.

HER, Z. Active infection of human blood monocytes by chikungunya virus triggers an innate immune response. **J Immunol**, v. 184, n. 10 p. 5903–5913, 2010. doi: https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904181.

HER, Z.; MALLERET, B.; CHAN, M., et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. **J Immunol**, v. 184, p. 5903–13, 2010.

HOARAU, J.J.; JAFFAR BANDJEE, M.C.; KREJBICH, TROTOT, P., et al. Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010. doi: 10.4049/jimmunol.0904181.

HOARAU, J.J.; GAY, F.; PELLE, O., et al. Identical strength of the T cell responses against E2, nsP1 and capsid CHIKV proteins in recovered and chronic patients after the epidemics of 2005–2006 in La Reunion Island. **PLoS One**, v. 8, n. 12, e84695, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0084695.

HORCADA, M.L.; DIAZ-CALDERON, C.; GARRIDO, L., et al. Chikungunya fever rheumatic manifestations of an emerging disease in Europe. **Reumatol Clin**, v. 11, n. 3, p. 161-4, 2015. doi: 10.1016/j.reuma.2014.07.005.

HUGGETT, J.; DHEDA, K.; BUSTIN, S.; ZUMIA, A., et al. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. **Genes Immun**, v. 6, n. 4, p. 279-284, Jun 2005.

INAMADAR, A.C.; PALIT, A.; SAMPAGAVI, V.V.; RAGHUNATH, S.; DESHMUKH, N.S., et al. Cutaneous manifestations of chikungunya fever: observations made during a recent outbreak in south India. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 2, p. 154-9, 2008. doi: 10.1111/j.1365-4632.2008.03478.x.

JAVELLE, E.; TIONG, T.H.; LEPARC-GOFFART, I., et al. Inflammation of the external ear in acute chikungunya infection: experience from the outbreak in Johor Bahru, Malaysia, 2008. **Journal of Clinical Virology**, v. 59, p. 270-3, 2014. doi: 10.1016/j.rmu.2015.06.001.

JAVELLE, E.; RIBERA, A.; DEGASNE, I., 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, 2015. doi: org/10.1371/journal.pntd.0003603.

JESSE, J.; WAGGONER, L.G.; VARGAS, M.J; BALLESTEROS, G.; TELLEZ, Y., et al. Viremia and clinical presentation in Nicaraguan patients infected with Zika virus, chikungunya virus, and dengue virus. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 12, p. 1584–1590, Dec 2016.

JOHNSON, B.W.; RUSSELL, B.J.; GOODMAN, C.H. 2016. Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. **J Infect Dis**, v.214, n. suppl 5, p. S471-S474, 2016. doi: 10.1093/infdis/jiw274.

JOUBERT, P.E.; WERNEKE, S.W.; DE LA CALLE, C.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; GIODINI, A.; PEDUTO, L.; LEVINE, B.; SCHWARTZ, O.; LENSCHOW, D.J.; ALBERT, M.L., et al. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **J Exp Med**, v. 209, n. 5, p. 1029–1047, 2012. doi: 10.1084/jem.20110996.

KHADIVJAM, B.; STEGEN, C.; HOGUE-RACINE, M.A.; BILALI, E.N.; DOHNER, K.; SODEIK, B., et al. The ATP-dependent RNA Helicase DDX3X modulates Herpes Simplex virus 1 gene expression. **J Virol**, v. 91, n. 8, 2017. doi: 10.1128/JVI.02411-16.

KHAN, M., SANTHOSH, S.R., TIWARI, M., LAKSHMANA RAO, P.V; PARIDA, M. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against chikungunya virus in vero cells. **J Med Virol**, v. 82, n. 5, p. 817-24, May 2010.

KUCUKDEVECI, A.A.; ORAL, A.; ILIEVA, E.M.; VARELA, E.; VALERO, R.; BERTEANU, M., et al. Inflammatory arthritis the role of physical and rehabilitation medicine

physicians. The European perspective based on the best evidence. A paper by the Section Professional Practice Committee. **Eur J Phys Rehabil Med**, v. 49, n. 4, p. 551–64, 2013.

KUMAR, S.; JAFFAR-BANDJEE, M.C.; GIRY, C., et al. Mouse macrophage innate immune response to chikungunya virus infection. **Virology**, v. 9, n. 313, 2012. doi: 10.1186/1743-422X-9-313.

KWISSA, M.; NAKAYA, H.I.; ONLAMOON, N.; WRAMMERT, J.; VILLINGER, F.; PERNG, G.C., et al. Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+), CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. **Cell Host Microb**, v. 16, n. 1, p. 115–27, 2014. doi: 10.1016/j.chom.2014.06.001.

LABADIE, K.; LARCHER, T.; JOUBERT, C., et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **J Clin Invest**, v. 120, n. 3, p. 894–906, 2010. doi: 10.1172/JCI40104.

LE, T.T.; SKAK, K.; SCHRODER, K.; SCHRODER, W.A.; BOYLE, G.M.; PIERCE, C.J., et al. IL-1 contributes to the anti-cancer efficacy of ingenol mebutate. **PLoS One**, v. 11, n. 4, e 0153975, 2016. doi.org/10.1371/journal.pone.

LEE, Y.S.; QUEK, S.C.; KOAY, E.S., et al. Chikungunya mimicking atypical Kawasaki disease in an infant. **Ped Infect Dis J**, v. 29, n. 3, p. 275–7, 2010. doi: 10.1097/inf.0b013e3181bce34d.

LEMANT, J. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005–2006. **Crit Care Med**, v. 36, n. 9, p. 2536–254, 2008.

LEWIN, B. **Genes VIII.**; Prentice Hall; Tch edition, 2004.

LI, J.; HOU J.; SUN, L.; WILKINS, J.M.; LU, Y.; NIEDERHUTH, C.E., et al. From Gigabyte to Kilobyte: A Bioinformatics protocol for mining large RNA-Seq transcriptomics. **PLoS One**, v. 10, n. 4, e0125000, 2015. doi.org/10.1371/journal.pone.

LIAN, J.Q.; YANG, X.F.; ZHAO, R.R.; ZHAO, Y.Y.; LI, Y.; ZHANG, Y., et al. Expression profiles of circulating cytokines, chemokines and immune cells in patients with hepatitis B virus infection. **Hepat. Mon**, v. 14, n. 6: e18892, 2014. doi: 10.5812/hepatmon.

LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; BRETSCHER, T.; PLOEGH, H.; AMON, A. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

MAUCOURANT, C.; PETITDEMANGE, C.; YSSEL, H.; VIEILLARD, V. Control of acute arboviral infection by natural killer cells. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 131, 2019. doi: 10.3390/v11020131

MADARIAGA, M; TICONA, E; RESURRECCION, C., et al. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Braz J Infect Dis**, v. 20, n. 1, p. 91–98, 2016. doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.004

MANIMUNDA, S.P.; VIJAYACHARI, P.; UPPOOR, R., et al. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritis stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 6, p. 392-399, 2010. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.01.011.

MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. RNA-seq: from technology to biology. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 67, n. 4, p. 569–79, 2010.

MARIMOUTOU, C.; VIVIER, E.; OLIVER, M.; BOUTIN, J. P.; SIMON, F., et al. Morbidity and impaired quality of life 30 months after chikungunya infection: comparative cohort of infected and uninfected French military policemen in Reunion Island. **Medicine (Baltimore)**, v. 91, n. 4, p. 212–9, 2012. doi: 10.1097/MD.0b013e318260b604.

MARQUES, C.D.; CAVALCANTI, N.; LUNA, M.; TOCHE, P.; ANDRADE, C.; DANTAS, A., et al. Chikungunya fever outbreak in Brazil: preliminary assessment in a cohort of patients with rheumatological manifestations. **Arthritis Rheumatol**, v. 68, suppl 10, 2016.

MARQUES, C.D.; DUARTE, A.L.; RANZOLIN, A.; DANTAS, A.T.; CAVALCANTI, N.G.; OCEA, R.A., et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the diagnosis and treatment of chikungunya fever. II. Treatment. **Rev Bras Reumatol Engl**, v. 57, supl. 2, p.438–451, 2017. doi.org/10.1016/j.rbre.2017.05.006.

MATHEW, A.J.; GOYAL, V.; GEORGE, E.; THEKKEMURIYIL, D.V., et al. Rheumatic-musculoskeletal pain and disorders in a naïve group of individuals 15 months following a chikungunya viral epidemic in south India: a population based observational study. **Int J Clin Pract**. v. 65, n. 12, p. 1306–12, 2011. doi: 10.1111/j.1742-1241.2011.02792.x.

MCCARTHY M.K, MORRISON T.E. Chronic chikungunya virus musculoskeletal disease: what are the underlying mechanisms? **Future Microbiol**, v. 11, n. 3, p. 331–334, March 2016. doi: 10.2217/fmb.15.147.

MICHLMAYR, D.; ANDRADE, P.; GONZALEZ, K.; BALMASEDA, A.; HARRIS, E., et al. CD14(+) CD16(+) monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. **Nat Microbiol**, v. 2, n. 11, p. 1462–70, 2017. doi: 10.1038/s41564-017-0035-0.

MICHLMAYR, D.; PAK, T.R.; RAHMAN, A.H.; AMIR, E.; KIM, E.Y.; KIM-SCHULZE, S., et al. Comprehensive innate immune profiling of chikungunya virus infection in pediatric cases. **Mol Syst Biol**. v. 14, n. 8, 2018. doi: 10.15252/msb.20177862.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 40 – (2016).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 50 – (2016).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Chikungunya-Manejo Clínico. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 22 – (30/12/2018 a 01/06/2019).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica 29 – (29/12/2019 a 18/07/2020).

MONTEIRO, F.A.; SCHAMA, R.; MARTINS, A.J.; GLORIA-SORIA, A.; BROWN, J.E.; POWELL, J.R., et al. Genetic diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: patterns following an eradication program. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, ed. 3167, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0003167.

MORO, M.L.; GRILLI, E.; CORVETTA, A.; SILVI, G.; ANGELINI, R.; MASCELLA, F.; MISEROCCHI, F.; SAMBO, P.; FINARELLI, A.C.; SAMBRI, V.; GAGLIOTTI, C.; MASSIMILIANI, E.; MATTIVI, A.; PIERRO, A.M.; MACINI, P. The Study Group Infezioni da Chikungunya in Emilia-Romagna: Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: A prognostic cohort study. **J Infect**, v. 65, n. 2, p.165-172, 2012.

NUNES, M.R.; FARIA, N.R.; VASCONCELOS, J.M.; GOLDING, N.; KRAEMER, M.U.; OLIVEIRA, L.F., et al. Emergence and potential for spread of chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 102, 2015. doi: 10.1186/s12916-015-0348-x.

OLIVER, M.; GRANDADAM, M.; MARIMOUTOU, C., et al. Persistent mixed cryoglobulinemia in chikungunya infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, e. 374, 2009. doi.org/10.1371/journal.pntd.

OLIVEIRA, N.C.; PFRIMER, I.A. Analysis integrated with the systems biology pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine evaluation in Zika Virus infection. **Rev Bras Ana Clin**, v. 51, n. 2, p. 132-7, 2019.

OPAS, 2011. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. Washington, D.C.201.

PAIXÃO, E.S.; RODRIGUES, L.C.; COSTA, M.D.; ITAPARICA, M.; BARRETO, F.; GÉRARDIN, P., et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 112, n. 7, p. 301–16, 2018. doi: 10.1093/trstmh/try063.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Number of reported cases of CHIK fever in the Americas, by country or territory 2013-2014, and 2015**. Accessed 2 May 2016.

PATHAK, H.; MOHAN, M.C.; RAVINDRAN, V. Chikungunya Arthritis. **Clinical Medicine**, v.19, n. 5, p. 381-5, 2019.

PAVLOPOULOS, G. A.; OULAS, A.; IACUCCI, E., et al. Unraveling genomic variation from next generation sequencing data. **Bio Data mining**, v. 6, n. 1, p. 13, 2013. doi: 10.1186/1756-0381-6-13.

PHUKLIA, W.; KASISITH, J.; MODHIRAN, N., et al. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: a possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. **Virus Res**, v. 177, n. 2, p. 179–188, 2013. doi: 10.1016/j.virusres.2013.08.011.

PIRES, J.G. *Biologia Sistêmica: um novo paradigma para as ciências biológicas e exatas “ou” Biologia Sistêmica e Inteligência Computacional.* <https://www.researchgate.net/publication/281232646>, 2015.

POHJALA, L.; UTT, A.; VARJAK, M.; LULLA, A.; MERITS, A.; AHOLA, T., et al. Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable chikungunya replicon cell line and vírus – based assays. **PLoS One**, v. 6, n. 12, e28923, 2011. doi.org/10.1371/journal.pone.0028923.

POO, Y.S.; RUDD, P.A.; GARDNER, J., et al. Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic chikungunya virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 12, e3354, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0003354.

POWERS, A.M.; LOGUE, C.H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **J Gen Virol**, v. 88, n. 9, p. 2363-77, 2007.

PROW, N.A.; TANG, B.; GARDNER, J.; LE, T.T.; TAYLOR, A.; POO, Y.S., et al. Lower temperatures reduce type I interferon activity and promote alphaviral arthritis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 12, e1006788, 2017. doi.org/10.1371/journal.ppat.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A., et al. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 104, n. 2, p. 89-96, Feb 2010. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.07.031.

RAVICHANDRAN, R.; MANIAN, M. Ribavirin therapy for chikungunya arthritis. **J Infect Dev Ctries**, v. 2, n. 2, p. 140-2, 2008.

RAVINDRAN, V.; ALIAS, G. Efficacy of combination DMARD therapy vs. hydroxychloroquine monotherapy in chronic persistente chikungunya arthritis: a 24-week randomized controlled open label study. **Clin Rheumatol**, v. 36, n. 6, p. 1335-1340. 2016. doi: 10.1007/s10067-016-3429-0.

RAMACCIOTTI, E.; AGATI, L.B.; AGUIAR, V.C.; WOLOSKER, N.; GUERRA, J.C.; ALMEIDA, R.P.; ALVES, J.C., et al. Zika and Chikungunya vírus and risk for venous thromboembolism. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 25, p. 1-5, 2019.

REBOUÇAS, L.V.; SILVA, D.M.; FREITAS, M.N.; FRANÇAS, A.P.; YAOCHITE, J.N. Coinfecção de arboviroses: uma realidade mundial e nacional. Em: **Anais do Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**; Campinas: GALOÁ; 2018. Disponível em <https://proceedings.science/ppgcf/trabalhos/coinfeccao-de-arboviroses-uma-realidade-mundial-e-nacional>

RENAULT, P.; SOLET, J.L.; SISSOKO, D.; BALLEYDIER, E.; LARRIEU, S.; FILLEUL, L., et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. **Am J Trop Med Hyg**, v. 77, n. 4, p. 727-31, Oct 2007.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; CARDONA-OSPINA, J.A.; VILLAMIL-GÓMEZ, W., et al. How many patients with post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism can we expect in the new endemic areas of Latin America? **Rheumatol Int**, v. 35, n. 12, p. 2091-4, 2015. doi: 10.1007/s00296-015-3302-5.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; CARDONA-OSPINA, J.A.; URBANO-GARZON, S.F.; HURTADO-ZAPATA, J.S., et al. Prevalence of post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism: a systematic review and meta-analysis. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 68, n. 12, p. 1849-58, 2016. doi: 10.1002/acr.22900.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; GIL-RESTREPO, A.F.; RAMIREZ-JARAMILLO, V.; MONTOYA-ARIAS, C.P.; ACEVEDO-MENDOZA, W.F.; BEDOYA-ARIAS, J.E., et al. Post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism: results from a retrospective follow-up study of 283 adult and child cases in La Virginia, Risaralda. **F1000 Res**, v. 5, n. 360, 2016. doi: 10.12688/f1000research.8235.1.

