



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ITHALLO SATHIO BESSONI TANABE

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM PACIENTES  
ATENDIDOS NO SUS/ALAGOAS**

Maceió - AL

2017

ITHALLO SATHIO BESSONI TANABE

**PROSPECÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E  
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS CHIKUNGUNYA EM PACIENTES  
ATENDIDOS NO SUS/ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva.  
Co-orientador: Prof. Dr. Ênio José Bassi

Maceió - AL

2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale CRB4/661

T161p Tanabe, Ithallo Sathio Bessoni.  
Prospecção de marcadores imunológicos e caracterização molecular do vírus chikungunya em pacientes atendidos no SUS/Alagoas / Ithallo Sathio Bessoni  
Tanabe. – 2017.  
67 f. : il.

Orientador: Luiz Antônio Ferreira da Silva

Coorientador: Ênio José Bassi.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Computação. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 55-66.

Apêndice: f. 67.

1. Vírus Chikungunya (CHIKV). 2. Técnica de genotipagem. 3. Citocinas.  
4. Quimiocinas. 5. Biomarcadores. I. Título.

CDU: 57.083.2/.3



## Folha de Aprovação

Ithallo Sathio Bessoni Tanabe

Prospecção de marcadores imunológicos e caracterização molecular do vírus Chikungunya em pacientes atendidos no SUS/Alagoas

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 11 de dezembro de 2017.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Enio José Bassi (Coorientador)

Prof.ª Dr.ª Alessandra Abel Borges – (UFAL)

Prof. Dr. Juliano Bordignon - (Instituto Carlos Chagas - Fiocruz/PR)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade e todos os irmãos em Cristo que sempre me apoiaram a nunca desistir, por mais distante que este caminho já esteve.

Aos meus orientadores, Ênio José Bassi e Luiz Antônio Ferreira da Silva, pela paciência, confiança e apoio na transmissão de conhecimentos e amor à ciência; incluindo todos meus ex-orientadores ao longo da vida acadêmica: Tereza Calado, Gabriel Skuk, Célia Lira, Ana Maria Queijeiro, Francisco Tovar e Regianne Kamiya.

Ao Ministério da Saúde/CNPq/SESAU-AL/FAPEAL pelo financiamento do projeto (Nº PPSUS 60030 000841/2016).

À equipe do LACEN/AL, especialmente: Magliones Carneiro de Lima e Jean Fábio Ferro pelo auxílio na obtenção das amostras positivas e testes lá realizados, assim como a todos os pacientes.

À equipe do HEMOAL e doadores que foram cruciais para obtenção das amostras controle.

A todos os integrantes e colegas do ICBS, PPGCS - UFAL e colegas de trabalho da UFAL/Campus Arapiraca: Profa. Elaine Virgínia, MSc. Diego Figueredo, Profa. Karol Fireman, Prof. Alysson Duarte, Profa. Carolinne Marques, Elaine de Lima e Profa. Eliane Cavalcanti, pela receptividade, companheirismo e compreensão, assim como todos os servidores desta unidade e companheiros do Laboratório de Biologia Molecular e Expressão Gênica – LABMEG.

Aos lapevianos: profa. Alessandra Borges, profa. Silvana Ayres, profa. Laura Vasconcelos, profa. Letícia Anderson, Ana Rachel, Stephannie Maia, Wanessa Martins, Elane Santos, Fábio Santos, Felipe Rodrigues, Isadora Calazans, Jesualdo Vasconcelos e demais membros do LAPEVI e IMUNOREG por toda ajuda e momentos divertidos que colocavam leveza frente às extensas rotinas laboratoriais.

A todos verdadeiros amigos que a vida me apresentou, que sempre me apoiaram em tantas fases da minha vida.

A toda a minha nova grande família “Lopes” e “Lira”: minha sogra Ana Júlia, meu sogro Valdomiro e cunhados-irmãos: Eloana e Euclides, assim como todos os primos, tios e seus respectivos.

Aos meus pais, Fátima Bessoni e Ricardo Tanabe juntamente com toda minha pequena grande família: meus irmãos, Leandro e Leonardo; minhas sobrinhas

Letícia, Lorena e Isabella; e cunhadas, Patrícia e Cibele; minhas segundas mães: Rose, Dora, Nonom e vovó; obrigado pela compreensão na minha ausência e apoio sobre algo que muitas vezes nem entendem o porquê.

À minha companheira, Eloiza Tanabe, pelo apoio incondicional ao longo desses anos, desde o primeiro sorriso. Não seria possível chegar até aqui, se não fosse com você!

## RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é uma arbovirose caracterizada por início de febre abrupto, erupção cutânea e artralgia severa. No Brasil, observou-se um aumento crescente no número de casos desta infecção no ano de 2016 em Alagoas, porém, pouco ainda se conhece a respeito da sua imunopatologia e epidemiologia molecular. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização molecular do genótipo do CHIKV circulante durante o surto em Alagoas no ano de 2016 e a prospecção de marcadores imunológicos em pacientes infectados com este vírus na fase aguda da doença. Para tal, foram utilizadas amostras positivas para detecção do genoma viral por RT-PCR em tempo real provenientes do Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN/AL). Dentre estas, foram selecionadas amostras para sequenciamento de DNA (n=11) de uma região parcial do gene correspondente a proteína *E1* seguido de análise filogenética. Para a quantificação de analitos solúveis, os níveis séricos de citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (IL-8, MIG, MCP-1, IP-10 e RANTES) foram determinados por citometria de fluxo pela metodologia de *cytometric bead array* (CBA) em amostras positivas para o CHIKV até 5 dias pós-início dos sintomas (n=36) e comparados com doadores de sangue saudáveis (n=23). Neste estudo, todas as amostras sequenciadas foram agrupadas no ramo do genótipo ECSA (do inglês, “*East/Central/South African*”) do CHIKV. Na fase aguda virêmica da infecção, o perfil imunológico foi caracterizado por uma resposta inflamatória predominantemente mediada por IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 e MIG, incluindo um aumento da citocina antiviral IFN- $\alpha$ . De forma interessante, foi detectado ainda um aumento de IFN- $\gamma$ , que induz a produção das quimiocinas MIG e IP-10. Além disso, estudos prévios mostraram uma correlação positiva entre IL-6, MIG e MCP-1 com a gravidade da doença e carga viral elevada. Em conclusão, este estudo relata a linhagem ECSA do CHIKV no surto de 2016 no Estado de Alagoas e reporta os analitos IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 e MIG como os principais biomarcadores presentes na fase aguda da infecção. Esses resultados contribuem para compreensão da imunopatologia e descoberta de biomarcadores imunológicos de fase aguda que possam estar associados ao prognóstico, cronicidade e à morbidade dessa arbovirose.

**Palavras-chave:** vírus Chikungunya, Genotipagem, Citocinas, Quimiocinas, Biomarcadores.

## ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an arboviral disease characterized by onset of abrupt fever, rash and severe arthralgia. In Brazil, since the first report of autochthonous transmission in 2014, there has been a huge increase in the number of cases, however, little is known about its immunopathology and the immune response against the virus. Thus, the present study aimed to characterize the genotype of CHIKV strains detected during the outbreak in Alagoas in 2016 and to evaluate the levels of cytokines and chemokines in serum samples from patients infected with CHIKV in the acute phase of the disease. For this purpose, samples confirmed by real-time RT-PCR during the outbreak of 2016 were gently provided by the Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN / AL) and some of these were selected for DNA sequencing (n=11) of the partial *E1* genome region followed by phylogenetic analysis. In addition, serum levels of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ ) and chemokines (IL-8, MIG, MCP-1, IP-10 and RANTES) were evaluated by CBA flow cytometry in CHIKV positive samples up to 5 days post-onset of symptoms (n=36) and compared to healthy blood donors samples (n=23). In this study, all analyzed samples were grouped in the ECSA CHIKV genotype branch. The patient's immune profile was characterized by an acute inflammatory response predominantly mediated by IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 and MIG including an increase of IFN- $\alpha$  that has a powerful antiviral activity. Interestingly, an increase in IFN- $\gamma$  as well as MIG and IP-10 which are both IFN gamma-induced chemokines were also detected. Additionally, high levels of analytes associated to disease severity and high viral loads in previous studies such as IL-6, MIG and MCP-1 were detected in serum samples. In conclusion, this study reports the ECSA lineage in the outbreak of 2016 in the State of Alagoas and detected IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 and MIG as the main biomarkers in the acute phase of CHIKV infection. These results can contribute to understand the CHIKV-immune system interaction and immunopathology as well as discovery of acute phase biomarkers that could be associated with prognosis and morbidity of this infectious disease.

**Keywords:** Chikungunya virus, Genotyping, Cytokines, Chemokines, Biomarkers.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo CHIKV .....	17
Figura 2 – Distribuição mundial das diferentes cepas do vírus CHIKV desde os surtos de 1953 – 2014 .....	20
Figura 3 – Taxa de incidência de casos suspeitos de febre de Chikungunya no Brasil, por Estado, no ano de 2016 .....	21
Figura 4 - Número de amostras positivas para CHIKV detectadas por RT-qPCR pelo LACEN/AL em 2016.....	33
Figura 5 – Distribuição das amostras selecionadas para o sequenciamento e genotipagem do vírus CHIKV no Estado de Alagoas (n=11). .....	34
Figura 6 – Amplificação da região parcial do gene correspondente a proteína <i>E1</i> do CHIKV por RT-PCR .....	35
Figura 7 – Análise filogenética de genótipos do CHIKV circulantes em Alagoas no surto de 2016 com base na análise da sequência parcial de nucleotídeos do gene correspondente a proteína <i>E1</i> .....	36
Figura 8 – Alinhamento de sequências de nucleotídeos de amostras provenientes de Alagoas (n=11) em comparação com cepas do genótipo ECSA do CHIKV provenientes de vários países do mundo.....	38
Figura 9 – Níveis de citocinas séricas quantificadas pela metodologia de CBA.....	44
Figura 10 – Níveis de quimiocinas séricas quantificadas pela metodologia de CBA.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais arbovírus que provocaram surtos no ano de 2016, com seus respectivos gêneros e países que estes afetaram .....	14
Tabela 2 – Iniciadores de CHIKV para o gene alvo NSP4 .....	29
Tabela 3 – Informações das amostras selecionadas para o sequenciamento e genotipagem do vírus CHIKV no estado de Alagoas (n=11). .....	34
Tabela 4 – Características das amostras utilizadas no estudo (média de idade, gênero, IgM e IgG anti-CHIKV e dias pós-início dos sintomas) .....	39
Tabela 5 – Amostras obtidas de doadores de sangue saudáveis utilizadas como controle negativo (n=23) .....	40
Tabela 6 – Amostras positivas para CHIKV na fase aguda virêmica com até 5 dias pós-início dos sintomas.....	41
Tabela 7 – Níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pacientes na fase aguda virêmica da infecção pelo CHIKV e doadores saudáveis.....	43
Tabela 8 – Citocinas e quimiocinas avaliadas neste estudo frente a outros trabalhos científicos .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIKF	Febre Chikungunya
CHIKV	Vírus Chikungunya
CT	do inglês, " <i>Cycle threshold</i> "
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E1	Proteína E1 do envelope viral
E2	Proteína E2 do envelope viral
ECSA	do inglês " <i>East/Central/South African</i> "
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator Estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HGF	Fator de crescimento de hepatócito
ICTV	do inglês, " <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> "
IFN- $\alpha$	Interferon-alfa
IFN- $\beta$	Interferon-beta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-12p70	Interleucina-12p70 (glicoproteína heterodimérica de 70kDa)
IL-17	Interleucina-17
IL-1 $\beta$	Interleucina-1-beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IP-10	Proteína induzida por interferon-gama - 10
LACEN/AL	Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Alagoas
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos - 1

MIG	Monocina induzida por Interferon-gama
NCBI	do inglês, “ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”
NKs	Células Natural <i>Killer</i>
nsP1	Proteína não-estrutural 1
nsP2	Proteína não-estrutural 2
nsP3	Proteína não-estrutural 3
NSP4	Proteína não-estrutural 4
PAMP's	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PRR's	Receptores de reconhecimento de padrões
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RANTES	Regulado na ativação, expresso em célula T normais e secretado
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Meio de cultura desenvolvido pelo “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
RT-PCR	Reação de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	Reação de transcrição reversa seguido da PCR quantitativa em tempo real
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TIM-1	Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T (receptor)
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
WHO	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO .....	14
2.1 Arbovírus .....	14
2.1.1 Alphavirus.....	15
2.1.2 CHIKV .....	15
2.2 Epidemiologia do CHIKV .....	19
2.2.1 Histórico no Brasil.....	21
2.3 Imunopatologia da infecção por CHIKV.....	22
2.3.2 Resposta imunológica inata .....	23
2.4 Citocinas e quimiocinas como marcadores imunológicos da infecção aguda e crônica pelo CHIKV .....	24
3. OBJETIVO .....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos .....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Pacientes e amostras .....	28
4.2 Detecção molecular .....	28
4.2.1 Iniciadores .....	29
4.3 Detecção de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV .....	29
4.4.1 Extração e Amplificação .....	30
4.4.2 Purificação e sequenciamento .....	31
4.4.3 Genotipagem e análise filogenética.....	31
4.5 Quantificação de analitos solúveis em amostras de soro por CBA ( <i>cytometric bead array</i> ) .....	32
4.6 Análise estatística .....	32
5. RESULTADOS .....	33
5.1 Amostras de pacientes positivas para o CHIKV .....	33
5.3 Genotipagem e análise filogenética do CHIKV em amostras de Alagoas .....	35
5.4 Prospecção de marcadores imunológicos no soro de pacientes na fase aguda virêmica da infecção pelo CHIKV .....	39
5.4.1 Aspectos epidemiológicos das amostras.....	39
5.4.2 Detecção de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV .....	39
5.4.3 Quantificação de citocinas e quimiocinas.....	42
6. DISCUSSÃO .....	46
7. CONCLUSÃO.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
APÊNDICE.....	67

## 1. INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um *Alphavirus* emergente transmitido por mosquitos destacando-se os do Gênero *Aedes*. A doença é caracterizada por início de febre, erupção cutânea e artralgia severa. No ano de 2016, surtos de infecção pelo CHIKV foram relatados principalmente na região nordeste do Brasil, sendo o Estado de Alagoas, um dos seis estados que tiveram incidência acima de 400 casos suspeitos/100.000 habitantes.

Este cenário incentivou esforços para compreender esta arbovirose por diferentes perspectivas, no entanto, pouco ainda se conhece a respeito da resposta imunológica desenvolvida contra este vírus, quais citocinas/quimiocinas estariam presentes nesta infecção, assim como, quais poderiam estar correlacionadas com o prognóstico, gravidade e cronicidade desta doença, principalmente no Brasil.

Além disso, o genótipo do CHIKV circulante em epidemias, bem como, possíveis alterações moleculares que este vírus por ventura possa portar em uma determinada localidade, permanece como uma incógnita para alguns estados brasileiros, como é o caso de Alagoas.

Diante do problema de saúde pública enfrentado com a emergência deste vírus no país, neste trabalho buscou-se realizar a prospecção de marcadores imunológicos produzidos em resposta a infecção pelo CHIKV na fase aguda virêmica, assim como, a análise filogenética deste vírus, determinando o genótipo circulante no surto do ano de 2016 no Estado de Alagoas.

## 2. REVISÃO

### 2.1 Arbovírus

As arboviroses são infecções causadas por arbovírus (do inglês, “*arthropod-borne virus*”) transmitidos por vetores artrópodes, geralmente mosquitos, carrapatos e moscas de areia (DAVIS; BECKHAM; TYLER, 2008). Nestas infecções, os vírus são transmitidos biologicamente, ou seja, deve ocorrer a replicação viral no vetor e não apenas a transmissão mecânica, na qual a transmissão ocorre apenas pela contaminação viral das peças bucais do vetor (WEAVER, 1997). Dentre os vírus transmitidos por artrópodes, alguns gêneros são responsáveis por grandes epidemias destacando-se o gênero *Orthobunyavirus* (família *Peribunyaviridae*); *Flavivirus*, (família *Flaviviridae*) e o gênero *Alphavirus* (família *Togaviridae*) ((ICTV), 2017; WEAVER; REISEN, 2010; WESTAWAY et al., 1985). Recentemente, no Brasil, os arbovírus relacionados a grandes surtos de infecções em seres humanos foram o vírus da Dengue, Zika e Chikungunya, sendo os dois primeiros pertencentes ao gênero *Flavivirus* e o último ao *Alphavirus* (Tabela 1).

**Tabela 1 – Principais arbovírus que provocaram surtos no ano de 2016, com seus respectivos gêneros e países que estes afetaram**

GÊNERO	EXEMPLOS DE ESPÉCIES	PAÍSES COM SURTOS REPORTADOS (2016)
<i>Orthobunyavirus</i>	<i>Oropouche orthobunyavirus</i>	Peru.
	<i>Dengue virus</i>	Brasil, Filipinas, Malásia, Burquina, Ilhas Salomão.
<i>Flavivirus</i>	<i>Zika virus</i>	Papua Nova Guiné, Peru, Santa Lúcia, Chile, Vietnã, Dominica, Cuba, Argentina, França, Países Baixos, Trinidad e Tobago, Estados Unidos da América, Maldivas, República Dominicana, Haiti, Bolívia, Guiana, Barbados, Equador, Porto Rico, Guiana Francesa e Martinica.
	<i>Yellow fever virus</i>	Angola, República Democrática do Congo, Uganda, China e Quênia.
<i>Alphavirus</i>	<i>Chikungunya virus</i>	Brasil, Bolívia, Colômbia, Argentina e Quênia.

Fonte: Autor (2017)

### 2.1.1 *Alphavirus*

Os vírus do gênero *Alphavirus* são envelopados e possuem duas glicoproteínas de superfície com papel de adesão, fusão e penetração na célula hospedeira. Os vírions são esféricos possuindo um diâmetro de 60 e 70 nm e genoma composto de RNA fita simples de polaridade positiva com aproximadamente 11,7 kb. Os sintomas característicos das infecções ocasionadas por *Alphavirus* apresentam-se geralmente de duas formas: uma é tipificada por febre, mal-estar, dor de cabeça e/ou sintomas de encefalite como, por exemplo, na infecção pelo vírus da encefalite equina, seja ocidental ou venezuelana; e outra, caracterizada por febre, artralgia e erupção cutânea, sintomas característicos da infecção pelos vírus Chikungunya (CHIKV), Mayaro e *Ross River* (BARON; FONS; ALBRECHT, 1996).

### 2.1.2 CHIKV

O CHIKV é um arbovírus re-emergente, membro da família *Togaviridae* transmitido principalmente por mosquitos pertencentes ao Gênero *Aedes* (CHIRATHAWORN et al., 2013; GASQUE et al., 2015; PIALOUX et al., 2007). Este vírus foi isolado pela primeira vez na Tanzânia em 1952-1953, sendo a manifestação clínica desta infecção caracterizada por febre, dor de cabeça, *rash* cutâneo e poliartralgia persistente, podendo a poliartralgia permanecer por anos em alguns pacientes (CHOW et al., 2011; ROSS, 1956; TANG, 2012).