ROBINSON, M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955.

ROSENHOFF, R.; ANFASA, F; MARTINA, B., et al. The pathogenesis of chronic chikungunya: Evolving concepts. **Future Virology**, v. 11, n. 1, p. 61-77, Dec 2015. doi.org/10.2217/fvl.15.107.

ROSARIO, V.; MUNOZ-LOUIS, R.; VALDEZ, T.; ADAMES, S.; MEDRANO, J.; PAULINO, I., et al. Chikungunya infection in the general population and in patients with rheumatoid arthritis on biological therapy. **Clin Rheumatol**, v. 34, n. 7, p. 1285-7, 2015. doi: 10.1007/s10067-015-2979-x.

RULLI, N.E.; MELTON, J.; WILMES, A.; EWART, G.; MAHALINGAM, S. The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections: lesson learned from Ross River virus. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1102, p. 96-108, 2007. doi: 10.1196/annals.1408.007.

SANFILIPPO, C.; CAMBRIA, D.; LONGO, A.; PALUMBO, M.; AVOLA, R.; PINZONE, M., et al. SERPING1 mRNA overexpression in monocytes from HIV+ patients. **Inflamm Res**, v. 66, n. 12, p. 1107-16, 2017.

SARDI, S.I.; SOMASEKAR, S.; NACCACHE, S.A.; BANDEIRA, A.C.; TAURO, L.B.; CAMPOS, G.S.; CHIU, C.Y. Coinfections of Zika and chikungunya viruses in Bahia, Brazil, identified by metagenomic next-Generation sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2348-53. Sep 2016. doi: 10.1128/JCM.00877-16.

SCHILTE, C.; COUDERC, T.; CHRETIEN, F.; SOURISSEAU, M.; GANGNEUX, N.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; KRAXNER, A.; TSCHOPP, J.; HIGGS, S.; MICHAULT, A.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; COLONNA, M.; PEDUTO, L.; SCHWARTZ, O.; LECUIT,

M.; ALBERT, M.L., et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **J Exp Med**, v. 207, n. 2, p. 429–442, 2010.

SCHILTE, C.; STAIKOWSKY, F.; COUDERC, T.; MADEC, Y.; CARPENTIER, F.; KASSAB, S., et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 3, e2137, 2013. doi: 10.1371/journal.pntd.0002137.

SCHWARTZ, O; ALBERT, M.L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 7, p. 491-500, Jul 2010. doi: 10.1038/nrmicro2368.

SCHUFFENECKER, I.; ITEMAN, I.; MICHAULT, A., et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med**, v. 3, n. 7, e 263, 2006. doi: 10.1371/journal.pmed.0030263.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE SERGIPE, **Boletim epidemiológico arboviroses** (2020).

SIMARMATA, D.; NG, D.C.; KAM, Y.W.; LEE, B.; SUM, M.S.; HER, Z., et al. Early clearance of chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. **Sci Rep**, v. 6, n. 26097, 2016. doi: 10.1038/srep26097.

SIMIAO, A.R.; BARRETO, F.K.; OLIVEIRA, R.M.; CAVALCANTE, J.W.; NETO, A.S.; BARBOSA, R.B., et al. A major chikungunya epidemic with high mortality in northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52, e20190266, 2019.

SIMON, F.; JAVELLE, E.; CABIE, A.; BOUQUILLARD, E.; TROISGROS, O.; GENTIL, E. G., et al. Société de pathologie infectieuse de langue française French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). **Med Mal Infect**, v. 45, n. 7, p. 243–63, 2015. doi: 10.1016/j.medmal.2015.05.007.

SISSOKO, D.; MALVY, D.; EZZEDIN, E.K.; RENAULT, P.; MOSCETTI, F.; LEDRANS, M. Post epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Negl. Trop. Dis**, v. 3, n. 3, e389, 2009.

SOARES-SCHANOSKI, A.; CRUZ, N.B.; CASTRO-JORGE, L.A.; CARVALHO, R.V.; SANTOS, C.A., et al. Systems analysis of subjects acutely infected with the chikungunya virus. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 6, e1007880. June 2019. doi: 10.1371/journal.ppat.1007880.

SOURISSEAU, M. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 6, e89, 2007. doi.org/10.1371/journal.ppat.0030089.

SPAENY-DEKKING; E.H.; HANNA, W.L.; WOLBINK, A.M.; WEVER, P.C.; KUMMER, J.A.; SWAAK, A.J., et al. Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. **J Immunol**, v. 160, n. 7, p. 3610–3616, 1998.

STAIKOWSKY, F.; TALARMIN, F.; GRIVARD, P.; SOUAB, A.; SCHUFFENECKER, I. L.E.; ROUX, K., et al. Prospective study of chikungunya virus acute infection in the Island of La Reunion during the 2005-2006 outbreak. **PLoS One**, v. 4, n. 10, e760, 2009.

STOERMER, K.; BURRACK, A.; OKO, L., et al. Genetic ablation of arginase 1 in macrophages and neutrophils enhances clearance of an arthritogenic alphavirus. **J Immunol**, v. 189, n. 8, p. 4047–4059, 2012. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol>.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Review Rheumatology**, v. 15, p. 597-611, 2019. doi: [10.1038/s41584-019-0276-9](https://doi.org/10.1038/s41584-019-0276-9).

SUN, K.; TORRES, L.; METZGER, D.W. A detrimental effect of Interleukin-10 on protective pulmonary humoral immunity during primary influenza A virus infection. **J Virol**, v. 84, n. 10, p. 5007-5014, 2010. doi: [10.1128/JVI.02408-09](https://doi.org/10.1128/JVI.02408-09).

TAM, D.T, NGOC, T.V., et al. Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in Vietnamese patients: A randomized, placebo-controlled trial. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 9, p. 1216–1224, 2012. doi: [10.1093/cid/cis655](https://doi.org/10.1093/cid/cis655).

TANAY, A. Chikungunya virus and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*, v. 29, n. 4, p. 389-393, 2017. doi: [10.1097/BOR.0000000000000396](https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000396).

TAK, P.P.; SPAENY-DEKKING, L.; KRAAN, M.C.; BREEDVELD, F.C.; FROELICH, C.J.; HACK, C.E. The level of soluble granzyme A and B reelevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). **Clin Exp Immunol**, v. 116, n. 2, p. 366–370, 1999.

TENG, T.S.; YIU-EWING, K.; BERNETT, L.; HAPUARACHCHIGE, C.H.; ABEYEWICKREME, W.; LEECHING, N.G., et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. **J Infect Dis**, v. 211, n. 12, p. 1925-35, Jun 2015. doi: [10.1093/infdis/jiv049](https://doi.org/10.1093/infdis/jiv049).

TEO, T.H.; LUM, F.M.; CLASER, C., et al. A pathogenic role for CD4+ T cells during chikungunya virus infection in mice. **J Immunol**, v. 190, n. 1, p. 259–269, 2013. doi: [10.4049/jimmunol.1202177](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202177)

THAMPI, S.M. **Introduction to bioinformatics**. arXiv preprint arXiv, 2009. Computational Engineering, Finance, and Science.

THIBERVILLE, S.D.; BOISSON, V.; GAUDART, J.; SIMON, F.; FLAHAULT, A.; LAMBALLERIE, X., et al. Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island south-west indian ocean. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 1, e 2004, 2013. doi.org/10.1371/journal.pntd.0002004.

TORCIA, M.G.; NENCIONI, L.; CLEMENTE, A.M.; CIVITELLI, L.; CELESTINO, I.; LIMONGI, D.; FADIGATI, G.; PERISSI, E.; COZZOLINO, F., et al. Sex differences in the response to viral infections: TLR8 and TLR9 ligand stimulation induce higher IL10 production in males. **PLoS One**, v. 7, n. 6, e39853, 2012. doi: [10.1371/journal.pone.0039853](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039853).

TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S.L., et al. Top Hat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics** (Oxford, England), v. 25, n. 9, p. 1105–11, 2009. doi: doi.org/10.1093/bioinformatics/btp120.

TRICOU, V.; MINH, N.N.; VAN, T.P., et al. A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 8, e785, 2010.

TSETSARKIN, K.A.; VANLANDINGHAM, D.L.; MCGEE, C.E.; HIGGS, S., et al. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 12, e201, 2007. doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201.

VAIRO, F.; HAIDER, N.; KOCK, R.; NTOUMI, F.; IPPOLITO, G.; ZUMLA, A. Chikungunya: Epidemiology, pathogenesis, clinical features, management, and prevention. **Infect Dis Clin North Am**, v. 33, n. 4, p. 1003-1025, 2019. doi: 10.1016/j.idc.2019.08.006.

VILLAMIL-GÓMEZ, W.E.; GONZÁLEZ-CAMARGO, O.; RODRIGUEZ-AYUBI, J.; ZAPATA-SERPA, D.; RODRIGUEZ-MORALES, A.J. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. **J Infect Public Health**, v. 9, n. 5, p. 684-6, Sep-Oct 2016.

WAHID, B.; ALI, A.; RAFIQUE, S.; IDREES, M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis*, v. 58, p. 69-76, 2017.

WALSH, D.; MOHR, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 12, p. 860–75, 2011. doi: 10.1038/nrmicro2655.

WANWISA DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W.; ROUVINSKI, A.; BARBA-SPAETH, G.; DUANGCHINDA, T., et al Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody dependent enhancement of infection with Zika virus. **Nat Immunol**, v. 17, n. 9, p. 1102–1108, 2016. doi: 10.1038/ni.3515.

WEAVER, S.C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**, v. 372, n. 13, p. 139- 201, 2015. doi: 10.1056/NEJMra1406035.

WILSON, J.A.; PROW, N.A.; SCHRODER, W.A.; ELLIS, J.J.; CUMMING, H.E.; GEARING, L.J., et al. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. **Plos Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1-32, 2017. doi.org/10.1371/journal.ppat.1006155

YACTAYO, S.; STAPLES, J.E.; MILLOT, V.; CIBRELUS, L., et al. Epidemiology of the chikungunya in the Americas. **J. Infect. Dis.** v. 214(S5), p. 441-5, Dec 2016.

YASEEN, H.M.; SIMON, F.; DEPARIS, X.; MARIMOUTOU, C. Identification of initial severity determinants to predict arthritis after chikungunya infection in a cohort of French gendarmes. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 15, n. 249, 2014.

ZAID, A.; RULLI, N.E.; ROLPH, M.S.; SUHRBIER, A.; MAHALINGAM, S., et al. Disease exacerbation by etanercept in a mouse model of alphaviral arthritis and myositis. **Arthritis Rheum**, v. 63, n. 2, p. 488–491, 2011. doi.org/10.1002/art.30112.

ZAID, A.; GÉRARDIN, P.; TAYLOR, A., et al. Review: chikungunya arthritis: implications of acute and chronic inflammation mechanisms on disease management. **Arthritis Rheumatol**, v. 70, p.484 – 95, 2018.

ZHAO, S.; FUNG-LEUNG, W.P.; BITTNER, A.; NGO, K.; LIU, X. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PLoS One**, v. 9, n. 1, e78644, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0078644.

ZIEMSEN, T. Real- world persistence and benefit/risk profile of fingolimod over 36 months in Germany. **Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm**, v. 6, e. 548, 2019. doi: <https://doi.org/10.1212/NXI>.

## 9 APÊNDICE

### 9.1 APÊNDICE A

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Nome do Projeto:** AVALIAÇÃO DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS, DA CRONICIDADE E DA EXPRESSÃO GÊNICA NA FEBRE CHIKUNGUNYA

**Dados de Identificação do Voluntário e do Responsável:**

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_  
 Documento de Identidade nº: \_\_\_\_\_ Sexo: M ( ) F ( )  
 Data de Nascimento (dd/mm/aaaa): \_\_\_\_\_ Telefone: ( ) \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ nº: \_\_\_\_\_  
 Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

**Data de Preenchimento (dd/mm/aaaa):** \_\_\_\_\_

**Investigador Principal:** Regina Adalva de Lucena Couto Océa, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

**Orientador:** 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 febre chikungunya e suas complicações, como a Artrite Crônica. 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.

**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:** Visa determinar o estudo da resposta imune do paciente ao vírus e identificar fatores 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. Além disso, seu sangue será utilizado para avaliar a resposta imune frente a antígenos do vírus. Também será sequenciado 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 Chikungunya, 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. Após o diagnóstico da doença, você será tratado com medicações para reduzir os sintomas das doenças. Não existem tratamento específico para Chikungunya. Este tratamento será acompanhado no Hospital Universitário.

**Retorno de Benefício para o Sujeito e para a Sociedade:** O melhor conhecimento será o da resposta imune que poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença, assim como de fatores genéticos que interferem na clínica da doença.

**Custos:** Você não terá custos com a participação no estudo. 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 Dra Regina Adalva de Lucena Couto Océa - Tel: (79) 99988-0018 ou para Dr. Roque Pacheco de Almeida Tel.: (79) 98823-7244). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos, poderá 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 Chikungunya.

( ) **ACEITO** que o sangue seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre Chikungunya.

( ) **NÃO ACEITO** que o sangue seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre Chikungunya.

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou Impressão Digital do Paciente

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Nome / Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data

## 9.2 APÊNDICE B

### 1) CONSULTA INICIAL

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
 DN: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ nº: \_\_\_\_\_  
 Ocupação: \_\_\_\_\_ Cartão do SUS: \_\_\_\_\_

### Sintomatologia

Sintomas	Presente	Ausente	Duração dos Sintomas
Febre			
Artralgia			
Exantema			
Conjuntivite			
Mialgia			
Dor Retroorbitária			
Linfadenopatia			

- Usa algum medicamento? ( ) Sim ( ) Não
- Foram específicos para os sintomas das doenças? ( ) Sim ( ) Não
- Quais medicamentos?  
 Anticoncepcional ( )    Antihistamínico ( )    Antiinflamatório ( )  
 Analgésico ( )    Antitérmico ( )    Antihipertensivo ( )  
 Antihipoglicemiantes Orais ( )    Outros ( )
- Se outros, especificar \_\_\_\_\_
- Tem algum tipo de alergias?  
 Rinite ( )    Asma ( )    Dermatite ( )    Urticária ( )    Não ( )  
 Outros \_\_\_\_\_)) \_\_\_\_\_
- Tem alergia a medicamentos? Sim ( ) Não ( )  
 Qual? \_\_\_\_\_
- Tem alguma doença? Sim ( ) Não ( )  
 Qual? \_\_\_\_\_

### 9.3 APÊNDICE C

#### **2) FICHA CLÍNICA CHIKUNGUNYA**

##### **2.1 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Data: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_ ID: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Ocupação: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Urbana ( ) Rural ( ) Fem ( ) Masc ( )

Cor: 1.Branca ( ) 2.Preta ( ) 3.Parda ( ) 4.Amarela ( ) 5.Índigena ( )

Afastado do trabalho pela Chikungunya? 1.Sim ( ) 2.Não ( )

Deixou de realizar atividades cotidianas em casa devido à Chikungunya?