O genoma viral possui aproximadamente 11,8 kb e é composto por RNA fita simples e de senso positivo codificando cinco proteínas estruturais (C-E3-E2-6K-E1) e quatro não estruturais (nsP1, helicase nsP2, nsP3 e polimerase NSP4) (STRAUSS; STRAUSS, 1994). A nsp1 está relacionada com a síntese do RNA viral, já a nsp2 possui funções de helicase, e a nsp3 e nsp4 tratam-se de replicase e RNA polimerase viral, respectivamente (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007; GARMASHOVA et al., 2007; JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; SALONEN; AHOLA; KAARIAINEN, 2005). As glicoproteínas E1 e E2 do envelope são componentes das espículas virais que facilitam a ancoragem à superfície e a entrada do vírus nas células do hospedeiro. A glicoproteína de envelope E1 é uma proteína de fusão de classe II que medeia a fusão de membrana desencadeada pelo pH durante a infecção viral. A proteína de envelope E2 é uma glicoproteína transmembrana do



tipo I e se liga aos receptores celulares, de modo a entrar na célula hospedeira através de endocitose mediada pelo receptor. (BREHIN et al., 2008; KIELIAN; REY, 2006; MARSH; HELENIUS, 1989).

Até o momento, foram identificados três genótipos do CHIKV: África Ocidental (do inglês “*West African*”), Leste/Central/Sul da África (ECSA, do inglês *East Central South African*) e Asiático (NUNES et al., 2015; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

### 2.1.2.1 Vetores e ciclos

O gênero de mosquitos *Aedes* tem sido descrito como o principal vetor do CHIKV (MOURYA; MISHRA, 2006; PIALOUX et al., 2007). Esta doença tem dois ciclos distintos de transmissão: enzoótico/silvestre e urbana. O ciclo enzoótico/silvestre ocorre principalmente em primatas não humanos na África, onde vários gêneros do mosquito *Aedes* (*Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. furcifer* e *Ae. taylori*) são os principais vetores de transmissão do vírus (JUPP et al., 1981; POWERS et al., 2000; RICHARD; PAOAAFAITE; CAOLORMEAU, 2016; WEINBREN; HADDOW; WILLIAMS, 1958). A transmissão do vírus de primatas não humanos para seres humanos pode ocorrer no ciclo silvestre através da picada de mosquito (LAHARIYA; PRADHAN, 2006; ROUGERON et al., 2015; STAPLES ; FISCHER 2014) e o homem pode eventualmente se infectar quando entra em ambientes de florestas (CAGLIOTI et al., 2013). Embora alguns vertebrados selvagens e domésticos tenham sido diagnosticados como positivos para CHIKV, o título de anticorpos encontrado foi baixo nestes animais (TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2016). Por conseguinte, acredita-se que os primatas não humanos desempenham um papel crucial na amplificação viral, embora o papel de outras espécies animais não possa ser desconsiderado na manutenção do ciclo enzoótico (TSETSARKIN et al., 2016). Estudos utilizando primatas não-humanos demonstraram que estes durante o período de viremia, apresentam febre alta e erupção cutânea (CHEN et al., 2010; LABADIE et al., 2010; MESSAOUDI et al., 2013).

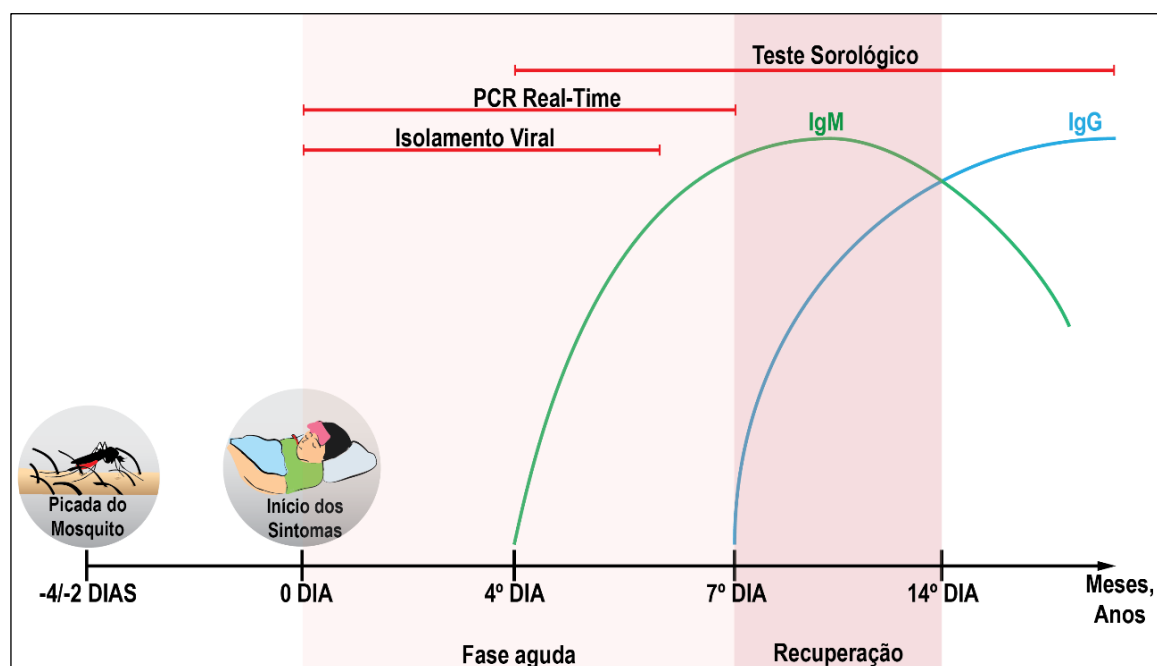
Em relação ao ciclo urbano, a transmissão de CHIKV ocorre principalmente pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* infectados, sendo estas as principais espécies associadas a casos de febre de Chikungunya (CHIKF) em diversos locais do mundo (JUPP et al., 1981; RAO, 1964). Nos mosquitos, o

vírus atinge e infecta as células epiteliais do intestino médio, e assim, quando o vírus chega a hemolinfa, ocorre a disseminação para os outros órgãos. De forma importante, é necessário que o vírus atinja e se replique nas glândulas salivares para garantir uma transmissão bem-sucedida (WONG et al., 2016). Após a picada, já no hospedeiro, o CHIKV tem demonstrado tropismo para fibroblastos teciduais (COUDERC et al., 2008).

### 2.1.2.2 Diagnóstico da infecção por CHIKV

Atualmente, diferentes métodos são utilizados para o diagnóstico da infecção pelo CHIKV, como a detecção de RNA viral, presença de anticorpos IgM e IgG contra o vírus e isolamento viral em cultura celular “*in vitro*”. No entanto, os diferentes métodos são eficientes somente em determinados períodos da doença, de acordo com a presença de viremia e o tempo para o desenvolvimento da resposta imune humoral contra o vírus, conforme mostrado na Figura 1.

**Figura 1 – Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo CHIKV**



Legenda: Vários métodos podem ser usados para o diagnóstico da infecção pelo CHIKV. Na fase de viremia, tanto a detecção de genoma viral por PCR em tempo real, quanto o isolamento viral, a partir de amostras de soro, podem ser usados para detecção viral. Além disso, os anticorpos IgM e IgG contra o vírus podem ser detectados por imunoenaios após o desenvolvimento da resposta imune humoral corroborando no diagnóstico desta arbovirose.

Fonte: Autor (2017)

### *2.1.2.3 Detecção do RNA viral*

Os testes de biologia molecular utilizados no diagnóstico de doenças virais geralmente consistem na detecção de sequências genéticas específicas comuns a cada vírus, principalmente em regiões conservadas do genoma viral (genes não estruturais) ou nas regiões do genoma responsáveis pela codificação de proteínas estruturais, como as glicoproteínas do envelope (*E1* e *E2*). No caso do CHIKV, por ser um vírus de RNA, a reação de transcrição reversa deve ser feita previamente à amplificação da região alvo de interesse (PASTORINO et al., 2005; PFEFFER et al., 2002).

### *2.1.2.4 Isolamento viral*

O isolamento viral em cultura de células exige mais tempo e conhecimentos técnicos, no entanto, é considerado como "padrão-ouro" no diagnóstico de doenças virais (LELAND; GINOCCHIO, 2007). Neste caso, células Vero E6 e células C6/36 têm sido infectadas com sucesso utilizando soro de pacientes com suspeita de infecção por CHIKV e depois incubadas a 30°C em meio RPMI-1640 suplementado com aminoácidos não essenciais, gentamicina, anfotericina B e 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (IGARASHI, 1978).

### *2.1.2.5 Testes sorológicos*

Os anticorpos presentes na circulação contra vírus podem ser detectados por vários testes, tais como ELISA, imunofluorescência ou ensaios imunocromatográficos. Os ensaios de detecção de anticorpos IgM e/ou IgG específicos para o CHIKV por ELISA são amplamente utilizados para o diagnóstico da doença. Em geral, a detecção de IgM já se torna possível entre o terceiro ao oitavo dia pós-início dos sintomas (CHUA, C. L. et al., 2017). Em um estudo que avaliou a cinética da produção de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV, foi mostrado que anticorpos IgM foram detectados em todos os pacientes a partir do quarto dia pós-infecção e que os anticorpos IgG foram detectados por volta do sexto dia de infecção (PRINCE et al., 2015), corroborando assim com outros trabalhos que reportaram tempos semelhantes para a detecção destes anticorpos (CHUSRI et al.,

2014; LANCIOTTI et al., 2007; PANNING et al., 2008; RAMFUL et al., 2007; STAPLES; FISCHER, 2014).

## 2.2 Epidemiologia do CHIKV

O primeiro caso relatado de infecção humana por CHIKV ocorreu na Tanzânia em 1952-1953 e, desde então, vários surtos ocorreram no continente africano (POWERS et al., 2000; ROBINSON, 1955). O vírus também foi isolado entre os anos 1960 a 1980 na África Central, Ocidental e do Sul e Zimbábue. Nos anos seguintes, vários casos foram relatados em diversos países da África (MCINTOSH et al., 1964; POWERS et al., 2000; THONNON et al., 1999), Ásia (HALSTEAD et al., 1969; HAMMON; SATHER, 1964) e Índia (JADHAV et al., 1965; PADBIDRI; GNANESWAR, 1979; RODRIGUES et al., 1972; SHAH; GIBBS; BANERJEE, 1964; THIRUVENGADAM; KALYANASUNDARAM; RAJGOPAL, 1965) (Figura 2).

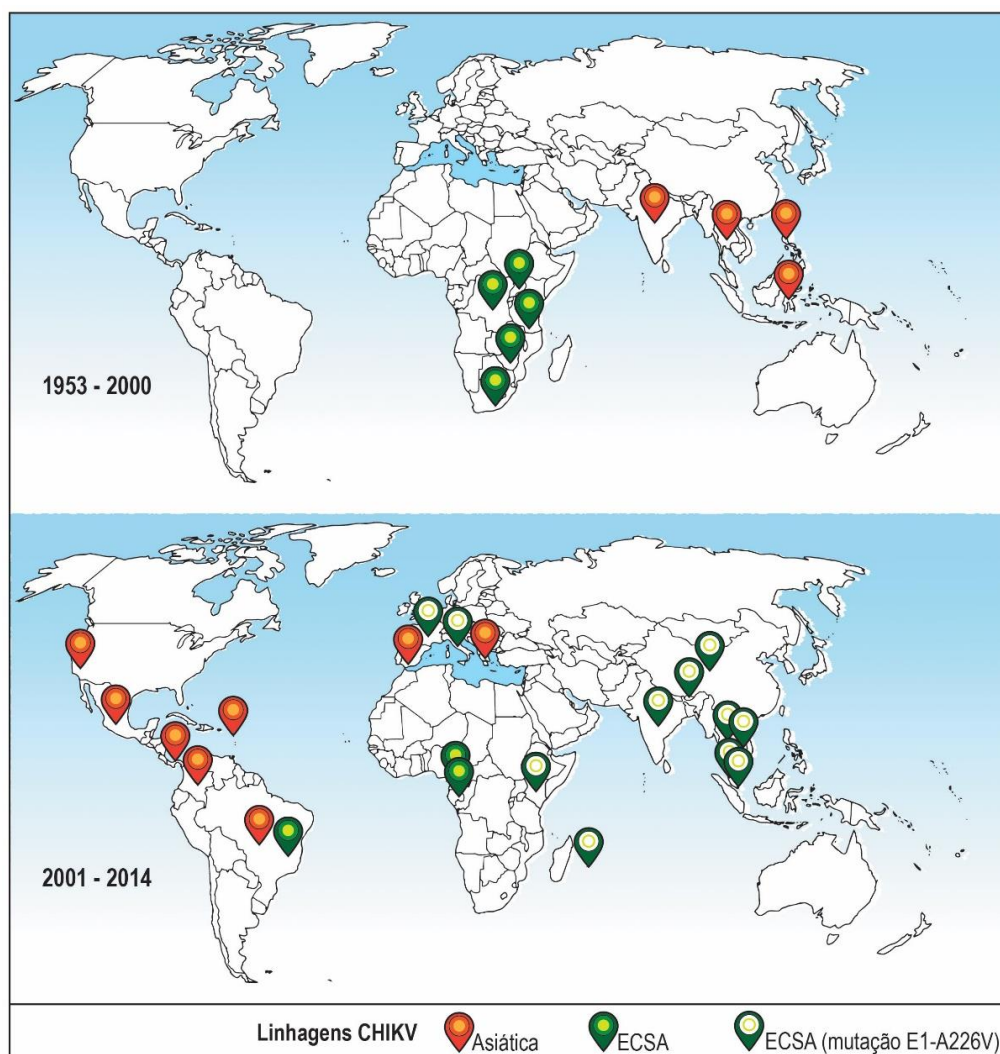
No início do século XXI, novos surtos da linhagem ECSA foram descritos em diversas regiões da África como Camarões, Gabão, Quênia e Ilhas Reunião (CHRETIEN et al., 2007; PEYREFITTE et al., 2008; PEYREFITTE et al., 2007; SCHUFFENECKER et al., 2006). Além disso, cepas da linhagem ECSA sofreram mutações na glicoproteína do envelope *E1* (*E1-A226V*), o que aumentou a capacidade do vírus para infectar o vetor *Aedes albopictus* (SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007). Conseqüentemente, vários surtos por CHIKV foram descritos na Índia, Tailândia, Malásia, Cingapura, China, Camboja, Butão, França e Itália (DUONG et al., 2012; GOULD et al., 2010; LEO et al., 2009; MAVALANKAR; SHASTRI; RAMAN, 2007; REZZA et al., 2007; RIANTHAVORN et al., 2010; WANGCHUK et al., 2013; WU et al., 2012). A linhagem asiática do CHIKV também teve dispersão em outros continentes conforme mostrado na figura 2.

No ano de 2013 foi confirmado pela primeira vez a transmissão de CHIKV mosquito-humano nas Américas, na ilha caribenha de São Martinho pela linhagem asiática. No ano seguinte, o México e o Panamá tiveram os primeiros relatos de CHIKV do genótipo asiático que mostra a propagação do vírus através do continente americano (STRAUSS; STRAUSS, 1994; VOSS et al., 2010; WAHID et al., 2017). Além disso, substituições de aminoácidos E2-V368A e 6K-L20M do vírus foram

detectadas em países como Colômbia e Brasil (NUNES et al., 2015; RODAS et al., 2016).

Em resumo, conforme mostrado na Figura 2, diversas epidemias do CHIKV foram reportadas ao redor do mundo nos últimos anos, sendo ocasionadas pelos genótipos Asiático ou ECSA.

**Figura 2 – Distribuição mundial das diferentes cepas do vírus CHIKV desde os surtos de 1953 – 2014**



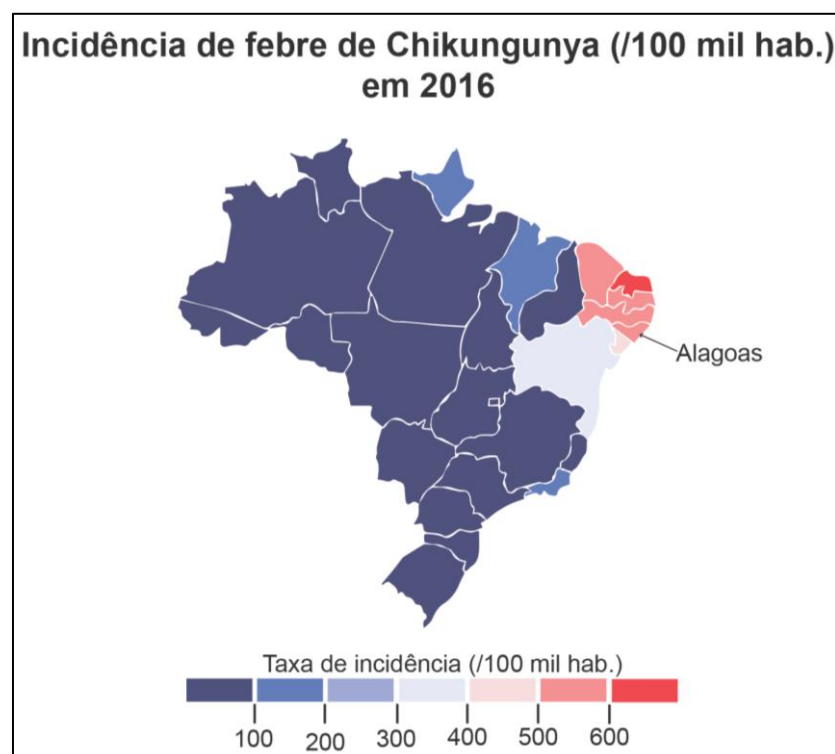
Legenda: A escala de tempo foi dividida por século. Parte superior: surtos por CHIKV relatados no século XX (1953-2000) e parte inferior: surtos por CHIKV relatados no século XXI (2001-2014). Os países com os casos confirmados são indicados com o respectivo ícone do genótipo do CHIKV. Ícone laranja: genótipo asiático, ícone verde: genótipo ECSA, e ícone verde com círculo branco: cepa ECSA com uma mutação A226V na glicoproteína do envelope E1.

Fonte: Autor (2017)

### 2.2.1 Histórico no Brasil

No Brasil em 2014, no Estado do Amapá, foi confirmado pela primeira vez a transmissão autóctone do CHIKV (PAHO, 2014). Ainda em 2014, foi reportado o primeiro surto pelo genótipo ECSA nas Américas, na cidade de Feira de Santana/BA (LEPARC-GOFFART et al., 2014; MAVALANKAR et al., 2007; RODRIGUES FARIA et al., 2016). Nos dois anos seguintes, o número de casos relatados pelo CHIKV no Brasil aumentou sete vezes, atingindo 272 mil casos prováveis em 2016, sendo 196 mortes associadas a esta infecção. A região nordeste teve o maior número de casos relatados, com mais de 86% das notificações totais e uma taxa de incidência de 415,7 casos/100.000 habitantes (55,7% de casos positivos), sendo Alagoas um dos cinco Estados que apresentaram a taxa de incidência acima da média da região, com 514,8 casos/100.000 habitantes (Figura 3) (BRASIL, 2017).