1.Sim ( ) 2.Não ( ) Se sim, por quantos dias? \_\_\_\_\_

##### **2.2 – DADOS CLÍNICOS**

###### **A - COMORBIDADES**

- |  |  |   |
|--|--|---|
| <input type="checkbox"/> HAS             | <input type="checkbox"/> Tireoideopatia    | <input type="checkbox"/> Doença Reumatológica |
| <input type="checkbox"/> DM              | <input type="checkbox"/> Asma              | 1.LES 7.APSO                                  |
| <input type="checkbox"/> DLP             | <input type="checkbox"/> DPOC              | 2.AR 8.FIBRO                                  |
| <input type="checkbox"/> DCV             | <input type="checkbox"/> Psoríase          | 3.OA 9. PARTES MOLES                          |
| <input type="checkbox"/> ICC             | <input type="checkbox"/> Obesidade         | 4.OP 10.PART. COLUNA                          |
| <input type="checkbox"/> DRC             | <input type="checkbox"/> Neoplasia         | 5.GOTA 11.OUTRAS                              |
| <input type="checkbox"/> Tabagismo atual | <input type="checkbox"/> Tabagismo inativo | 6.EA  |
| <input type="checkbox"/> Nunca fumou     | <input type="checkbox"/> Etilismo          |   |
| <input type="checkbox"/> Outras          |  |   |

###### **B - ANAMNESE**

###### **GERAL**

1.Febre ( ) Sim ( ) Não

2.Fadiga ( ) Sim ( ) Não

3.Perda de Peso ( ) Sim ( ) Não

4.Outros \_\_\_\_\_

###### **DERMATOLÓGICO**

1.Exantema ( ) Sim ( ) Não

2.Prurido ( ) Sim ( ) Não

3.Vasculite ( ) Sim ( ) Não

4.Outros \_\_\_\_\_

###### **GASTROINTESTINAL**

1.Náusea ( ) Sim ( ) Não

2.Vômitos ( ) Sim ( ) Não

3.Diarréia ( ) Sim ( ) Não

4.Outros \_\_\_\_\_

###### **NEUROLÓGICO**

1.Cefaléia ( ) Sim ( ) Não

2.Neuropatia \*DN4 ( ) Sim ( ) Não

3.Convulsões ( ) Sim ( ) Não

4.Outros \_\_\_\_\_

**C - ARTICULAR**

1. Artralgia ( ) Sim ( ) Não

2. Artrite ( ) Sim ( ) Não

3. Tendinite ( ) Sim ( ) Não

Local: \_\_\_\_\_

4. Dorsalgia ( ) Sim ( ) Não

5. Cervicalgia ( ) Sim ( ) Não

6. Lombalgia ( ) Sim ( ) Não

- Rigidez ( ) Sim ( ) Não

- Duração ( ) &lt;30min ( ) 30-60min

- Padrão ( ) Migratório ( ) Aditivo

Forma: \_\_\_\_\_

**2.3 – MEDICAÇÕES INICIADAS APÓS A INFECÇÃO**

1. Analgésicos

( ) Não ( ) Prévio ( ) Atual

2. AINEs

( ) Não ( ) Prévio ( ) Atual

3. Opióides

( ) Não ( ) Prévio ( ) Atual

4. Antineuropático

( ) Não ( ) Prévio ( ) Atual

5. Relaxante Muscular

( ) Não ( ) Prévio ( ) Atual

6. Corticóides

( ) Sim ( ) Não

\*Qual? 1. Pred ( ) 2. Beta ( ) 3. Dexametasona ( )

4. Outro \_\_\_\_\_

\*Número de Cursos?

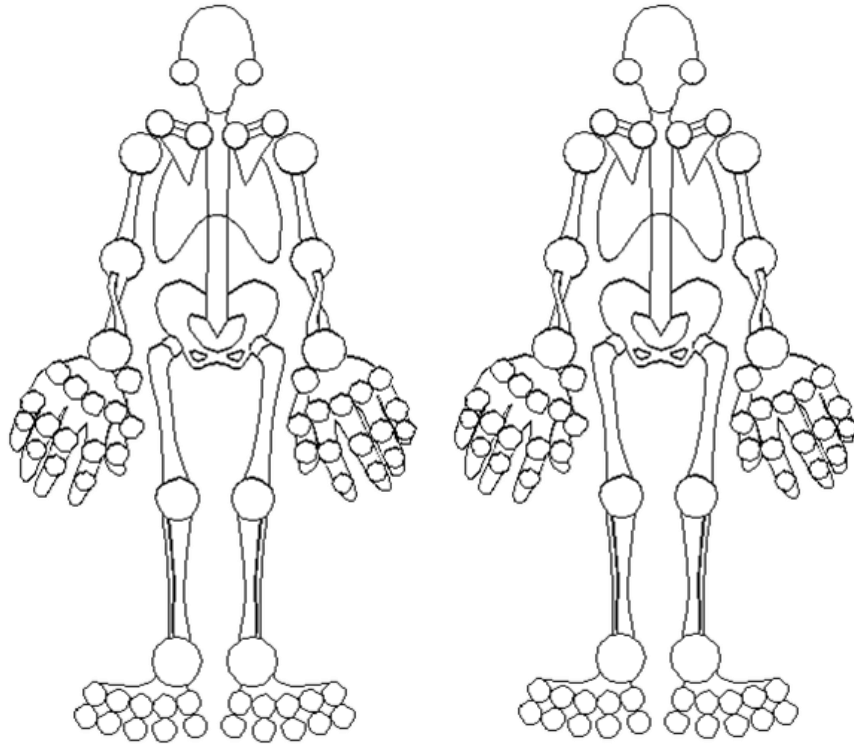
( ) 1 ( ) &gt;1

\*Melhorou?

( ) Sim ( ) Não ( ) Parcial

**2.4 – EXAME FÍSICO****GERAL:** \_\_\_\_\_**DERMATOLÓGICO:** \_\_\_\_\_**NEUROLÓGICO:** ( ) Tínel ( ) Phalen ( ) DN4**VASCULAR:** \_\_\_\_\_**ARTICULAR:** \_\_\_\_\_**CONTAGEM ARTICULAR** (relate todas as articulações dolorosas/edemaciadas, não apenas as do DAS28)

DOR \_\_\_\_\_ EDEMA \_\_\_\_\_  
 EVA PCTE \_\_\_\_\_ EVA MED \_\_\_\_\_



COMPLICAÇÃO: \_\_\_\_\_ Tipo: \_\_\_\_\_

## 2.5 – LABORATÓRIO

EXAME	RESULTADO	DATA	OUTROS
Ht/ Hb			
Leucócitos			
LT (número)			
Segmentados			
Plaquetas			
PCR/VSH			
Uréia			
Creatinina			
TGO			
TGP			



**5. ANTIDEPRESSIVO**

QUAL? \_\_\_\_\_ ( ) Parou ( ) Aumentou

**6. ANTINEUROPÁTICO**

QUAL? \_\_\_\_\_ ( ) Parou ( ) Aumentou

COMPLICAÇÃO: \_\_\_\_\_

**2.8 – CONDUTA**

**LABORATÓRIO GERAL:** \_\_\_\_\_

**SOROLOGIA IGM/IGG:** \_\_\_\_\_

**PCR/RNA:** \_\_\_\_\_

**COLETA PARA CITOCINAS E RNA-SEQ:** \_\_\_\_\_

**DATA:** \_\_\_\_\_

**RADIOLOGIA:**

- RX MÃOS E PÉS: \_\_\_\_\_

- USOM ARTICULAÇÕES: \_\_\_\_\_

**2.9 – MEDICAÇÃO PRESCRITA**

( ) Prednisona Dose: \_\_\_\_\_ ( ) SSZ Dose: \_\_\_\_\_

( ) HCQ Dose: \_\_\_\_\_ ( ) AINE Dose: \_\_\_\_\_

( ) Metotrexate Dose: \_\_\_\_\_ ( ) Antineuropático Dose: \_\_\_\_\_

( ) Analgésico ( ) Analgésico

Comum Dose: \_\_\_\_\_ Opióide Dose: \_\_\_\_\_

## 9.4 APÊNDICE D

### **3) FICHA DE SEGUIMENTO**

#### **3.1 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Data: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_ ID: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Ocupação: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Urbana ( ) Rural ( ) Fem ( ) Masc ( )

#### **3.2 – ARTRITE CRÔNICA**

##### **DOENÇA NÃO INFLAMATÓRIA:**

( ) Artralgias ( ) Tendinite ( ) Patologias de Coluna

( ) Fibromialgia ( ) STC ( ) Fasceíte ( ) Artrose

**DAIC:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**DOENÇA AUTOIMUNE:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### **3.3 – EXAMES LABORATORIAIS**

<b>EXAME</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>DATA</b>	<b>OUTROS</b>
Ht/ Hb			Fator Reumatóide
Leucócitos			FAN
LT (número)			
Segmentados			
Plaquetas			
PCR/VSH			
Uréia			
Creatinina			
TGO			
TGP			

**3.4 – EXAMES RADIOLÓGICOS**

Radiografias: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

USOM: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Outros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**3.5 – EVA**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**3.6 – DAS28**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**3.7 – COMPLICAÇÃO**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**3.8 – TRATAMENTO**

<b>Tratamento Fase Crônica</b>	<b>SIM</b>	<b>NÃO</b>
- Analgésico Comum		
- Opióides		
- Corticoides		
- AINH		
- Cloroquina		
- Antiartrósicos		
- Antidepressivos		
- Metotrexate		
- Pregabalina		
<b>Fisioterapia</b>		

10 ANEXO

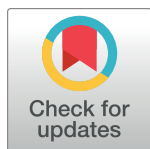
RESEARCH ARTICLE

# Systems analysis of subjects acutely infected with the Chikungunya virus

Alessandra Soares-Schanoski<sup>1</sup>, Natália Baptista Cruz<sup>2</sup>, Luíza Antunes de Castro-Jorge<sup>3</sup>, Renan Villanova Homem de Carvalho<sup>3</sup>, Cliomar Alves dos Santos<sup>4</sup>, Nancy da Rós<sup>5</sup>, Úrsula Oliveira<sup>5</sup>, Danuza Duarte Costa<sup>4</sup>, Cecília Luíza Simões dos Santos<sup>6</sup>, Marielton dos Passos Cunha<sup>7</sup>, Maria Leonor Sarno Oliveira<sup>1</sup>, Juliana Cardoso Alves<sup>8</sup>, Regina Adalva de Lucena Couto Océa<sup>8</sup>, Danielle Rodrigues Ribeiro<sup>8</sup>, André Nicolau Aquime Gonçalves<sup>2</sup>, Patricia Gonzalez-Dias<sup>2</sup>, Andreas Suhrbier<sup>9</sup>, Paulo Marinho de Andrade Zanotto<sup>7</sup>, Inácio Junqueira de Azevedo<sup>5</sup>, Dario S. Zamboni<sup>3</sup>, Roque Pacheco Almeida<sup>8</sup>, Paulo Lee Ho<sup>10</sup>, Jorge Kalil<sup>11</sup>, Milton Yutaka Nishiyama, Junior<sup>5</sup>, Helder I. Nakaya<sup>2\*</sup>

**1** Bacteriology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, **2** Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, **4** Health Foundation Parreiras Horta, Central Laboratory of Public Health (LACEN/SE), State Secretary for Health, Sergipe, Brazil, **5** Special Laboratory for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, **6** Respiratory Diseases Division, Virology Center, Adolfo Lutz Institute, Sao Paulo, Brazil, **7** Laboratory of Molecular Evolution and Bioinformatics, Department of Microbiology, Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, **8** Division of Immunology and Molecular Biology Laboratory, University Hospital/EBSERH, Federal University of Sergipe, Sergipe, Brazil, **9** QIMR Berghofer Medical Research Institute, Brisbane, Queensland, Australia, **10** Bacteriology Service, Bioindustrial Division, Butantan Institute, São Paulo, Brazil, **11** Heart Institute, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

\* [hnakaya@usp.br](mailto:hnakaya@usp.br)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Soares-Schanoski A, Baptista Cruz N, de Castro-Jorge LA, de Carvalho RVH, Santos CAd, Rós Nd, et al. (2019) Systems analysis of subjects acutely infected with the Chikungunya virus. PLoS Pathog 15(6): e1007880. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880>

**Editor:** David H O'Connor, University of Wisconsin, UNITED STATES

**Received:** February 1, 2019

**Accepted:** May 30, 2019

**Published:** June 18, 2019

**Copyright:** © 2019 Soares-Schanoski et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All RNA-seq raw data is available at the NCBI in BioProject: PRJNA507472 and the BioSample Range from SAMN10847030 to SAMN10847088

**Funding:** H.I.N. is supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP; grants 2017/50137-3, 2012/19278-6, and 2013/08216-2). A.S. S. is supported by Butantan Foundation, CNPq (Grant 443371/2016-4) and Brazilian Health Ministry. R.A. is supported by FINEP Grant 0116005600. D.R.R. has a postdoctoral fellowship

## Abstract

The largest ever recorded epidemic of the Chikungunya virus (CHIKV) broke out in 2004 and affected four continents. Acute symptomatic infections are typically associated with the onset of fever and often debilitating polyarthralgia/polyarthritis. In this study, a systems biology approach was adopted to analyze the blood transcriptomes of adults acutely infected with the CHIKV. Gene signatures that were associated with viral RNA levels and the onset of symptoms were identified. Among these genes, the putative role of the Eukaryotic Initiation Factor (eIF) family genes and apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like (APOBEC3A) in the CHIKV replication process were displayed. We further compared these signatures with signatures induced by the Dengue virus infection and rheumatoid arthritis. Finally, we demonstrated that the CHIKV *in vitro* infection of murine bone marrow-derived macrophages induced IL-1 beta production in a mechanism that is significantly dependent on the inflammasome NLRP3 activation. The observations provided valuable insights into virus-host interactions during the acute phase and can be instrumental in the investigation of new and effective therapeutic interventions.

from CNPq. J.C.A. has a postdoctoral fellowship from CAPES - Finance Code 001. M.P.C. has a PhD fellowship from FAPESP - 2016/08204-2. I.J.A is supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP; grant: CEPID 2013/07467-1). P.L.H is supported by Butantan Foundation, CNPq 306992/2014-0 and Fapesp 2015/25055-8. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Author summary

The Chikungunya virus (CHIKV) has infected millions of people worldwide and presents a serious public health issue. Acute symptomatic infections caused by contracting this mosquito-transmitted arbovirus are typically associated with an abrupt onset of fever and often debilitating polyarthralgia/ polyarthritis, as well as prolonged periods of disability in some patients. These dramatic effects call for a careful evaluation of the molecular mechanisms involved in this puzzling infection. By analyzing the blood transcriptome of adults acutely infected with CHIKV, we were able to provide a detailed picture of the early molecular events induced by the infection. Additionally, the systems biology approach revealed genes that can be investigated extensively as probable therapeutic targets for the disease.

## Introduction

The Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne reemerging arbovirus responsible for intermittent and devastating outbreaks [1]. The largest epidemic of CHIKV ever recorded started in Africa in 2004 and has spread globally, reaching the Americas in 2014. The disease has afflicted four continents, affected more than 100 countries and infected over 10 million people [2, 3]. Its global impact is still growing [4]. CHIKV has spread rapidly through several Brazilian states and infected a total of 20,598 individuals in 2015 [5]; furthermore, more than 200,000 suspected cases were reported in 2017–2018 [6].