**Figura 3 – Taxa de incidência de casos suspeitos de febre de Chikungunya no Brasil, por Estado, no ano de 2016**



Legenda: Escala colorimétrica partindo do azul escuro até o magenta escuro, ilustrando o intervalo de taxa de incidência abaixo de 100 casos/100.000 hab. e superior a 600 casos/100.000 habitantes, nesta ordem, respectivamente.

Fonte: Autor (2017) – Adaptado de (BRASIL, 2017).

### **2.3 Imunopatologia da infecção por CHIKV**

A CHIKV compreende três fases distintas compreendendo uma fase aguda, uma fase subaguda e uma fase crônica. A fase aguda geralmente é sintomática em aproximadamente 70% dos pacientes, cujos sintomas estão presentes por até 10 dias (BRASIL., 2015; THIBERVILLE et al., 2013). Após este período, há uma fase subaguda caracterizada principalmente por dor nas articulações que pode permanecer por até 3 meses seguido de uma fase crônica onde a artralgia pode permanecer por até alguns meses ou anos (BRASIL., 2015).

Geralmente, os sintomas clínicos agudos são febre alta, dores nas articulações, erupção cutânea, dor de cabeça, dor nas costas e linfadenite (CHIRATHAWORN et al., 2013; CHUA, H. H. et al., 2010; TANAY, 2016). Além disso, na fase aguda da doença tem-se observado uma alta carga viral, linfopenia e trombocitopenia moderada (THIBERVILLE et al., 2013). Na maioria dos casos, esses sintomas geralmente permanecem por cerca de 5 a 7 dias como uma doença auto-limitante seguida por uma recuperação completa do paciente (CHUA, H. H. et al., 2010; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). No entanto, a dor nas articulações pode permanecer durante meses ou até mesmo por anos, visto que casos clínicos sintomáticos da forma crônica da doença foram relatados por até 3 a 5 anos em alguns pacientes (PIALOUX et al., 2007; TANAY, 2016). Além disso, sintomas adicionais têm sido observados como lesões bolhosas nos pés, lesões esfoliativas e prurido nas extremidades (região palmar e plantar), hiperpigmentação da pele e distúrbios comportamentais (BRASIL., 2015; SHIFERAW et al., 2015). É importante ressaltar que os sintomas observados podem estar relacionados a uma resposta imunológica exacerbada e, até agora, não existe nenhum tratamento específico assim como uma vacina disponível para esta doença (HORCADA; DIAZ-CALDERON; GARRIDO, 2015).

O desenvolvimento da fase crônica desta arbovirose tem sido frequentemente observado em pacientes idosos (HOARAU et al., 2010). Além disso, na população infantil, os recém-nascidos são mais propensos a desenvolver uma forma mais grave da doença (THIBERVILLE et al., 2013).

Nos últimos anos, alguns casos graves de CHIKV foram relatados. Um caso grave de doença de CHIKV foi relatado em um homem de 66 anos que morreu após 5 dias de doença com complicações hepáticas e colapso circulatório (CHUA, H. H. et

al., 2010). Na Colômbia, foram reportados três casos graves que levaram à óbito indivíduos acima de 70 anos de idade apresentando complicações neurológicas e pulmonares (HOZ et al., 2015). Além disso, casos atípicos devido a infecção aguda por CHIKV foram relatados desde a epidemia das Ilhas Reunião em 2006, onde foram observadas complicações neurológicas, nefrite, hepatite, pneumonia, miocardite, pericardite e pancreatite em pacientes idosos (HOZ et al., 2015).

### *2.3.2 Resposta imunológica inata*

Nas infecções virais, o sistema imune inato do hospedeiro pode conter a invasão, disseminação ou replicação viral. Na resposta imune inata antiviral, os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos por células da imunidade inata detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) na estrutura viral. Os PRRs são ativados por componentes virais, tais como RNA/DNA viral ou produtos intermediários produzidos no ciclo de replicação viral que resultam na indução de interferons do tipo I e/ou citocinas pró-inflamatórias nas células hospedeiras (KOYAMA et al., 2008).

#### *2.3.2.1 Células Natural Killer (NK)*

As células NK são células efectoras citotóxicas da imunidade inata que desempenham um papel crucial na resposta imune contra células infectadas por vírus, visto que essas células expressam uma variedade de receptores ativadores e inibitórios em sua membrana celular (PEGRAM et al., 2011). Em um estudo foi mostrado que a co-expressão de receptores de ativação NKG2C e ligantes HLA-C1 em células NK está associada à carga viral, à diminuição da produção de IFN- $\gamma$  e de funções citolíticas (PETITDEMANGE et al., 2011). Portanto, a infecção por CHIKV induz modificações transitórias no fenótipo e função das células NK desde o início da infecção viral, contribuindo assim para a eliminação das células infectadas. A atividade das células NK também foi detectada 2 a 3 dias após a infecção em camundongos infectados pelo CHIKV sugerindo um papel patogênico para as células NK durante a fase aguda precoce da infecção (TEO et al., 2015).



### 2.3.2.2 Monócitos, Macrófagos e Células Dendríticas (DCs)

Os macrófagos compreendem uma linhagem de células mononucleares da imunidade inata diferenciada a partir de monócitos sanguíneos e que podem residir em vários tecidos. Essas células são cruciais na vigilância imune, na regulação da resposta inflamatória e na fagocitose de microorganismos estando envolvidas em diversas infecções virais (SANG; MILLER; BLECHA, 2015).

Em ratos, a infecção por CHIKV foi detectada em uma porcentagem de macrófagos sendo observado um aumento na expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e GM-CSF nestas células. Além disso, a resposta imune inata não foi associada a um aumento de IFN do tipo I e não foram encontrados sinais de apoptose nessas células (KUMAR et al., 2012). Em humanos, os antígenos do CHIKV foram detectados nos monócitos de pacientes infectados no período da fase aguda (HER et al., 2010).

Em outro estudo, foi mostrado que sinoviócitos humanos foram permissivos a infecção pelos isolados clínicos do CHIKV sendo as quimiocinas/citocinas RANKL, IL-6, IL-8 e MCP-1 secretadas por essas células infectadas responsáveis pelo recrutamento e diferenciação de fagócitos (PHUKLIA et al., 2013). De forma interessante, os sobrenadantes de sinoviócitos infectados com CHIKV induziram a migração de monócitos e diferenciação de monócitos/macrófagos em células semelhantes a osteoclastos que produziram altos níveis de mediadores presentes na artrite, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6 (PHUKLIA et al., 2013).

## 2.4 Citocinas e quimiocinas como marcadores imunológicos da infecção aguda e crônica pelo CHIKV

Citocinas e quimiocinas são proteínas secretadas por células da resposta imune que estão envolvidas em vários processos biológicos, como diferenciação, proliferação e ativação celular. Essas proteínas têm uma atividade pró ou anti-inflamatória e atuam na regulação e controle da resposta imune inata e adaptativa (BORISH; STEINKE, 2003).

Nos últimos anos, diversos estudos avaliaram o perfil de analitos solúveis presentes no sangue de pacientes infectados pelo CHIKV em diferentes fases da doença na busca por marcadores imunológicos associados a morbidade, prognóstico e cronicidade (ANEXO I). Deste modo, diversas citocinas e quimiocinas

foram quantificadas em pacientes na fase aguda da infecção pelo CHIKV sendo detectados altos níveis de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CXCL10 / IP-10 e IL-1 $\beta$  no sangue destes pacientes (VENUGOPALAN; GHORPADE; CHOPRA, 2014) . Além disso, foram detectados na fase sintomática, níveis elevados de TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-4, IL-6 e IL-10, os quais persistiram elevados após a fase de recuperação (VENUGOPALAN et al., 2014). Em outro estudo, foi mostrado que IL-1 $\beta$ , IL-6 e RANTES têm sido sugeridos como marcadores de severidade da doença (NG et al., 2009). Os níveis elevados de IL-6, IL-8, IP-10, MIG, MCP-1 e RANTES tiveram uma correlação positiva com a carga viral durante a infecção do CHIKV (NG et al., 2009; REDDY et al., 2014; THIBERVILLE et al., 2013).

Os níveis de 13 citocinas/quimiocinas foram avaliados durante a fase aguda e aos 6 e 12 meses após a infecção pelo CHIKV. Durante a fase aguda, os níveis de MIG, MCP-1, IL-6 e IP-10 mostraram-se elevados enquanto IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-5 inicialmente apresentaram níveis mais baixos que posteriormente aumentaram significativamente nos outros períodos da doença analisados. Além disso, os níveis elevados de MIG, IP-10 e IgG mostraram uma associação com a maior gravidade dos sintomas (KELVIN et al., 2011).

Em outro estudo, na fase aguda da infecção, foram detectados níveis elevados de IL-6, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 e TNF- $\alpha$  em amostras de soro coletadas de pacientes infectados (CHIRATHAWORN et al., 2013). Recentemente, várias citocinas e quimiocinas foram quantificadas em amostras de plasma de pacientes infectados com CHIKV e, em seguida, foram correlacionadas positivamente tanto com a carga viral quanto com anticorpos IgM anti-CHIKV. (REDDY et al., 2014) Os níveis plasmáticos elevados de IL-6 e MCP-1 foram identificados como marcadores associados com elevada carga viral e MCP-1 e MIG foram detectados ainda durante a fase crônica da doença (REDDY et al., 2014).

Em um estudo realizado na Tailândia foi mostrado que nos primeiros dias da infecção, os pacientes infectados com CHIKV apresentaram concentrações circulantes de IL-6 e MCP-1 maiores do que os pacientes não infectados (negativos para os testes de IgM, isolamento viral e detecção do genoma viral) (LOHACHANAKUL et al., 2012). Além disso, pacientes com CHIKF grave apresentaram níveis mais elevados de IL-6 do que pacientes não-graves de CHIKF. Os pacientes graves de CHIKF apresentaram ainda menores concentrações de IL-8

circulante do que os outros grupos, sugerindo que altas concentrações de IL-6 e MCP-1 associadas a baixas concentrações de IL-8 possam estar associados à forma severa de CHIKF (LOHACHANAKUL et al., 2012).

Além disso, um estudo caso-controle foi realizado em 30 pacientes adultos com diagnóstico laboratorial confirmado para CHIKV mostrou que pacientes com alta viremia na fase aguda apresentaram um número reduzido de monócitos e altos níveis de IFN- $\alpha$  e IL-6 (CHOW et al., 2011). Na fase crônica, detectou-se um aumento de IL-17 sendo a artralgia persistente associada a níveis elevados de IL-6 e GM-CSF e a recuperação da doença relacionada a altos níveis de eotaxina e HGF (CHOW et al., 2011).

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Geral**

Realizar a identificação dos genótipos circulantes e a prospecção de marcadores imunológicos associados a fase aguda da infecção pelo CHIKV em pacientes atendidos no Sistema Único de Saúde (SUS) no Estado de Alagoas.

#### **3.2 Específicos**

- Detectar a presença de anticorpos IgM e IgG contra o vírus CHIKV no soro de pacientes com até 5 dias do início dos sintomas e no grupo controle de pacientes saudáveis (controle negativo);
- Padronizar a reação de RT-PCR para detecção da região parcial correspondente ao gene codificante para proteína *E1*;
- Detectar o genoma viral em amostras de pacientes até 5 dias após o início dos sintomas por RT-PCR;
- Realizar o sequenciamento e análise filogenética de uma região do genoma viral correspondente ao gene da proteína *E1* do CHIKV de amostras provenientes de diferentes municípios do Estado de Alagoas;
- Fazer a prospecção de marcadores imunológicos na fase aguda de viremia por meio da quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias, assim como, quimiocinas no soro de pacientes infectados até 5 dias pós-início dos sintomas comparando a amostras de pacientes saudáveis.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob protocolo C.A.A.E. nº 59229716.9.0000.5013.

### **4.1 Pacientes e amostras**

Amostras de sangue total periférico de pacientes com suspeita de infecção por CHIKV de janeiro a outubro de 2016 foram coletadas em diversas unidades de saúde do Estado de Alagoas e enviadas ao Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN/AL) para detecção molecular do genoma viral. Neste estudo, foram utilizadas 38 amostras positivas de pacientes na fase aguda virêmica da infecção com até 5 dias pós início dos sintomas.

Adicionalmente, como controle negativo, amostras de soro de 26 doadores de sangue saudáveis, voluntários, foram coletadas no Hemocentro de Alagoas/AL. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Neste estudo foram utilizadas como controle negativo somente as amostras de pacientes que não apresentavam nenhuma sintomatologia clínica condizente com a infecção por CHIKV e que não apresentaram níveis detectáveis de anticorpos IgM anti-CHIKV.

### **4.2 Detecção molecular**

Para detecção do genoma viral do CHIKV foi realizada a técnica de transcrição reversa e PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) utilizando o kit *Superscript III Platinum One-Step qRT-PCR System* (Invitrogen).

Esta etapa foi integralmente realizada pelos técnicos do LACEN/AL, que testaram todas as amostras em duplicata juntamente com dois controles negativos (um com água livre de nucleases e outro com RNA extraído a partir de uma amostra negativa) e um controle positivo com RNA extraído a partir de uma amostra infectada com o CHIKV. As amostras foram consideradas detectável quando o valor de Ct foi menor ou igual a 38 em ambas as duplicatas.

Todo o protocolo utilizado está descrito no Procedimento Operacional Padrão (POP) do Instituto Evandro Chagas nº ID POP SAARB 6.6 – 002.

#### 4.2.1 Iniciadores

Para a detecção do genoma viral de CHIKV foram utilizados os iniciadores VCHIK NSP4 6856F e VCHIK NSP4 6981R (Tabela 2) e a sonda VCHIK 6919 (5' - **FAM**-AGG TAC GCG /**ZEN**/ CTT CAA GTT CGG CG – **IwBFQ** – 3') que anelam na região do gene da proteína não-estrutural NSP4.

**Tabela 2 – Iniciadores de CHIKV para o gene alvo NSP4**

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Posição genômica
<b>VCHIK NSP4 6856F</b>	TCA CTC CCT GTT GGA CTT GAT AGA	6856–6879
<b>VCHIK NSP4 6981R</b>	TTG ACG AAC AGA GTT AGG AAC ATA CC	6981–6956

#### 4.3 Detecção de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV

A detecção dos anticorpos foi realizada pela metodologia de enzimaímunensaio (EIA) utilizando-se os kits comerciais para ELISA IgM e IgG anti-CHIKV (EI 293a-9601 G/M - EuroImmun, Lubeck, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, as amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:101 em tampão de amostra, o qual para a detecção de IgM, é acrescido de absorvente IgG/RF responsável pela precipitação de anticorpos da classe IgG após incubação por 10 min.

Em seguida, os calibradores e controles do kit, juntamente com amostras diluídas foram dispensados em poços individuais da microplaca, estes revestidos com antígenos de CHIKV recombinante, utilizando o volume de 100µl e incubados por 60 minutos à 37°C.

Com o término da incubação o volume dos poços foi desprezado e realizou-se o procedimento de lavagem (300µl de tampão de lavagem por poço, por 3 vezes). Após certificação da remoção total do tampão de lavagem, foram pipetados 100µl do

conjugado enzimático em cada poço e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Com o término da incubação o volume dos poços foi desprezado e realizou-se o procedimento de lavagem como descrito anteriormente. A seguir, 100µl da solução substrato/cromógeno (Descrever o que é) foi adicionada em cada poço e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente com proteção da luz. Por fim, em cada poço foram adicionados 100µl de solução de parada.

A mensuração fotométrica da intensidade de cor foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm e valor de referência entre 620 nm e 650 nm até 30 minutos após a adição da solução de parada. A obtenção do resultado semiquantitativo foi avaliado através do cálculo do valor de extinção do controle ou da amostra do paciente pelo valor de extinção do calibrador 2 de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Extinção do controle ou amostra do paciente}}{\text{Extinção do calibrador 2}} = \text{Razão}$$

Os resultados foram interpretados de acordo com a seguinte razão: Razão < 0,8 = **negativo**; Razão ≥ 0,8 a < 1,1 = **Borderline**; Razão ≥ 1,1 = **positivo**.

#### 4.4 Sequenciamento e análise filogenética

##### 4.4.1 Extração e Amplificação

Foram selecionadas para sequenciamento as amostras de pacientes que apresentaram até 6 dias pós-início dos sintomas e/ou que o “*ct*” (*Cycle threshold* - número de ciclos necessários para detectar um sinal real nas amostras) fossem menores do que 25. Após a seleção de amostras positivas provenientes de diferentes municípios de Alagoas (n=11), foi realizada a extração de RNA viral a partir do soro dos pacientes utilizando-se o kit *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. O produto da extração foi submetido à reação de transcriptase reversa por meio do kit comercial *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega) e utilizando o iniciador para a região do gene da proteína *E1* (CHIK/E1-C GCCTTTGTACACCACGATT).

O DNA complementar obtido (cDNA) foi submetido à reação de PCR utilizando os *primers* CHIK/E1-S (TACCCATTCATGTGGGGC) e CHIK/E1-C

(GCCTTTGTACACCACGATT), utilizando-se a enzima Pfu DNA Polimerase (Promega) de alta fidelidade, seguindo instruções do fabricante, e temperatura de anelamento dos iniciadores a 54° C. A confirmação da obtenção da amplificação da região de interesse (amplicon) foi realizada submetendo o produto da reação a uma migração eletroforética em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídeo para visualização de uma banda correspondente a 294 pares de bases em comparação ao padrão de tamanho molecular.

#### 4.4.2 Purificação e sequenciamento

O produto da reação de PCR foi purificado utilizando-se o kit comercial High Pure PCR CleanUp (Roche), seguindo informações do fabricante e sendo submetido depois à reação de sequenciamento com os reagentes do kit *BigDye* (Applied Biosystems), utilizando-se os iniciadores específicos da reação de PCR para *E1* no equipamento *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) pela empresa Ludwig Biotec.

#### 4.4.3 Genotipagem e análise filogenética

A partir do resultado da reação de sequenciamento foi realizada a análise filogenética utilizando-se a região parcial do gene codificante para a proteína *E1* do envelope viral. Foram utilizadas sequências adicionais disponíveis no banco de dados *GenBank*, a fim de correlacionar com as amostras do presente estudo. Tais sequências disponíveis no *GenBank* utilizadas para a construção da árvore foram selecionadas de acordo com os valores de *query cover*, *e-value* e *ident* gerados após o blast-n das amostras. A análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos utilizando-se o método UPGMA com o teste *bootstrap* de 500 replicatas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando-se o método Kimura 2-parâmetros no software MEGA7. Para a identificação das cepas foram utilizadas as seguintes informações: número de acesso no *GenBank*/Sigla do país/Ano.