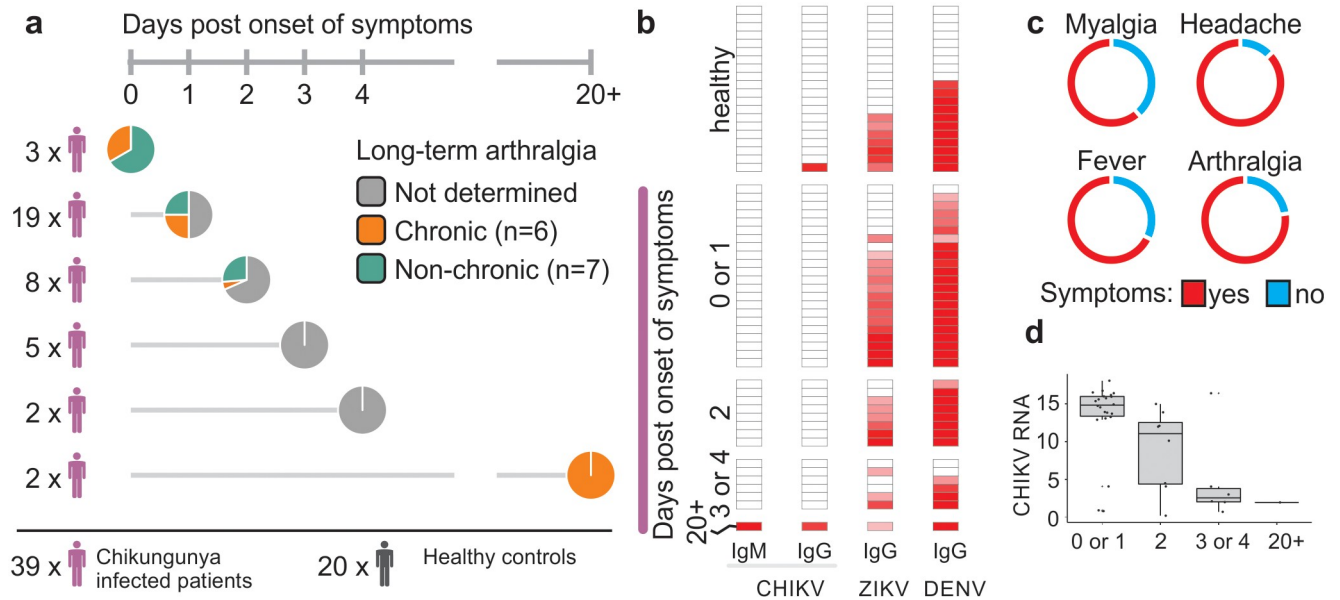
The CHIKV acute infection typically results viremia for 5–7 days. The symptoms are characterized by fever, rash and severe polyarthralgia/polyarthritis that can become chronic and persist from months to years [7]. Mortality rates are estimated to be approximately 0.1% [8]; however, the high attack rates (up to 30–75%) can result in considerable economic burden [9, 10]. The current mainstay of treatment is the use of NSAIDs and/or acetaminophen, although relief is often inadequate and more effective treatments are actively being sought [11]. Several studies have sought to understand the CHIKV disease pathogenesis and virus-host interactions better [12] using *in vitro* approaches [13] or animal models [14, 15].

Systems biology approaches have been successfully applied to identify molecular signatures associated with infections [16] and vaccination [17]. In this study, a systems approach was performed to investigate subjects who were naturally infected with CHIKV during the 2016 epidemics in the state of Sergipe, Brazil. The blood transcriptome analyses performed revealed key genes and pathways involved in acute CHIKV infection, thereby providing important insights into how CHIKV interacts with the host's immune system. These analyses helped uncover potential drug targets for improving CHIKV therapy.

## Results

### Clinical information and diagnosis of CHIKV patients and controls

In an endemic area for the Chikungunya, Zika and Dengue viruses [18] in the northeast of Brazil, whole blood samples were collected from 39 adult patients with symptoms consistent with arboviral infection, including fever, arthralgia, headache and/or muscle pain. Most patients (n = 22) reported that the onset of the symptoms had occurred on the same day or one day prior to the blood collection (Fig 1a and S1 Table). Eight patients reported having had symptoms for two days, and seven reported symptoms surfacing three to four days prior to the blood collection. Two patients reported pain for the past 20 days or more (Fig 1a). The



**Fig 1. CHIKV sample collection, clinical data and diagnoses.** (a) Study design representing the number of individuals and the number of days from the onset of symptoms and till blood sample collection. The status of long-term arthralgia was assessed in some of the patients and indicated by the following color scheme: chronic (orange), non-chronic (green) and undetermined (gray). (b) Serodiagnoses for CHIKV, DENV and ZIKV showing highest immunity for Dengue and Zika in the red scale (n = 37). The number of days post onset of symptoms are shown for all CHIKV patients (purple vertical bar) (c) Doughnut chart indicating the most prevalent symptoms reported by CHIKV patients. (d) CHIKV RNA (inverse Ct) in the subgroups determined by the number of days between the onset of symptoms and the collection of blood samples (n = 37).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g001>

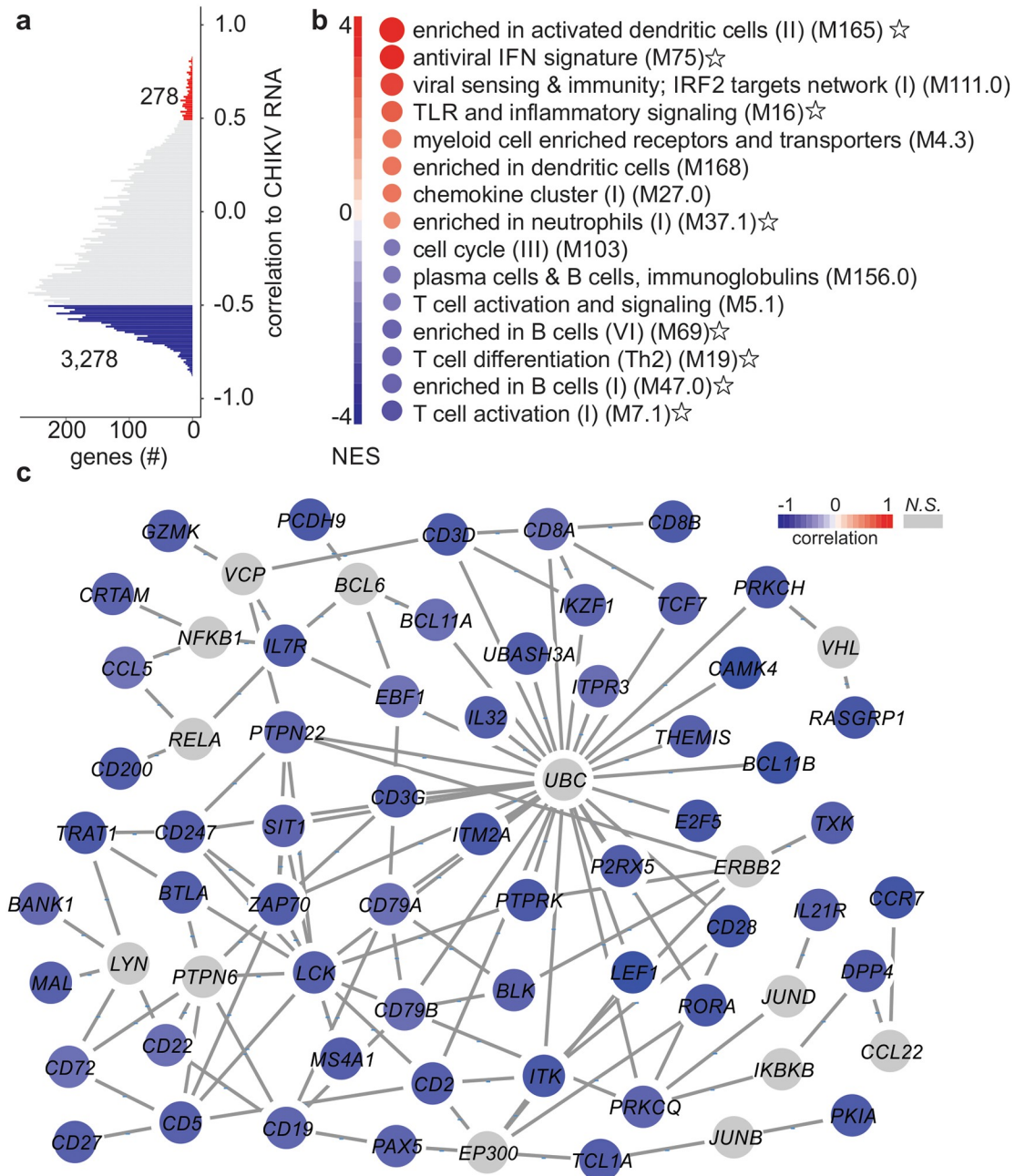
presence of CHIKV RNA (as determined by real-time RT-PCR) or CHIKV-specific IgM (as determined by serodiagnostic ELISA) was confirmed in serum samples of all except five patients (S1 Table). These five patients had borderline levels of CHIKV RNA (n = 4) or had no serum available (n = 1) and were included in the study based on their clinical symptoms (S1 Table). All samples were negative for Zika and Dengue RNA (S1 Table). The most frequent symptoms in CHIKV-infected patients were fever, arthralgia, headache and myalgia (Fig 1c). As expected [16], the highest levels of CHIKV RNA were found in serum samples from patients in whom the onset of the disease was recent (Fig 1d).

Blood was also collected from 20 healthy subjects from endemic and non-endemic regions in Brazil. None of the subjects showed symptoms of viral infection, and they tested negative for CHIKV, Zika and Dengue RNA. Serodiagnostic ELISAs were also performed to detect the presence of IgG antibodies specific to the Zika and/or Dengue viruses (Fig 1b, S1 Table). IgG antibodies specific to CHIKV were detected in only one subject.

### The impact of CHIKV acute infection on peripheral blood transcriptome

The peripheral blood transcriptomes of CHIKV patients were compared with those from healthy controls to understand the transcriptional changes associated with acute CHIKV infections. Although the CHIKV RNA levels had a small contribution to the variance observed in the transcriptomes, individuals were not grouped by the days post the onset of symptoms or by their infection status (i.e., healthy individuals and CHIKV patients) (S1b Fig).

Correlation analysis of gene expression and the levels of CHIKV RNA in the peripheral blood of the infected individuals revealed approximately 3,500 genes associated with CHIKV infection. The expression of most of these genes (> 85%) was negatively correlated with CHIKV RNA levels (Fig 2a). Using the correlation values as rank and Blood Transcription



**Fig 2. Gene signatures associated with levels of CHIKV RNA.** (a) Representation of genes whose expression were correlated (Pearson's  $r$ ) with the levels of CHIKV RNA (inverse Ct). The respective number of genes positively (red) or negatively (blue) correlated with the levels of CHIKV RNA are shown ( $p$ -adjusted value  $< 0.01$  and  $|R| > 0.5$ ). (b) Results of GSEA conducted using the correlation values between expression and inverse Ct as ranks and BTMs as gene sets. The stars correspond with the gene sets used to construct the networks shown in panel C (negatively correlated pathways) and S2 Fig (positively correlated pathways). (c) Minimum network constructed using the gene sets that presented a negative NES score with the NetworkAnalyst tool. The protein-protein interaction (PPI) data was based on InnateDB and the graph was generated with the Cytoscape tool. Blue nodes represent genes that are negatively correlated with levels of CHIKV RNA and the color scheme indicates its strength. The gray nodes were added by NetworkAnalyst and are not a part of the correlated genes.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g002>

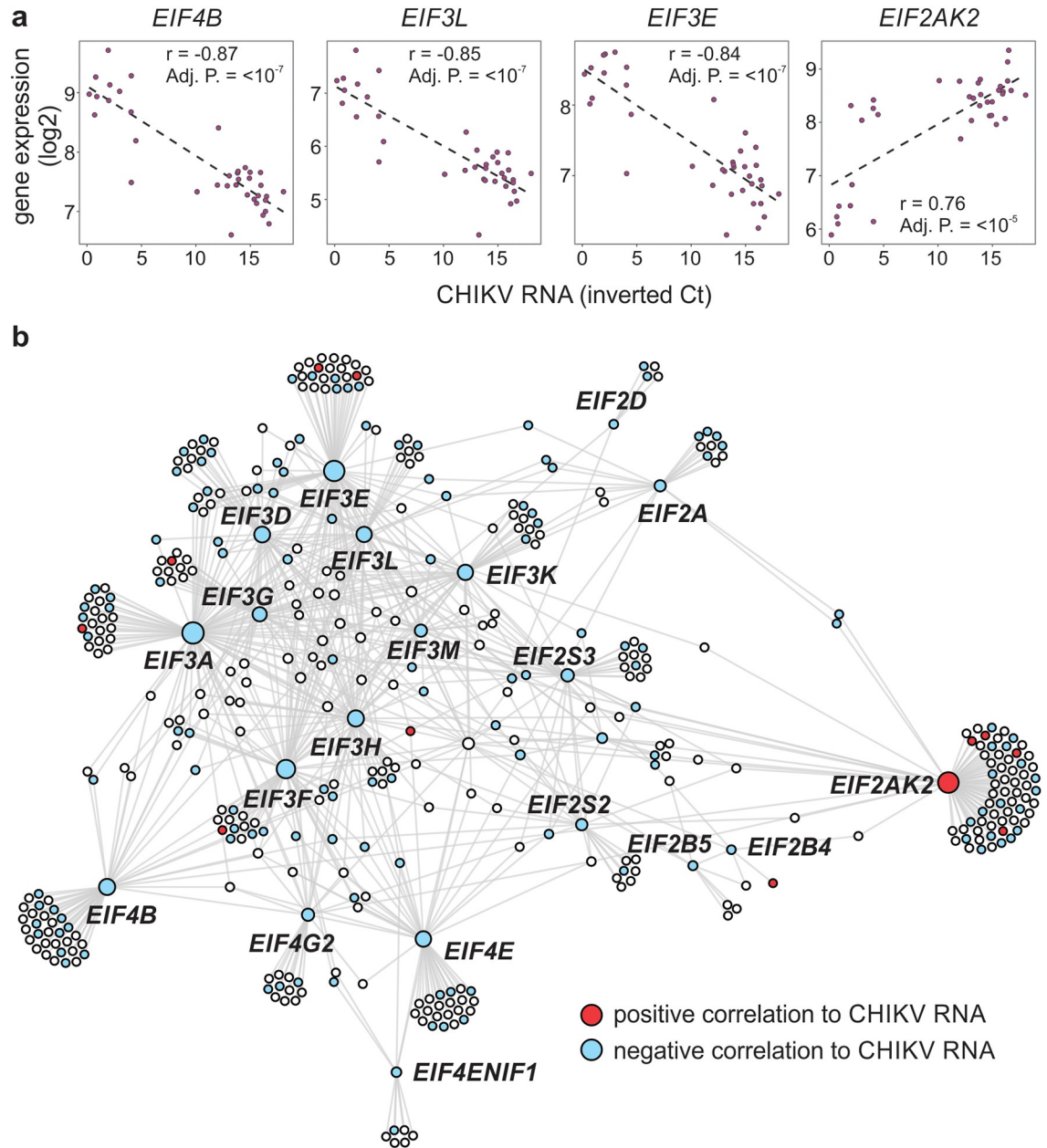
Modules (BTM) as gene sets, we ran a gene set enrichment analysis (GSEA) to reveal the BTMs related to the levels of CHIKV RNA. BTMs associated with innate immune cells (dendritic cells and neutrophils), antiviral response, inflammation and toll-like receptor signaling (Fig 2b and S4 Fig) were positively associated with the level of CHIKV RNA. BTMs negatively associated with the level of CHIKV RNA (i.e., with a negative normalized enrichment score, NES) were related to adaptive immune response, such as cell proliferation, activation and differentiation of B and T lymphocytes, as well as chemokines and cytokines that could be due to the CHIKV infection-related lymphopenia (Fig 2b) [19]. A gene network was subsequently constructed by connecting the genes related to BTMs with a negative NES score (Fig 2b) by utilizing the protein-protein interaction (PPI) data from InnateDB. Genes related to adaptive immune response and cell recruitment such as *CCL5*, *CD8A* and *CD8B*, *CD3D*, *CD19*, *CCR7* and *TCF7*, among others, appeared in the network (Fig 2c). Several of these genes are related to the homing/recruiting of the effector/memory T lymphocytes as well as the activation and induction of memory cells. The same process was performed for BTMs with positive NES scores (S2 Fig). Almost all the genes in this network were human type I ISGs (as defined by Interferome V2), which is entirely consistent with the stimulation of the type I IFN response by CHIKV dsRNA [20]. IRF7 is a central highly inducible transcription factor for driving the type I IFN responses to CHIKV [21], and OAS3, IFIT1, MX2 and RSAD2 (viperin) are key antiviral effectors [22]. SERPING1 (C1 inhibitor) is a novel finding since this inhibitor of the classical pathway of the complement system has not been associated with arthritogenic alphaviruses [23], although it is up-regulated in monocytes in HIV infections [24].