#### **4.5 Quantificação de analitos solúveis em amostras de soro por CBA (cytometric bead array)**

A quantificação de citocinas e quimiocinas nas amostras de soro foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se a metodologia de CBA - *Cytometric Bead Array* (BD Bioscience, San Jose, CA) conforme as recomendações do fabricante. Neste estudo, foram quantificadas as citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e as quimiocinas IL-8, MIG, MCP-1, RANTES e IP-10. Dentre as citocinas, IL-6, IL-10, IL-12p70 e IFN- $\gamma$  foram quantificadas pelo método de CBA de sensibilidade aumentada ("*CBA Enhanced Sensitivity*").

Em resumo, para cada amostra, 25  $\mu$ L de soro diluído previamente (1:2) foi incubado com uma mistura das microesferas revestidas com anticorpos específicos para a captura de cada analito. A depender de cada kit, ocorreu a incubação conjunta ou posterior com o anticorpo de detecção conjugado com ficoeritrina (*PE detection reagent*), formando um complexo antígeno-anticorpo do tipo sanduíche. Após a incubação em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as amostras foram lavadas e fixadas utilizando formalina a 4%, lavadas novamente, e suspendidas em 150  $\mu$ L de tampão de lavagem (*wash buffer*) para aquisição no citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD Bioscience, San Jose, CA). Os resultados foram analisados no software FCAP Array 3.0 (Soft Flow, Hungria) utilizando uma análise logística de 5 parâmetros ("*5-parameter logistic*"). Os níveis dos analitos foram expressos em picograma por mililitro (pg/mL) ou fentograma por mililitro (fg/mL).

#### **4.6 Análise estatística**

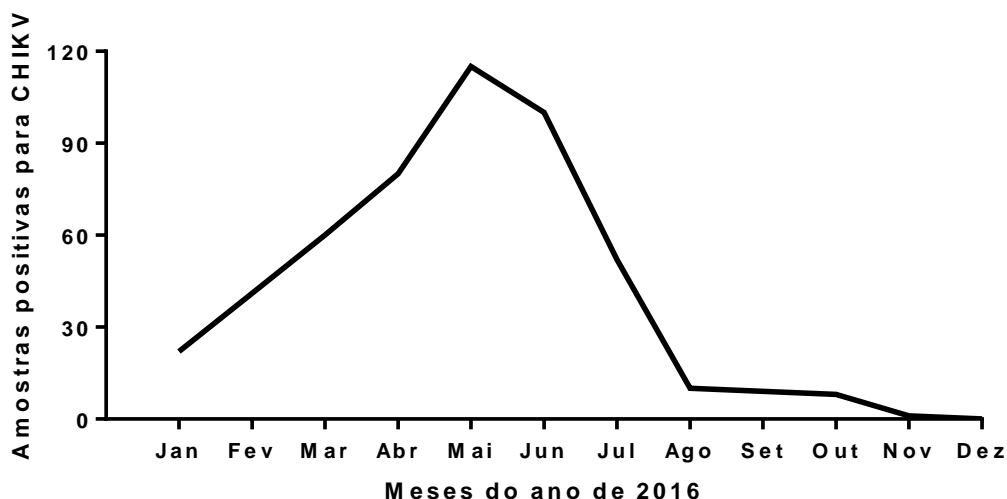
A análise estatística da comparação entre os níveis séricos de citocinas e quimiocinas nos dois grupos de pacientes, infectados por CHIKV em fase aguda e grupo de doadores saudáveis (CHIKV versus não-CHIKV), foi realizada utilizando o teste U não paramétrico de Mann-Whitney no software GraphPad Prism 6. Foram considerados valores significativamente diferentes onde o valor de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Amostras de pacientes positivas para o CHIKV

Este estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN/AL). No ano de 2016, foram detectadas 498 amostras positivas para CHIKV por meio da metodologia de RT-qPCR no LACEN/AL provenientes de diferentes regiões do Estado de Alagoas, durante os meses de janeiro a dezembro de 2016 (Figura 4).

**Figura 4 - Número de amostras positivas para CHIKV detectadas por RT-qPCR pelo LACEN/AL em 2016**



Legenda: O gráfico ilustra a distribuição temporal das confirmações de infecção por CHIKV através de RT-qPCR em indivíduos residentes no Estado de Alagoas. O maior número de amostras positivas está concentrado entre os meses de fevereiro a agosto.

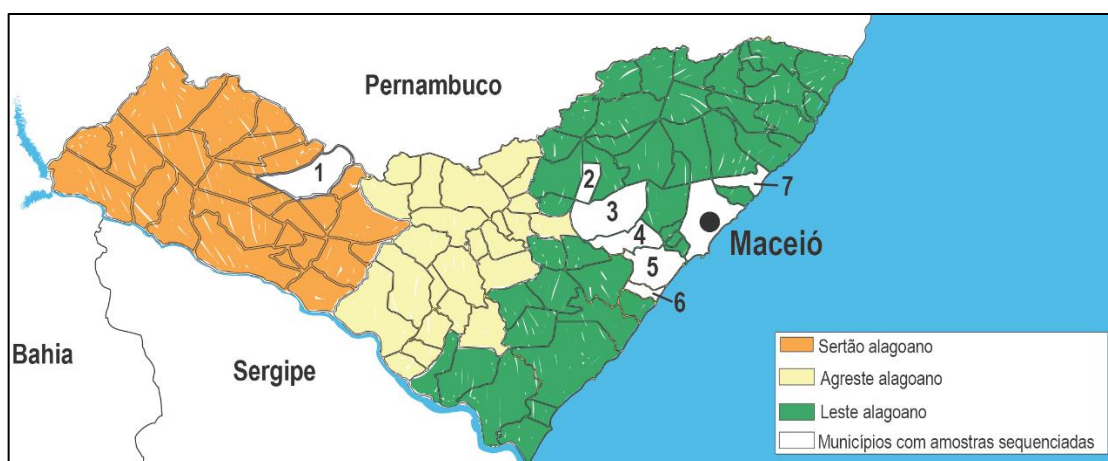
Dentre essas amostras, foram selecionadas 11 amostras (Tabela 3), oriundas de sete municípios (Figura 5) para amplificação parcial do gene codificante para proteína *E1* e em seguida, o amplicon gerado foi submetido à reação de sequenciamento para identificação do genótipo do CHIKV circulante no Estado de Alagoas.

**Tabela 3 – Informações das amostras selecionadas para o sequenciamento e genotipagem do vírus CHIKV no estado de Alagoas (n=11).**

IR-Imunoreg	Idade (anos)	Gênero	Cidade - AL	Dias pós-início dos sintomas	Anti-CHIKV	
					IgM	IgG
IR20	31	Feminino	Atalaia	2	(-)	(-)
IR33	30	Feminino	Maceió	2	(-)	(-)
IR65	33	Feminino	Barra de Santo Antônio	ND	(-)	(-)
IR84	89	Masculino	Cajueiro	ND	(-)	(-)
IR95	61	Masculino	Marechal Deodoro	2	(-)	(-)
IR104	23	Feminino	Maceió	5	(-)	(-)
IR133	30	Feminino	Maceió	3	(-)	(-)
IR156	73	Masculino	Barra de São Miguel	ND	(-)	(-)
IR169	31	Feminino	Marechal Deodoro	2	(-)	(-)
IR172	17	Masculino	Pilar	2	(-)	(-)
IR183	51	Feminino	Santana do Ipanema	4	(-)	(-)

Legenda: ND - dados não disponíveis; (-) negativo; (+) positivo.

**Figura 5 – Distribuição das amostras selecionadas para o sequenciamento e genotipagem do vírus CHIKV no Estado de Alagoas (n=11).**

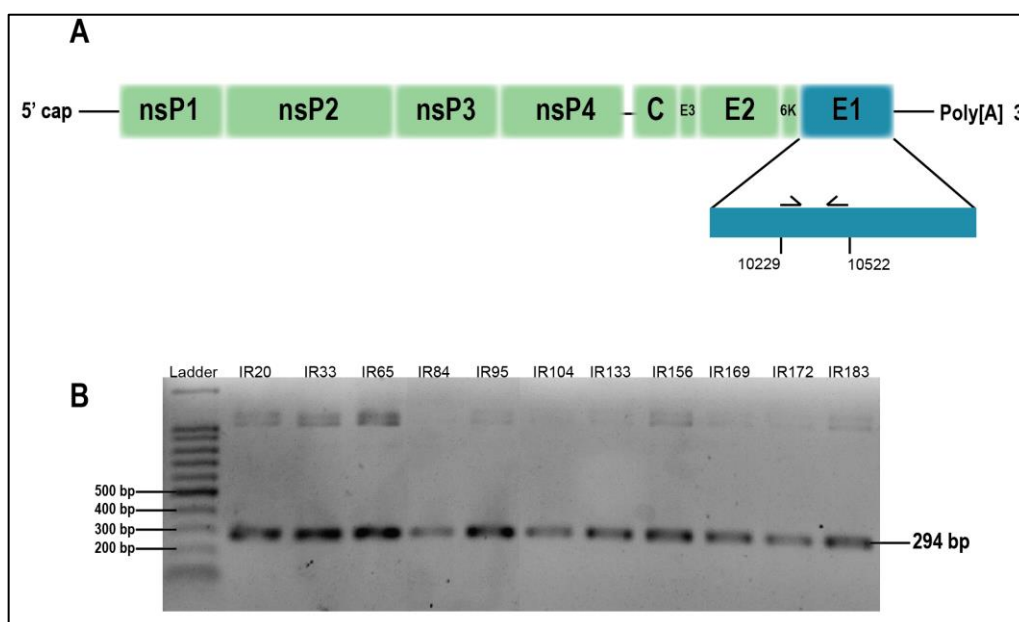


Legenda: O Estado de Alagoas está situado na região nordeste do Brasil fazendo fronteira com estados de Pernambuco, Sergipe e Bahia. Este é dividido em três mesorregiões: Sertão alagoano (em laranja), Agreste alagoano (em amarelo claro) e Leste alagoano (em verde). A capital do Estado, Maceió, está situada no leste alagoano e concentra em sua região metropolitana aproximadamente um terço da população do estado. Os municípios com amostras sequenciadas estão indicados na cor branco. Nome dos municípios: 1 – Santana do Ipanema; 2 – Cajueiro; 3 – Atalaia; 4 – Pilar; 5 – Marechal Deodoro; 6 – Barra de São Miguel; 7 – Barra de Santo Antônio.