The expression of several eukaryotic translation initiation factors (eIFs) was negatively correlated with the level of CHIKV RNA (Fig 3), indicating that these genes can play a major role in viral replication. The eIFs are important proteins for controlling the translation initiation processes involved in host and viral protein syntheses [25]. A network with eIF genes was constructed (Fig 3b) among which *EIF4B*, *EIF3L*, *EIF3E* and *EIF2AK2* presented the highest negative correlation with levels of CHIKV RNA (Fig 3a). Only the *EIF2AK2* gene (also known as PKR) had a positive correlation with CHIKV RNA levels. This protein is activated by alphavirus infections and contributes to the characteristic shut-down of host cell protein synthesis, thereby allowing the preferential translation of capped viral RNA [26].

### Consistent transcriptome changes during CHIKV infection

We compared the expression profiles between all CHIKV-infected patients and healthy controls and identified 3,059 up- and 1,898 down-regulated genes in the CHIKV patients. The script and data to reproduce this result are available at [https://github.com/csbl-usp/csbl\\_chikungunya\\_edgeR](https://github.com/csbl-usp/csbl_chikungunya_edgeR).

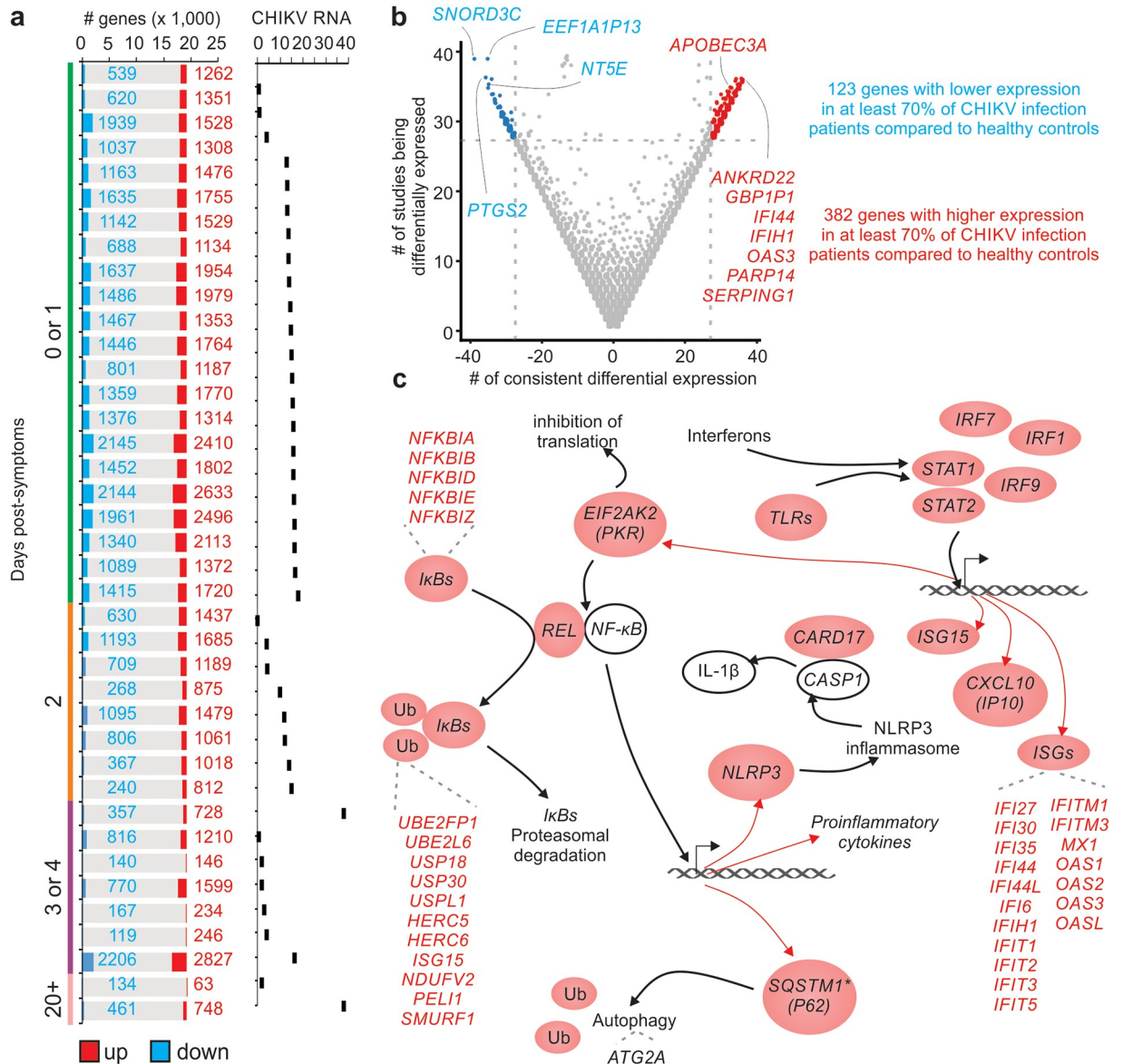
Due to the natural heterogeneity in human cohorts, we also performed differential expression analyses between each infected patient and the group of healthy controls. The patients whose blood samples were collected in the initial days post the onset of symptoms revealed higher numbers of DEGs (differentially expressed genes) detected by RNA-seq analysis and higher mean CHIKV RNA levels (Fig 4a). The DEG list for each patient was subsequently combined into a meta-volcano plot (Fig 4b). This plot displays the number of genes whose expression was consistently altered in most patients. Approximately 70% of the CHIKV-infected patients showed down-regulation of 123 genes and up-regulation of 382 genes (Fig 4b). *APOBEC3A*, *IFI44* [15] and *OAS3* were the most represented up-regulated genes and *NT5E* (also known as CD73), *PTGS2*, *SNORD3C*, and *EEF1A1P13* were the most represented down-regulated genes among the CHIKV patients (Fig 4b). APOBEC3 family members are important cytidine deaminases that control *inter alia* HIV replication [27] but have, to the best



**Fig 3. Eukaryotic Initiation Factor (eIF) genes associated with CHIKV RNA levels.** (a) Representation of the negative correlation of *eIF* genes with CHIKV RNA levels (inverse of Ct). (b) Network constructed with *eIF* genes correlating with CHIKV RNA levels and integrated with PPI data. The NetworkAnalyst tool (InnateDB PPIs; First Order) was used to construct the network and the Gephi program was used for visualization. The color of the nodes illustrates whether the correlation between gene expression and CHIKV RNA levels is positive (red) or negative (blue).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g003>

of our knowledge, not previously been associated with alphaviral infections. Interestingly, the analysis also identified *NT5E/CD73* (Fig 4b) that is an ecto-5'-nucleotidase that has been described as an important molecule for recovery of the endothelial barrier after Dengue 2 infection [28]. Vascular leakage and shock have also been reported as a severe manifestation of CHIKV [29].



**Fig 4. Differentially expressed genes in CHIKV patients.** (a) The profile of each infected patient was compared with all of the healthy controls to indicate the number of up- and down-regulated genes. The colors represent the number of up-regulated (red) or down-regulated (blue) genes and the respective number of genes in each group. The bar graph to the right indicates the CHIKV RNA levels for each patient. (b) The volcano analysis showed genes that were consistently differentially expressed ( $\log_2$  fold change  $> 1$  and adjusted p-value  $< 0.05$ ) in at least 70% of the comparisons from CHIKV patients versus healthy controls. The x-axis represents the number of consistent differential expressions of each gene while the y-axis represents the number of studies in which the genes were classified as a DEG. (c) Graphical representation of the putative relationship between some of the genes that were classified as consistently up-regulated in (b).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g004>

Through literature curation of the CHIKV gene signature, we created a network that provides novel insights into CHIKV immunobiology (Fig 4c). CHIKV infection could induce the expression of several ISGs, as well as the activation of TLRs, EIF2AK2 and IκBs. Up-regulation of STAT1, STAT2, IRF9, IRF1 and IRF7 can induce the expression of ISGs, which are important antiviral effectors. Interestingly, the CHIKV infection led to the up-regulation of several proinflammatory genes such as IκBs-related genes that are important to NFκB activation and

proinflammatory cytokines production when phosphorylated. It is integral to mention here that we also detected the up-regulation of *REL*, which is a subunit of NFκB.

DEGs related to the NLRP3 inflammasome were also detected. Chemotherapeutic inhibition of the NLRP3 inflammasome was recently shown to inhibit CHIKV arthropathy in a mouse model [30]; the current study, therefore, confirms this pathway as a potential drug target in humans. *Nlrp3* is transcriptionally regulated to guarantee high protein levels for the activation of the NLRP3 inflammasome. Its activation could lead to autophagy (*SQSTM1*) [31], apoptosis of the infected cells and the production of other cytokines (*CARD17*) [32] in response to the infection (Fig 4c). Taken together, our results expand the knowledge available about host-CHIKV interaction and provide potential therapeutic strategies that target the NLRP3 inflammasome [32].

The random forest method, a machine learning approach, was also employed to rank the importance of the 505 DEGs mentioned in the meta-volcano analysis (Fig 4b) in predicting the CHIKV infection status. S3 Fig displays the 38 genes that better distinguish between the infected patients and healthy control samples from 100 feature selection interactions (S3a Fig). On each interaction, the 59 infected patients and healthy control samples were split into training (70%) and testing (30%) sets. We subsequently applied different machine learning models (CART, kNN, SVM, RF, xgBoost, bayesglm, adaboost, ada, rpart, nnet, pls, regLogistic and dnn) on the training set to predict the testing set. Among all the models, the RF (Random Forest) model displayed better performance (S3b Fig) with an accuracy of 94.12% (Confident Interval: 71.31% up to 99.85%).

SerpinG1 is the C1 complement inhibitor (inhibiting the classical pathway of the complement) but also inhibits other proteases including MASP-1 and MASP-2 in the lectin pathway. Circulating SerpinG1 protein levels increase ~2.5 folds during inflammation [33]. Furthermore, during HIV infections, SerpinG1 mRNA levels increased in the circulating monocytes [24]. The lectin pathway has been implicated as causing the tissue damage during alphaviral arthritis caused by the Ross River virus [23], and SerpinG1 upregulation may act to limit such damage [34].

We next performed single sample GSEA analysis using the log2 fold-change values of each patient compared to the group of healthy controls as ranks and the BTMs as gene sets (S4 Fig). Similar to the results presented in Fig 2, we observed that the up-regulated BTMs were related to innate immunity and antiviral responses involving dendritic cells and monocytes activation. This is highly consistent with the work of Michlmayr et al [35].

### Potential signatures of CHIKV-induced chronic arthralgia

The patients (n = 13) who agreed to return for clinical follow-up examinations were split into those with chronic and those with non-chronic arthralgia (see Methods). These two groups showed no significant difference in the mean levels of CHIKV RNA in the serum (S5a Fig). Compared to the healthy controls, a total of 1,262 and 1,862 genes were consistently differentially expressed in most of the chronic and non-chronic patients respectively (S5b Fig). Of them, 514 genes were commonly up-regulated and 337 were down-regulated in both groups (S5c Fig). Additionally, a high positive correlation was observed between the mean log2 fold change of chronic and non-chronic patients when compared to healthy controls (S5d Fig). However, few genes presented an expression profile that differed between chronic and non-chronic patients (S5d Fig). *HLA-DRB5* was up-regulated in most non-chronic patients and down-regulated in most chronic patients (S5d Fig). However, such changes may merely be associated with the diminishing of the acute adaptive T cell responses [22]. Of considerably greater interest are the genes that are up-regulated in most chronic patients relative to non-

chronic patients. The *EIF1AY* gene belongs to the family of eukaryotic translation initiation factors (and are displayed in Fig 3). Interestingly, the *DDX3Y* is an RNA helicase that was described as an important effector of the herpes virus replication and propagation [36] but has not been described in the context of the CHIKV. However, our analyses might simply be a reflection of a greater number of males in the chronic group since several of the genes identified were Y linked. This analysis, thus, provides no support for the notion of the onset of new pathological processes in chronic diseases—an observation in agreement with murine studies [22].

### Modular expression analysis of CHIKV infection

We performed a gene co-expression network analysis using the expression profiles of all the patients and healthy controls. CEMiTool [37] identified eight co-expression modules containing 74 to over 2,000 genes (Fig 5a). The expression activity of some of these modules were altered in healthy controls or in patients that had different days post the onset of symptoms (Fig 5b). Module M8, which shows higher activity in patients with two to four days of symptoms was enriched for monocytes and neutrophils (Fig 5c). A monocyte centric response in peripheral blood from pediatric CHIKV patients has previously been documented [35] and a protective role was observed in murine models [22]. Neutrophil responses have hitherto not been described for alphaviral infections, with granulocytosis in non-human primates being predominantly unremarkable [38] and a pathogenic role for neutrophils only evident in *CCR2*<sup>-/-</sup> mice [39]. Nevertheless, although previously thought to characterize bacterial infections, neutrophil responses are now recognized in a range of acute viral infections [40, 41].

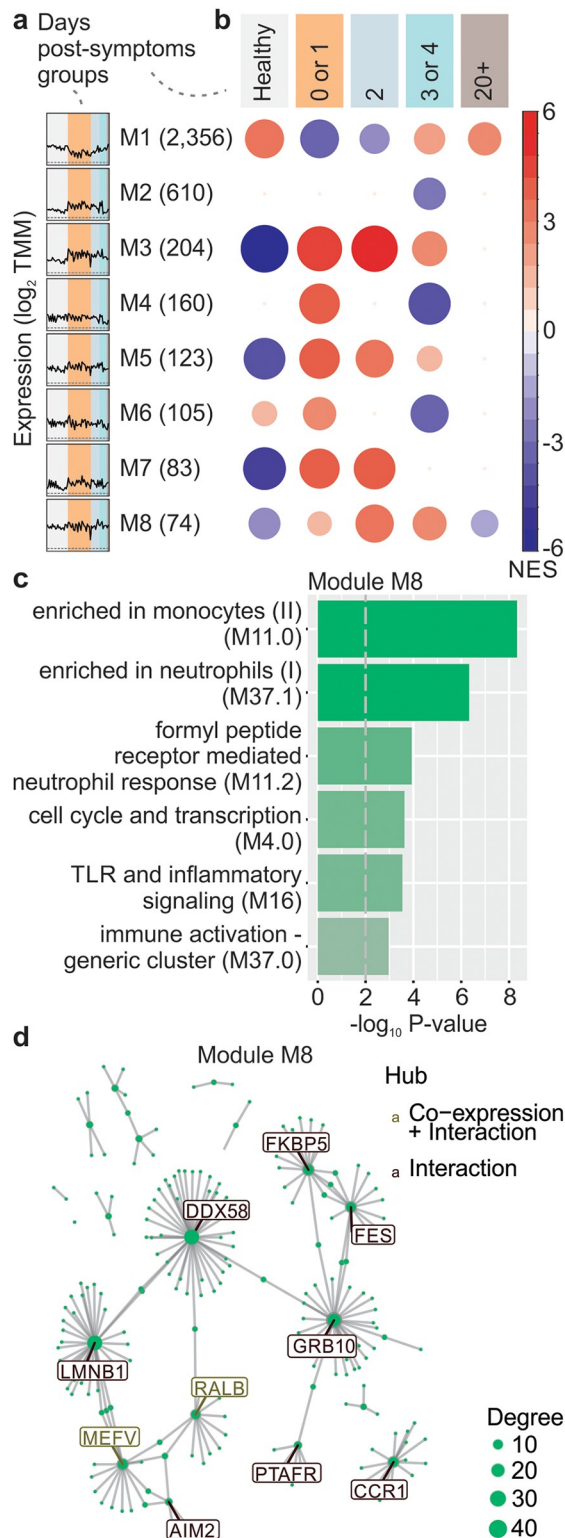
In module M8, one of the hubs contained the gene *DDX58* (also known as *RIG-I*). *RIG-I* is well described as a dsRNA sensor for CHIKV [42] and is instrumental for driving the protective and pathogenic type I IFN responses [20].

Another gene identified is *AIM2* (Fig 5d), an interferon-inducible cytoplasmic dsDNA sensor that activates the inflammasome and triggers pyroptosis. The role of *AIM2* and self-DNA in driving polyarthritis has been proposed [43], with CHIKV infection-mediated cytopathic effects conceivably providing the DNA to stimulate this pathway.

### Comparing CHIKV signature with rheumatoid arthritis and Dengue infection signatures

The CHIKV signature was compared with signatures from another viral infection (Dengue virus) and from rheumatoid arthritis (RA) to check the extent to which the gene signature was specific to CHIKV infection. We re-analyzed two publicly available blood transcriptome datasets and identified the genes whose expression was altered in the Dengue infected patients and RA patients compared to healthy controls. A total of 949, 632 and 302 genes were identified as being up-regulated only in RA, Dengue infection and CHIKV infection, respectively (Fig 6a). Among those, seven up-regulated genes were shared by all the three signatures, including the following: *OAS1*, *CIQB*, *ANKRD22*, *IRF7*, *CXCL10*, *IFI6* and *IFIT3* (Fig 6a); all of these are interferon-inducible genes. More than 300 genes were exclusively up-regulated in CHIKV infection, including the inflammasome-related *NLRP3* genes, NFκB-related genes and genes that belong to the Th2 response (*IL131RA*, *IL411*) [44] (Fig 6a).

Although no gene was down-regulated in all the three conditions, genes such as *IL7R*, *ESYT1*, *PCYOX1* and *LRRN3* were commonly down-regulated in CHIKV infection and RA samples (Fig 6b). The cytokine IL-7 is crucial for the survival of naïve and memory T cells, which are important effectors against several pathogens including viral infections. The receptor IL-7R is expressed on the surface of these cells and was shown in an animal model to



**Fig 5. Modular analysis of CHIKV infection.** (a) Expression profile of all the eight modules obtained through the CEMiTool analysis. The colors of rectangles represent the days post the onset of symptoms, and the black line represents the mean expression of all the genes inside the module. (b) Results of the gene set enrichment analysis showing the module activity for each subgroup. The size and color of the circles represent the normalized enrichment score (NES). (c) Over-representation analysis of module M8 using BTM pathways as gene sets. The pathways were

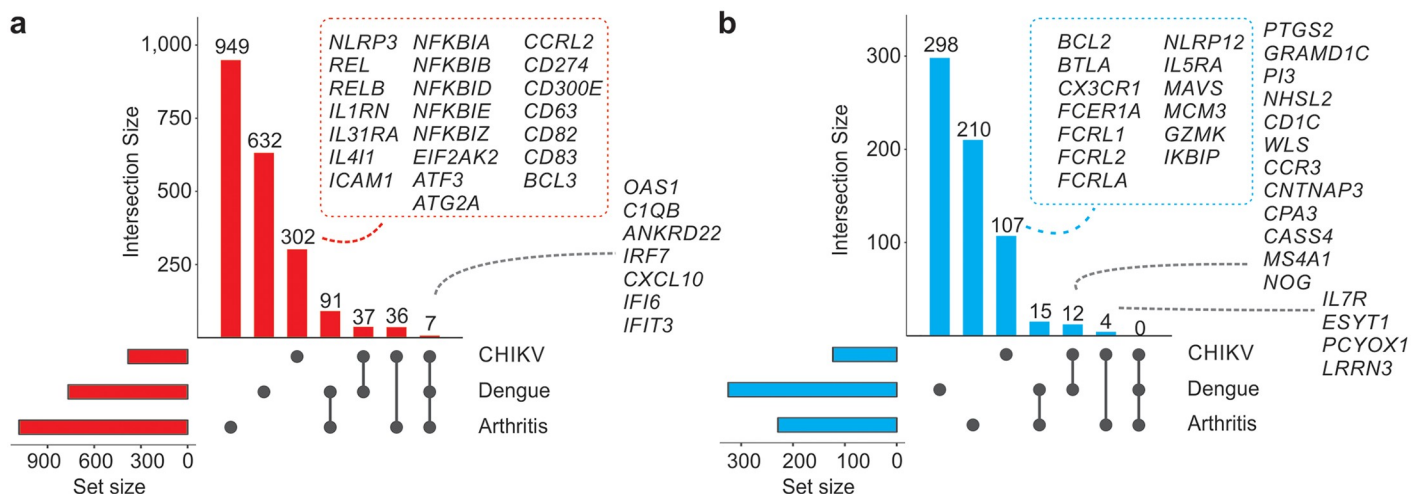
ordered by significance as indicated on the x-axis. (d) Gene network of module M8 for the top ten most connected genes (hubs) represented as nodes and their protein-protein and co-expression interactions as edges. The size of the node represents its degree of connectivity.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g005>

prevent the chronicity induced by lymphocytic choriomeningitis virus due to the enhancement of CD8 T cells' response and prevention of its exhaustion [45]. We identified a specific CHIKV signature composed of 107 down-regulated genes that includes *CX3CR1*, *BTLA*, *BCL2*, *GZMK* and three genes that encode Fc receptor-like glycoproteins (Fig 6b) that could be related to the lymphopenia induced by CHIKV infection [38]. The down-regulation of *CX3CR1* chemokine receptor 1 (*CX3CR1*) seems to be in agreement with the results of this study that showed that several T cell effector/differentiation genes were down-regulated in CHIKV infection. *CX3CR1* has been considered as an important marker of CD8 memory cells [46]. Moreover, *BCL-2* down-regulation could be a mechanism of CHIKV host response to induce apoptosis of infected cells.

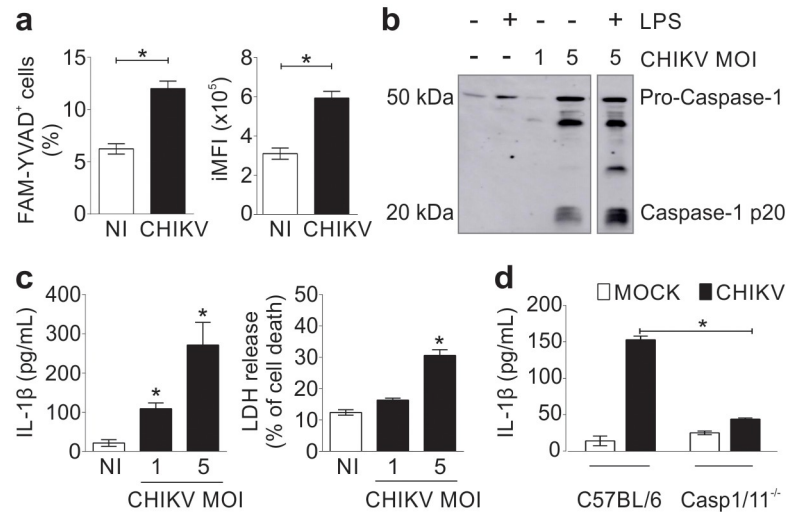
### CHIKV activates the inflammasome *in vitro*

Since the inflammasome-related genes are exclusively up-regulated in CHIKV infection and were described before in this context [30], we decided to provide a deeper proof-of-concept related to these findings. The murine bone marrow-derived macrophages were infected with CHIKV virus and the readouts of the inflammasome activation were measured. A specific dye was used that binds to active caspase-1 (FAM-YVAD) to assess caspase-1 activation with CHIKV-induced caspase-1 activation measured as a percentage of FAM-YVAD+ cells as well as the integrated mean of fluorescence (iMFI) (Fig 7a). Caspase-1 activation was further assessed by western blot and detected caspase-1 cleavage as indicated by the presence of Casp1 p20 in cells infected with PFU/cell of 5 (Fig 6c). CHIKV infection at PFU/cell of 1 and 5 induced IL-1 $\beta$  production and LDH release [indicative of pyroptosis [47]] (Fig 6d). IL-1 $\beta$  production was dependent on inflammasome activation since Casp1/11 deficient macrophages failed to trigger IL-1 $\beta$  production in response to the infection (Fig 6e). These data support the



**Fig 6. Comparing CHIKV signatures with those from rheumatoid arthritis and Dengue infection.** (a) Genes up-regulated in patients infected with either CHIKV or Dengue or rheumatoid arthritis (RA) patients compared to their respective controls. The size of the bar represents the quantity of up-regulated genes detected in one or more groups (indicated as a gray circle in the graph below). Representative up-regulated genes are displayed. The gray circles below the bars indicate the groups that share the same up-regulated genes. (b) The same approach as in (a) but for the down-regulated genes.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g006>



**Fig 7. CHIKV activates inflammasome in murine macrophages.** (a) Mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were infected with CHIKV with a PFU/cell of 5 or not infected (NI); after 24 hours of infection, the cells were stained for active caspase-1 with FAM-YVAD. The percentage (left) and the integrated mean of fluorescence (IMFI) of the activated cells (right) is shown. (b) After 24 hours of infection, supernatants were harvested from non-infected (NI) or CHIKV-infected BMDMs treated with LPS as depicted and levels of cleaved caspase-1 (p20) were detected by western blotting in the supernatant. (c) LPS-primed BMDMs were infected with CHIKV with a PFU/cell of one or five. After 24 hours of infection, the levels of IL-1 $\beta$  (left) and LDH (right) in the cell-free supernatants were measured. (d) Production of IL-1 $\beta$  by BMDMs from wild type (C57BL/6) or Casp1/11 deficient mice 24 hours post-CHIKV infection. Data from (a), (c) and (d) are represented as the mean  $\pm$  SD of the triplicate samples and are representative of the three independent experiments that yielded similar results. Statistical analysis was performed with Student's t-test. Asterisks indicate statistically significant differences. \*P < 0.05.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880.g007>

view that the inflammasome is activated in response to CHIKV infection and are consistent with our transcriptional analyses [and murine studies [30]].

## Discussion

CHIKV re-emergence in the past 15 years has led to major epidemic outbreaks in Asia, Africa, the Indian Ocean and more recently in the Americas after decades of intermittent outbreaks [48]. Despite considerable progress in understanding the infection, much of the host-pathogen interplay remains obscure.

Systems biological approaches can provide comprehensive and unbiased dissections of the complex interactions between genes and proteins in infections [16]. Relevant studies related to the natural infection by CHIKV were recently published. However, these were restricted to the analysis of a limited number of proteins [49] or of children infected with the virus [50]. Since it is extremely difficult to acquire sufficient data from naturally infected individuals for use in systems biological models of analysis, this kind of study is relatively new. The aim of the present study was to investigate the early host response to acute CHIKV infection in adults using a systems biological approach.

We acknowledge that our cohort is a limited representation of the Brazilian population. This relatively low number of subjects is due to emerging nature of CHIKV in Brazil since most research/clinical groups were not fully prepared to collect enough samples and in an adequate manner.

The most clinically relevant symptom related to CHIKV infection is peripheral symmetrical joint pain (primarily inflammatory polyarthralgia). Manifested in several CHIKV cases, it can lead to significant economic impacts and severely affect the patient's quality of life [12]. The

pain starts in the acute phase and can persist for years in up to 50% of the infected adult individuals [51]. Notably, it was proposed that CHIKV infection produced autoimmune sequelae [52]. Although polyarthralgia is rarely detected (5–11%) in children, other kinds of severe manifestations can occur [53]. Since there are neither effective treatments nor licensed vaccines against CHIKV infection, understanding the molecular mechanisms of this complex infection is essential for the development of effective therapies and even vaccines.

The individuals of our cohort were most likely infected with the CHIKV monophyletic group ECSA (East-Central-South Africa) as previously reported [18]. Other lineages can be located although CHIKV is relatively conserved. CHIKV can be genetically classified as West African or Asian, or as belonging to the Indian Ocean (IOL) or ECSA, but the pathogenesis and virulence variation in humans, among these different lineages have not been further investigated [54, 55]. Thus, we believe that in Brazilian regions with different CHIKV strains, the virulence and pathogenesis of the disease may vary.

Consistent with other reports, it was observed that the up-regulation of several genes play a role in the antiviral immune response, and many of them are ISGs [15, 56, 57]. Similarly, other reports that assessed the changes in immune cell subsets during CHIKV infection [50, 58] support the findings of this study regarding the most abundant up-regulated genes being related to neutrophils and myeloid populations and especially dendritic cells and monocytes. The monocytes have been reported recently as important inflammatory and regulatory mediators of the innate immune response to different arboviruses [16, 59]. Corroborating with these findings, the exclusive up-regulation of inflammasome-related genes was also observed. Additionally, the induction of inflammasome activation in macrophages infected with CHIKV *in vitro* was observed. These data explain our previous demonstration that NLRP3 inhibitors can interfere with the pathogenesis of CHIKV virus [30]. Here, we used BMDM from C57BL/6 wild type and *Casp1/11<sup>-/-</sup>* mice. In our previous work, we and others showed that the CHIKV infection in wild type mice induced important musculoskeletal diseases and proved it to be an appropriate murine model to study human pathogenesis [30, 60].

Moreover, the negative and significant correlation between CHIKV RNA levels and most eIF family member genes observed here have not been described previously in research regarding CHIKV infections. Furthermore, it is speculated whether the down-regulation of other eIF family members observed in these results in response to the infection could be an important host defense mechanism against the virus replication. Moreover, the protein levels may differ from the gene RNA levels detected in this work. We consider the eukaryotic translation initiation factors as potential markers of the CHIKV arthralgia chronicity and can be better exploited as novel broad-spectrum antiviral targets.

The CHIKV-related arthralgia symptom is significantly similar to rheumatoid arthritis (RA) but there are some important clinical and immunological characteristics that differ between these diseases and the different molecular signatures between both CHIKV and RA can be indicated here. Previous data showed significant concordance between rheumatoid arthritis gene signatures and a mouse model of CHIKV infection/arthrititis [14]. Here, we are presenting a more detailed comparison between both diseases in humans. It is well known that the CHIKV-related polyarthralgia affects joints and presents high inflammatory mediators that release locally as a result of the infiltration of mononuclear cells [48, 60]. Therefore, a study comparing the macrophage transcriptome in synovial fluid of both RA and CHIKV infection patients would be highly informative and enriching.

Contrariwise, when compared to the differential gene expressions of DENV infected patients, the data in this study shows specific molecular gene signatures in response to CHIKV. It is interesting to note in this context that although previous infections with ZIKV

and DENV were detected in the group of non-CHIKV-infected volunteers, specific responses for CHIKV infection were still identifiable.

Moreover, the comprehensive molecular data in this study showed novel molecules that could play a key role in the acute infection of CHIKV infection and thereby provide new candidates as targets for therapy against this incapacitating disease.

## Methods

### Sample collection and clinical information

Blood samples were collected from subjects reporting arbovirus-like symptoms in the Brazilian states of Sergipe (n = 39 infected and n = 15 controls) and São Paulo (n = 5 controls). Clinical and socio-demographic data were collected through a questionnaire filled out by the patients. Total peripheral blood was collected in Tempus tubes or in heparin-treated tubes that were subsequently transferred to tubes containing RNeasy (Thermo Fisher) and stored at -80°C. A subset of the patients (n = 13) agreed to return for a clinical follow-up. These CHIKV-infected patients were under treatment and their joint manifestations were monitored quarterly. Patients who presented joint pain associated or not with joint or periarticular edema at the onset or significant worsening (in cases of previous joint disease) of the acute febrile syndrome after three months were considered chronic patients.

### Ethics statement

This study was approved by the ethics committees from both the Department of Microbiology of the Institute of Biomedical Sciences at the University of São Paulo and the Federal University of Sergipe (Protocols: 54937216.5.0000.5467 and 54835916.2.0000.5546, respectively). Patient consent was obtained in the written format. All subjects enrolled in this study were adults. Mice experiments and the care of the mice were in compliance with the institutional guidelines on ethics in animal experiments approved by CETEA (Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, approved protocol number 14/2016). CETEA follows the Brazilian national guidelines recommended by CONCEA (Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal).

### Molecular Diagnostics

Real-time RT-PCR was performed to test for CHIKV, ZIKV and DENV as previously described [18, 61]. Nucleic acid extraction was performed using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and carried out according to the manufacturer's instructions. Molecular detection of DENV, CHIKV and ZIKV was performed by using the SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen). We performed the samples' amplification of the RNase P in parallel to evaluate the extracted RNA quality. RNA Real-Time RT-PCR reactions consisted of a step of reverse transcription at 50 °C for 15 minutes of the enzyme activation at 95 °C for 2 min, and 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min for hybridization and extension with the use of ABI 7500 equipment (Applied Biosystems). A cut-off value of Ct (Cycle Threshold) 37 was chosen as the CDC reference assay.

### Serological Diagnostics

Serum samples were evaluated with a commercial semi-quantitative ELISA kit (enzyme-linked immunosorbent assay) that detects anti-CHIKV IgM and anti-CHIKV, Zika and Dengue IgG antibodies. All procedures were carried out according to the manufacturer's instructions (Euroimmun, Lubeck, Germany). Briefly, sera were diluted in the sample buffer and incubated

at 37 °C for 60 min in a microplate well together with a calibrator and the positive and negative controls provided by the manufacturer. The optical density (O.D.) was measured in an Epoch microplate spectrophotometer (BioTek, Vermont, USA) and the results were calculated according to the manufacturer's instructions. Samples with ratio values (Extinction of the control or patient sample / extinction of calibrator) below 0.8 and above 1.1 were considered negative and positive samples, respectively. Samples with ratio values between 0.8 and 1.1 were considered inconclusive.

### RNA-seq experiments

Total RNA from Tempus tube samples were purified with the Tempus Spin RNA Isolation Kit (Invitrogen). Total RNA from the samples collected in heparin vacutainer tube and maintained in RNAlater were purified using the Ribo Pure blood isolation kit (Invitrogen). Removal of rRNA and globin-encoding mRNA, RNA fragmentation, cDNA generation, adapter ligation and PCR amplification were performed using the TruSeq stranded total RNA with ribo-zero globin sample preparation kit (Illumina). The sequencing of transcriptome libraries was performed on the Illumina HiSeq 1500 platform (Illumina, San Diego, CA). Libraries were prepared using TruSeq Stranded RNA Sample Preparation kit with Poli(A)+ selection quantified through qPCR and sequenced using HiSeq SBS V4 kit (2 x 125 bp paired-end reads).

For RNA-seq preparation, the constructed libraries from 39 infected and 20 control samples were barcoded with dual-indexes of 8bp sequence, multiplexed in 6 technical replicates for each infected sample and 2 technical replicates for each control sample. The prepared libraries were sequenced in two HiSeq Illumina runs (one high-output and another one rapid run mode) where each one of the replicates were sequenced on separated lanes to assess inter-run variability.

The complete set of raw sequences for each assay generated in the HiSeq Illumina 1500 and deposited at the NCBI can be accessed through the BioProject: PRJNA507472 and the BioSample Range SAMN10847030 to SAMN10847088.

### RNA-seq data analyses

Raw paired-end reads were preprocessed for quality control. The Trimmomatic software version 0.36 [62] has been used to remove adapters and contaminants from UniVec database (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/UniVec/>), trim the 5' and 3' ends with mean quality score below 25 (Phred+33), and discard reads shorter than 40 bp after trimming. We used the parameters "TRAILING:5 HEADCROP:0 LEADING:5 MINLEN:40 ILLUMINACLIP:Next-GenPrimerAdaptersUniVec.fa:2:30:10 SLIDINGWINDOW:25:25". Paired-end reads mapping to PhiX Illumina spike-in were removed using Bowtie 2 version 2.2.5 [63], with the parameter—very-sensitive-local. The processed forward and reverse read files were then paired using Pairfq software (<https://github.com/sestaton/Pairfq>). After preprocessing, the high quality paired-reads were mapped into the reference genome *Homo sapiens*, version GRCh38.p10 build 38 with the TopHat2 program [64] based on 57,685 genes from *Homo sapiens*, excluding the rRNA and globin genes. For the TopHat2 alignment, we considered the following parameters: minimum intron size (30pb), number of mismatches per read (3pb), number of gaps per read (3pb),—very-sensitive, maximum insertion size deletion (3bp), maximum paired-reads distance (200pb) and only concordant uniquely mapped reads (approximately 92% of the mapped reads) were used for further analyses. To quantify the gene abundance of the mapped paired-end reads in each sample, we used the featureCounts tool from the Bioconductor Rsubread package [65] with the following parameters: GTF.featureType = "exon", GTF.attrType = "gene\_id", isPairedEnd = TRUE, requireBothEndsMapped = TRUE, minOverlap = value 1,

allowMultiOverlap = FALSE, countMultiMappingReads = FALSE. The total number of read counts per gene was obtained from the RNA-seq expression. Normalization of the gene counts was performed with counts per million normalization (CPM), which accounts for differences in library size and adjusts for GC content and gene length. An unsupervised analysis was performed with the R package “PVCA” to estimate the source of variability of experimental effects [66].

The identification of differentially expressed genes (DEGs) was performed comparing each CHIKV patient to all the healthy controls, and following three steps: (1) only genes with counts per million (CPM) > 1 in at least two samples were used in the analyses; (2) differential expression test was carried out using the Bioconductor package edgeR; and (3) DEGs were identified with an adjusted p-value < 0.05 and fold change > 2. The DEGs shared among CHIKV patients were found using the MetaVolcano web tool (<https://metavolcano.sysbio.tools/>).

The Pearson correlation test ( $|R| > 0.5$  and adjust p-value < 0.01) was used to identify the associations between genes and inverse Ct. R package “randomForest” was used to perform a Random Forest analysis to classify the importance of genes correlated with CHIKV RNA in predicting CHIKV infection.

Regarding the pathways that may be related to the progression of the disease, a Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed using as ranks the correlation between the genes and inverse Ct as ranks. A set of Blood Transcriptional Modules (BTM), previously identified by our group [67] through large-scale network integration of publicly available human blood transcriptome, were used as the gene sets.

### Gene co-expression and network analysis

We performed the gene co-expression analysis using the R package CEMiTool [68]. For this analysis, we normalized the expression data using TMM (Trimmed Mean of M-values) and transformed it to a  $\log_2$  scale. We followed the default parameters with a variance filter of 0.2.

To gain a systems-level understanding of the patterns of a certain disease, one of the steps required is the construction and analysis of the network involving the most informative genes. For this, we used the NetworkAnalyst (<https://www.networkanalyst.ca/>) with the protein-protein interaction (PPI) database based on InnateDB. To improve the visualization, the software Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) and Gephi (<https://gephi.org/>) were also used.

### Meta-analysis of Dengue and rheumatoid arthritis transcriptome studies

The transcriptome datasets of patients with either rheumatoid arthritis (RA) or Dengue infection were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) under the accession codes GSE51808 and GSE94892. DEGs between RA patients and healthy controls and between Dengue-infected patients and non-infected subjects were identified using the limma package (Adjusted P-value < 0.05 and fold-change > 1.25).

### Bone marrow-derived macrophage preparation and infections

Bone marrow-derived macrophages (BMDMs) were prepared using tibia and femur from 6- to 12-week-old mice as previously described [69]. Wild type (WT) C57BL/6 mice (Jackson Laboratory, stock number 000664) and Casp1/11<sup>-/-</sup> [70] derived from C57BL/6 mouse strains were used. All mice were bred and maintained under specific-pathogen-free conditions at the animal facilities of the Medical School Ribeirão Preto (FMRP-USP).

The virus strain CHIKV BzH1 was used and virus stocks were produced by infecting Vero cells (ATCC CCL-81) with a PFU (plaque forming units)/cell of 0.1. Conditioned media used for mock infections was prepared from uninfected Vero cells in a similar manner. The PFU/

cell of 5 and the time point of 24 hours of infection was used in most of the *in vitro* experiments using BMDMs, unless otherwise stated in the figure legends.

### Quantification of IL-1 $\beta$ secretion and cell death assay

For *in vitro* cytokine determination and LDH assay, BMDMs were seeded at a density of  $2 \times 10^5$  cells/well in 48-well plates and pre-stimulated with 500 ng ml<sup>-1</sup> of LPS (tlrl-pektps; InvivoGen) for 3h, and subsequently infected with CHIKV. The cytokines in the supernatants were measured using a mouse IL-1 $\beta$  ELISA kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions. LDH measurements were performed with CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) following the manufacturer's instructions. The positive control for complete cell lysis and normalization was 9% Triton X-100 (Fisher Scientific); it was incubated with cells for 15 min. The percentage of LDH release was calculated as (mean OD value of sample / mean OD value of Triton X-100 control sample)  $\times$  100 and is shown in the figures as the percentage of cell death compared to TritonX-100 (%).

### Caspase-1 evaluation by western blot analysis and endogenous caspase-1 staining using FAM-YVAD-FMK

In order to measure active caspase-1 we used a FLICA assay. Briefly, 10<sup>6</sup> BMDMs were seeded in 12-well plates overnight, and then infected with CHIKV at a PFU/cell of 5 for 24 hours. As a positive control, we used 20  $\mu$ M of nigericin (Sigma-Aldrich) for 40–60 minutes. Following this, the cells were harvested and stained for 1 h with a green fluorescent dye that binds specifically to active caspase-1, FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry Technologies) following the manufacturer's instructions. The data were acquired on a FACS ACCURI C6 flow cytometer (BD Biosciences) and analyzed with the FlowJo software (Tree Star).

For the western blot 10<sup>6</sup> BMDMs were seeded in 6-well plates overnight and subsequently primed with 500 ng ml<sup>-1</sup> LPS (InvivoGen, tlrl-pektps) for 3 hours prior to infection with CHIKV. The supernatants were collected, and the precleared supernatants were concentrated thrice in speedvac. They were boiled in a Laemmli buffer, resolved by SDS-PAGE and transferred (Semidry Transfer Cell, Bio-Rad) to a 0.22- $\mu$ m nitrocellulose membrane (GE Healthcare). The membranes were blocked in a Tris-buffered saline (TBS) with 0.01% Tween-20 and 5% nonfat dry milk. The rat monoclonal antibody to caspase-1 p20 (1:250, Genentech, 4B4) and specific horseradish peroxidase-conjugated antibodies (1:3,000, KPL, 14-16-06 and 14-13-06) were diluted in blocking buffer for the incubations.

Data were plotted and analyzed with the GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad, San Diego, California). Multiple groups were compared by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's post-test. The differences in values obtained for the two different groups were determined using an unpaired, two-tailed Student's t-test with a 95% confidence interval. Differences were statistically significant when the p-value was less than 0.05.

## Supporting information

**S1 Table. Patient information and serological data.**  
(XLSX)

**S1 Fig. The unsupervised analysis highlights that the variation among individuals can be explained by undefined residual effects.** (a) Histogram representing the effects ordered according to their contribution to the sample's variance measured by PVCA. (b) Unsupervised principal components analysis (PCA) of the 59 subjects, classified according to the expression

data. Healthy subjects and CHIKV-infected patients are denoted by the dots colored according to their infection status.

(TIF)

**S2 Fig. The network of genes whose expression is positively correlated with the levels of CHIKV RNA.** Minimum networks constructed using the gene sets that presented a positive NES score with the NetworkAnalyst tool. The red nodes represent genes that are positively correlated with CHIKV RNA, and the color scheme indicates its strength. The gray nodes were added by NetworkAnalyst and are not a part of the correlated genes.

(TIF)

**S3 Fig. Predictive analysis using machine learning techniques.** (a) The genes were sorted in the decreasing order of the Predictor Importance of Status used in the random forest model in order to prioritize the genes that most effectively highlight the difference between between infected and healthy individuals. (b) Machine learning parameters of ROC (Receiver Operating Characteristic), sensibility and specificity for 13 different models.

(TIF)

**S4 Fig. Gene set enrichment analysis of BTM pathways.** GSEA was performed for each infected sample against the healthy control to retrieve results from the BTM pathways that were most consistently altered. The BTMs were used as gene sets and their respective log<sub>2</sub> fold-change results were considered as rank. Each column represents the results from the GSEA comparison of each infected sample with the healthy control. The pathway names are indicated in the right side of the heatmap. The pathways' profiles were ordered according to the mean of the NES scores across all patients.

(TIF)

**S5 Fig. Transcriptome changes in chronic and/or non-chronic subjects compared to healthy individuals.** (a) Comparison of the levels of CHIKV RNA (inverse of Ct) between chronic (n = 6) and non-chronic (n = 7) subjects. (b) The number of genes consistently differentially expressed in chronic (brown) and non-chronic (green) subjects. The x-axis represents the number of CHIKV-infected subjects used in each analysis and the y-axis indicates the number of DEGs consistently identified. The green and brown circles represent the number of DEGs in at least 70% of the samples in each group. (c) Representation of DEGs in at least 70% of the chronic and/or non-chronic patients compared to healthy subjects. (d) Genes that overlapped in (c) but that present an inverse behavior depending on the group. (e) Pearson correlation between mean log<sub>2</sub> fold-change of chronic patients and non-chronic patients relative to the health controls.

(EPS)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Danuza Duarte Costa, Helder I. Nakaya.

**Data curation:** Milton Yutaka Nishiyama, Junior, Helder I. Nakaya.

**Formal analysis:** Alessandra Soares-Schanoski, Natália Baptista Cruz, Milton Yutaka Nishiyama, Junior, Helder I. Nakaya.

**Funding acquisition:** Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Inácio Junqueira de Azevedo, Jorge Kalil, Helder I. Nakaya.

**Investigation:** Alessandra Soares-Schanoski, Helder I. Nakaya.

**Methodology:** Alessandra Soares-Schanoski, Natália Baptista Cruz, Luíza Antunes de Castro-Jorge, Renan Villanova Homem de Carvalho, Cliomar Alves dos Santos, Nancy da Rós, Úrsula Oliveira, Danuza Duarte Costa, Cecília Luíza Simões dos Santos, Marielton dos Passos Cunha, Maria Leonor Sarno Oliveira, Juliana Cardoso Alves, Regina Adalva de Lucena Couto Océa, Danielle Rodrigues Ribeiro, André Nicolau Aquime Gonçalves, Patricia Gonzalez-Dias, Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Inácio Junqueira de Azevedo, Dario S. Zamboni, Roque Pacheco Almeida, Milton Yutaka Nishiyama, Junior, Helder I. Nakaya.

**Project administration:** Paolo Marinho de Andrade Zanotto.

**Resources:** Helder I. Nakaya.

**Software:** Milton Yutaka Nishiyama, Junior, Helder I. Nakaya.

**Supervision:** Roque Pacheco Almeida, Paulo Lee Ho, Jorge Kalil, Helder I. Nakaya.

**Validation:** Alessandra Soares-Schanoski, Luíza Antunes de Castro-Jorge, Renan Villanova Homem de Carvalho, Dario S. Zamboni.

**Visualization:** Alessandra Soares-Schanoski, Natália Baptista Cruz, Luíza Antunes de Castro-Jorge, Renan Villanova Homem de Carvalho, Patricia Gonzalez-Dias, Milton Yutaka Nishiyama, Junior, Helder I. Nakaya.

**Writing – original draft:** Alessandra Soares-Schanoski, Natália Baptista Cruz, Luíza Antunes de Castro-Jorge, Renan Villanova Homem de Carvalho, Cliomar Alves dos Santos, Nancy da Rós, Úrsula Oliveira, Danuza Duarte Costa, Cecília Luíza Simões dos Santos, Marielton dos Passos Cunha, Maria Leonor Sarno Oliveira, Juliana Cardoso Alves, Regina Adalva de Lucena Couto Océa, Danielle Rodrigues Ribeiro, André Nicolau Aquime Gonçalves, Patricia Gonzalez-Dias, Andreas Suhrbier, Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Inácio Junqueira de Azevedo, Dario S. Zamboni, Roque Pacheco Almeida, Paulo Lee Ho, Jorge Kalil, Milton Yutaka Nishiyama, Junior, Helder I. Nakaya.

**Writing – review & editing:** Alessandra Soares-Schanoski, Andreas Suhrbier, Helder I. Nakaya.

## References

1. Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. *N Engl J Med.* 2015; 372(13):1231–9. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1406035> PMID: 25806915.
2. Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(7):491–500. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2368> PMID: 20551973.
3. Ng LC, Hapuarachchi HC. Tracing the path of Chikungunya virus—evolution and adaptation. *Infect Genet Evol.* 2010; 10(7):876–85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.012>
4. Tan Y, Pickett BE, Shrivastava S, Gresh L, Balmaseda A, Amedeo P, et al. Differing epidemiological dynamics of Chikungunya virus in the Americas during the 2014–2015 epidemic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(7):e0006670. Epub 2018/07/31. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006670>
5. Figueiredo LTM. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017; 50(5):583–4. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0397-2017> PMID: 29160502.
6. SVS-MS. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 19 de 2018. 2018.
7. Chang AY, Encinales L, Porras A, Pacheco N, Reid SP, Martins KAO, et al. Frequency of Chronic Joint Pain Following Chikungunya Virus Infection: A Colombian Cohort Study. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70(4):578–84. <https://doi.org/10.1002/art.40384> PMID: 29266783.
8. Jaffar-Bandjee MC, Ramful D, Gauzere BA, Hoarau JJ, Krejbich-Trotot P, Robin S, et al. Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010; 8(9):987–96. <https://doi.org/10.1586/eri.10.92> PMID: 20818943.

9. Bastos MLA, Abreu FS, Silva GBD, Junior. Inability to work due to Chikungunya virus infection: impact on public service during the first epidemic in the State of Ceara, northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.05.002>
10. Hossain MS, Hasan MM, Islam MS, Islam S, Mozaffor M, Khan MAS, et al. Chikungunya outbreak (2017) in Bangladesh: Clinical profile, economic impact and quality of life during the acute phase of the disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(6):e0006561. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006561> PMID: 29874242.
11. Guaraldo L, Wakimoto MD, Ferreira H, Bressan C, Calvet GA, Pinheiro GC, et al. Treatment of chikungunya musculoskeletal disorders: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2018; 16(4):333–44. <https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1450629> PMID: 29533103.
12. Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*. 2017; 127(3):737–49. <https://doi.org/10.1172/JCI84417> PMID: 28248203.
13. Joubert PE, Stapleford K, Guivel-Benhassine F, Vignuzzi M, Schwartz O, Albert ML. Inhibition of mTORC1 Enhances the Translation of Chikungunya Proteins via the Activation of the MnK/eIF4E Pathway. *PLoS Pathog*. 2015; 11(8):e1005091. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005091> PMID: 26317997.
14. Nakaya HI, Gardner J, Poo YS, Major L, Pulendran B, Suhrbier A. Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(11):3553–63. Epub 2012/07/27. <https://doi.org/10.1002/art.34631> PMID: 22833339.
15. Wilson JA, Prow NA, Schroder WA, Ellis JJ, Cumming HE, Gearing LJ, et al. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. *PLoS Pathog*. 2017; 13(2):e1006155. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006155> PMID: 28207896.
16. Kwissa M, Nakaya HI, Onlamoon N, Wrarmert J, Villinger F, Perng GC, et al. Dengue virus infection induces expansion of a CD14(+)CD16(+) monocyte population that stimulates plasmablast differentiation. *Cell Host Microbe*. 2014; 16(1):115–27. Epub 2014/07/02. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.001> PMID: 24981333.
17. Nakaya HI, Clutterbuck E, Kazmin D, Wang L, Cortese M, Bosinger SE, et al. Systems biology of immunity to MF59-adjuvanted versus nonadjuvanted trivalent seasonal influenza vaccines in early childhood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016; 113(7):1853–8. Epub 2016/01/13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519690113> PMID: 26755593.
18. Cunha MDP, Santos CAD, Neto DFL, Schanoski AS, Pour SZ, Passos SD, et al. Outbreak of chikungunya virus in a vulnerable population of Sergipe, Brazil—A molecular and serological survey. *J Clin Virol*. 2017; 97:44–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2017.10.015> PMID: 29100064.
19. Hochedez P, Jaureguierry S, Debruyne M, Bossi P, Hausfater P, Brucker G, et al. Chikungunya infection in travelers. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(10):1565–7. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060495> PMID: 17176573.
20. Prow NA, Tang B, Gardner J, Le TT, Taylor A, Poo YS, et al. Lower temperatures reduce type I interferon activity and promote alphaviral arthritis. *PLoS Pathog*. 2017; 13(12):e1006788. Epub 2017/12/28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006788> PMID: 29281739.
21. Rudd PA, Wilson J, Gardner J, Larcher T, Babarit C, Le TT, et al. Interferon response factors 3 and 7 protect against Chikungunya virus hemorrhagic fever and shock. *J Virol*. 2012; 86(18):9888–98. Epub 2012/07/05. <https://doi.org/10.1128/JVI.00956-12> PMID: 22761364.
22. Wilson JAC, Prow NA, Schroder WA, Ellis JJ, Cumming HE, Gearing LJ, et al. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. *Plos Pathogens*. 2017; 13(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006155> PMID: 28207896
23. Gunn BM, Morrison TE, Whitmore AC, Blevins LK, Hueston L, Fraser RJ, et al. Mannose Binding Lectin Is Required for Alphavirus-Induced Arthritis/Myositis. *Plos Pathogens*. 2012; 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002586> PMID: 22457620
24. Sanfilippo C, Cambria D, Longo A, Palumbo M, Avola R, Pinzone M, et al. SERPING1 mRNA overexpression in monocytes from HIV+ patients. *Inflamm Res*. 2017; 66(12):1107–16. Epub 2017/09/11. <https://doi.org/10.1007/s00011-017-1091-x> PMID: 28889214.
25. Walsh D, Mohr I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(12):860–75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2655> PMID: 22002165.
26. Carrasco L, Sanz MA, Gonzalez-Almela E. The Regulation of Translation in Alphavirus-Infected Cells. *Viruses*. 2018; 10(2). Epub 2018/02/09. <https://doi.org/10.3390/v10020070> PMID: 29419763.
27. Holmes RK, Malim MH, Bishop KN. APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing? *Trends Biochem Sci*. 2007; 32(3):118–28. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.01.004> PMID: 17303427.

28. Patkar C, Giaya K, Libraty DH. Dengue virus type 2 modulates endothelial barrier function through CD73. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88(1):89–94. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0474> PMID: 23149581.
29. Rolle A, Schepers K, Cassadou S, Curlier E, Madeux B, Hermanm-Storck C, et al. Severe Sepsis and Septic Shock Associated with Chikungunya Virus Infection, Guadeloupe, 2014. *Emerging Infectious Diseases.* 2016; 22(5):891–4. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151449> PMID: 27088710
30. Chen W, Foo SS, Zaid A, Teng TS, Herrero LJ, Wolf S, et al. Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. *Nat Microbiol.* 2017; 2(10):1435–45. Epub 2017/08/30. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0015-4> PMID: 28848230.
31. Spalinger MR, Lang S, Gottier C, Dai X, Rawlings DJ, Chan AC, et al. PTPN22 regulates NLRP3-mediated IL1B secretion in an autophagy-dependent manner. *Autophagy.* 2017; 13(9):1590–601. Epub 2017/08/09. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1341453> PMID: 28786745.
32. Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 2019. Epub 2019/05/01. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0> PMID: 31036962.
33. Kirschfink M, Nurnberger W. C1 inhibitor in anti-inflammatory therapy: from animal experiment to clinical application. *Molecular Immunology.* 1999; 36(4–5):225–32. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(99\)00048-6](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(99)00048-6)
34. Karasu E, Nilsson B, Kohl J, Lambris JD, Huber-Lang M. Targeting Complement Pathways in Polytrauma- and Sepsis-Induced Multiple-Organ Dysfunction. *Front Immunol.* 2019; 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00543> PMID: 30949180
35. Michlmayr D, Pak TR, Rahman AH, Amir E, Kim EY, Kim-Schulze S, et al. Comprehensive innate immune profiling of chikungunya virus infection in pediatric cases. *Molecular Systems Biology.* 2018; 14(8). <https://doi.org/10.15252/msb.20177862> PMID: 30150281
36. Khadivjam B, Stegen C, Hogue-Racine MA, El Bilali N, Dohner K, Sodeik B, et al. The ATP-Dependent RNA Helicase DDX3X Modulates Herpes Simplex Virus 1 Gene Expression. *J Virol.* 2017; 91(8). <https://doi.org/10.1128/JVI.02411-16> PMID: 28148788.
37. Russo PST, Ferreira GR, Cardozo LE, Burger MC, Arias-Carrasco R, Maruyama SR, et al. CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. *Bmc Bioinformatics.* 2018; 19. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2053-1> PMID: 29458351
38. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest.* 2010; 120(3):894–906. Epub 2010/02/25. <https://doi.org/10.1172/JCI40104> PMID: 20179353.
39. Poo YS, Nakaya H, Gardner J, Larcher T, Schroder WA, Le TT, et al. CCR2 Deficiency Promotes Exacerbated Chronic Erosive Neutrophil-Dominated Chikungunya Virus Arthritis. *Journal of Virology.* 2014; 88(12):6862–72. <https://doi.org/10.1128/JVI.03364-13> PMID: 24696480
40. Gabriel C, Her Z, Ng LF. Neutrophils: neglected players in viral diseases. *DNA Cell Biol.* 2013; 32(12):665–75. Epub 2013/11/19. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2211> PMID: 24236425.
41. Naumenko V, Turk M, Jenne CN, Kim SJ. Neutrophils in viral infection. *Cell Tissue Res.* 2018; 371(3):505–16. Epub 2018/01/13. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2763-0> PMID: 29327081.
42. David RYS, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, et al. Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *Elife.* 2016; 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.11275> PMID: 27011352
43. Jakobs C, Perner S, Hornung V. AIM2 Drives Joint Inflammation in a Self-DNA Triggered Model of Chronic Polyarthritis. *Plos One.* 2015; 10(6):e0131702. Epub 2015/06/27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131702> PMID: 26114879.
44. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood.* 2011; 117(14):3720–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417> PMID: 21304099.
45. Nanjappa SG, Kim EH, Suresh M. Immunotherapeutic effects of IL-7 during a chronic viral infection in mice. *Blood.* 2011; 117(19):5123–32. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323154> PMID: 21436066.
46. Gerlach C, Moseman EA, Loughhead SM, Alvarez D, Zwijnenburg AJ, Waanders L, et al. The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity.* 2016; 45(6):1270–84. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.018> PMID: 27939671.
47. Rayamajhi M, Zhang Y, Miao EA. Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol.* 2013; 1040:85–90. Epub 2013/07/16. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-523-1_7) PMID: 23852598.

48. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(4):e107–e17. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30385-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30385-1) PMID: 28159534.
49. Simarmata D, Ng DC, Kam YW, Lee B, Sum MS, Her Z, et al. Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. *Sci Rep.* 2016; 6:26097. <https://doi.org/10.1038/srep26097> PMID: 27180811.
50. Michlmayr D, Pak TR, Rahman AH, Amir ED, Kim EY, Kim-Schulze S, et al. Comprehensive innate immune profiling of chikungunya virus infection in pediatric cases. *Mol Syst Biol.* 2018; 14(8):e7862. <https://doi.org/10.15252/msb.20177862> PMID: 30150281.
51. Chopra A, Anuradha V, Lagoo-Joshi V, Kunjir V, Salvi S, Saluja M. Chikungunya virus aches and pains: an emerging challenge. *Arthritis Rheum.* 2008; 58(9):2921–2. <https://doi.org/10.1002/art.23753> PMID: 18759351.
52. Chang AY, Martins KAO, Encinales L, Reid SP, Acuna M, Encinales C, et al. Chikungunya Arthritis Mechanisms in the Americas: A Cross-Sectional Analysis of Chikungunya Arthritis Patients Twenty-Two Months After Infection Demonstrating No Detectable Viral Persistence in Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol.* 2018; 70(4):585–93. <https://doi.org/10.1002/art.40383> PMID: 29266856.
53. Lewthwaite P, Vasanthapuram R, Osborne JC, Begum A, Plank JL, Shankar MV, et al. Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(2):329–31. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080902> PMID: 19193287.
54. Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol.* 2011; 1(4):310–7. Epub 2011/10/04. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.004> PMID: 21966353.
55. Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol.* 2010; 84(13):6497–504. Epub 2010/04/23. <https://doi.org/10.1128/JVI.01603-09> PMID: 20410280.
56. Chirathaworn C, Poovorawan Y, Lertmaharit S, Wuttirattanakowit N. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pac J Trop Med.* 2013; 6(8):631–4. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60108-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60108-X) PMID: 23790334.
57. Lian JQ, Yang XF, Zhao RR, Zhao YY, Li Y, Zhang Y, et al. Expression profiles of circulating cytokines, chemokines and immune cells in patients with hepatitis B virus infection. *Hepat Mon.* 2014; 14(6):e18892. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.18892> PMID: 24976843.
58. Her Z, Malleret B, Chan M, Ong EK, Wong SC, Kwek DJ, et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. *J Immunol.* 2010; 184(10):5903–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904181> PMID: 20404274.
59. Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14(+)CD16(+) monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol.* 2017; 2(11):1462–70. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0>
60. Gardner J, Anraku I, Le TT, Larcher T, Major L, Roques P, et al. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *Journal of Virology.* 2010; 84(16):8021–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.02603-09> PMID: 20519386
61. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(5):764–7. <https://doi.org/10.3201/eid1305.070015> PMID: 17553261.
62. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014; 30(15):2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170> PMID: 24695404.
63. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods.* 2012; 9(4):357–9. Epub 2012/03/06. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923> PMID: 22388286.
64. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 2013; 14(4):R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36> PMID: 23618408.
65. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014; 30(7):923–30. Epub 2013/11/15. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656> PMID: 24227677.
66. Jianying Li PRB, Tzu-Ming Chu, Russell D Wolfinger. Principal Variance Components Analysis: Estimating Batch Effects in Microarray Gene Expression Data2009 02 November 2009.
67. Li S, Roupheal N, Duraisingham S, Romero-Steiner S, Presnell S, Davis C, et al. Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biology study of five human vaccines. *Nat Immunol.* 2014; 15(2):195–204. <https://doi.org/10.1038/ni.2789> PMID: 24336226.

68. Russo PST, Ferreira GR, Cardozo LE, Burger MC, Arias-Carrasco R, Maruyama SR, et al. CEMiTool: a Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. *Bmc Bioinformatics*. 2018; 19(1):56. Epub 2018/02/21. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2053-1> PMID: [29458351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29458351/).
69. Marim FM, Silveira TN, Lima DS Jr., Zamboni DS. A method for generation of bone marrow-derived macrophages from cryopreserved mouse bone marrow cells. *Plos One*. 2010; 5(12):e15263. Epub 2010/12/24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015263> PMID: [21179419](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21179419/).
70. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 1995; 267(5206):2000–3. Epub 1995/03/31. PMID: [7535475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7535475/).