## 5.2 Amplificação da região parcial do gene correspondente a proteína E1

A amplificação da região parcial do gene *E1* do CHIKV foi realizada por meio reação de RT-PCR (Figura 6A). Ao final desta reação, foi obtido um produto amplificado de aproximadamente 294 pares de base para cada uma das 11 amostras positivas para CHIKV, que em seguida, foram purificados e submetidos a nova corrida eletroforética, como indicado na Figura 6B. Após esta etapa, estes foram submetidos ao sequenciamento.

**Figura 6 – Amplificação da região parcial do gene correspondente a proteína E1 do CHIKV por RT-PCR**



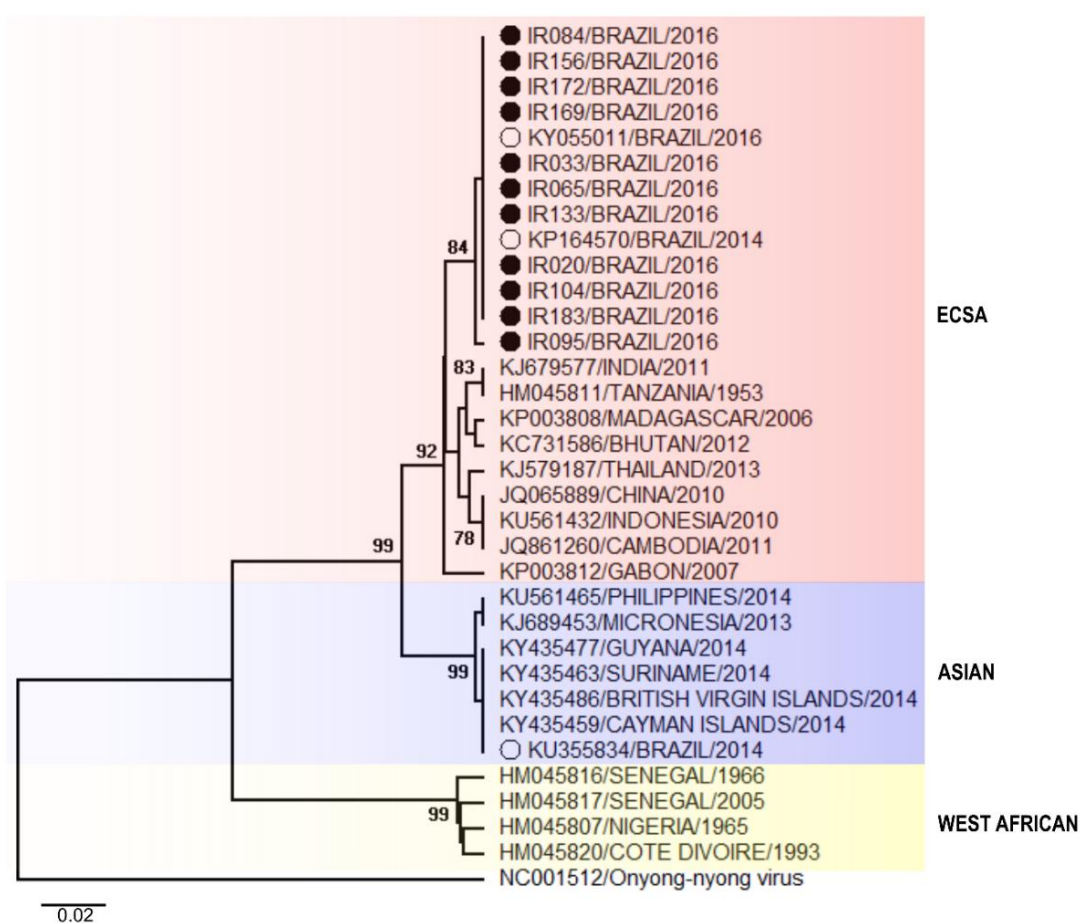
Legenda: A) Representação esquemática do genoma de RNA do CHIKV destacando-se a região amplificada correspondente a 294 pb do gene da proteína *E1* utilizando-se os primers *forward* e *reverse*. B) Análise do produto amplificado após a purificação. As amostras obtidas foram submetidas a corrida eletroforética em gel de agarose a 1,8%.

## 5.3 Genotipagem e análise filogenética do CHIKV em amostras de Alagoas

As amostras purificadas obtidas após a reação de RT-PCR foram submetidas a reação de sequenciamento para determinação do genótipo do vírus CHIKV. As seqüências de nucleotídeos obtidas a partir das amostras sequenciadas neste estudo, provenientes de diversos municípios de Alagoas durante o surto desta

arbovirose no ano de 2016, foram comparadas às sequências nucleotídicas dos genótipos *Asian*, *West African* e *ECSA* do CHIKV disponíveis na base de dados do *NCBI GenBank*. Notavelmente, após a análise *in silico*, todas as sequências obtidas neste estudo foram agrupadas no ramo do genótipo *ECSA*, juntamente com as duas amostras identificadas na Bahia em 2014 e Sergipe em 2016 (Figura 7).

**Figura 7 – Análise filogenética de genótipos do CHIKV circulantes em Alagoas no surto de 2016 com base na análise da sequência parcial de nucleotídeos do gene correspondente a proteína *E1***

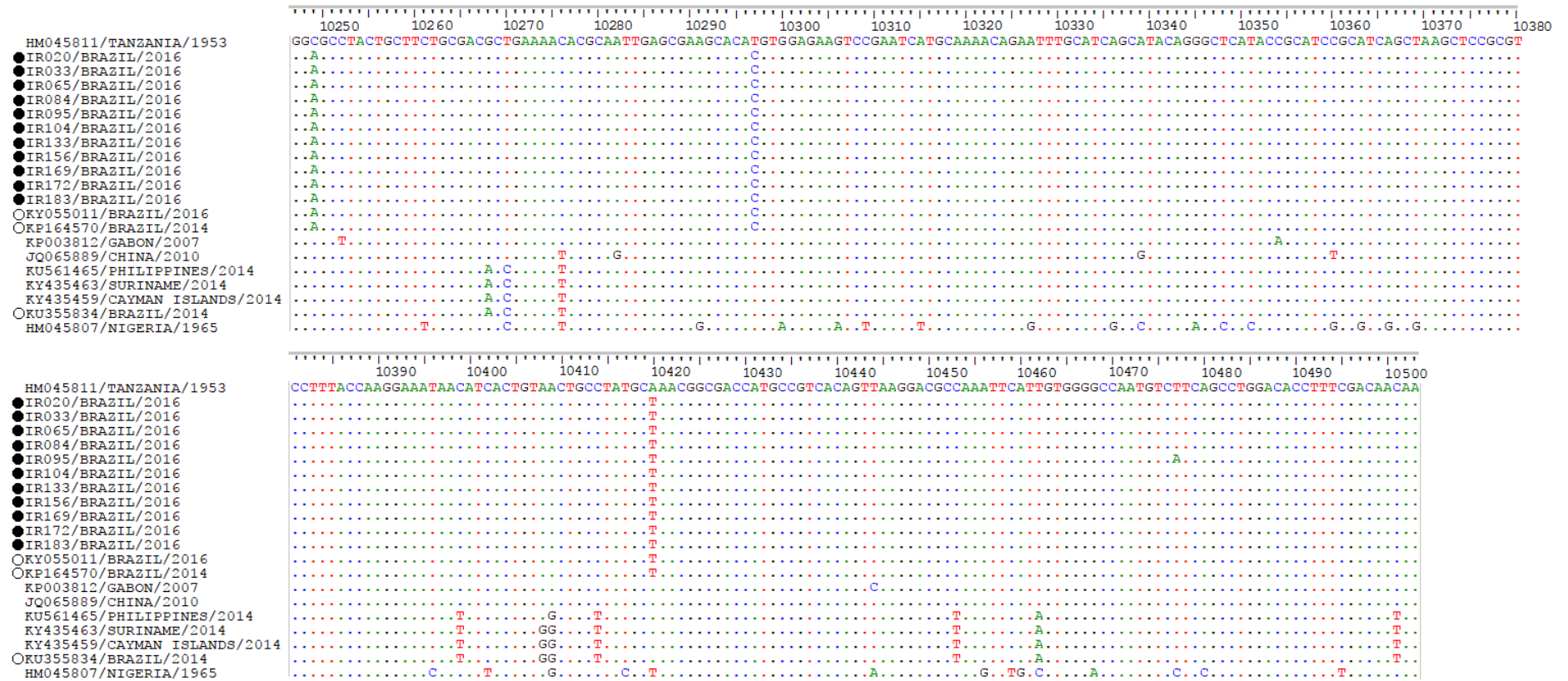


Legenda: As sequências correspondentes as amostras de Alagoas analisadas neste estudo estão representadas por círculos preenchidos de preto. As sequências de nucleotídeos correspondentes a outras amostras descritas em estudos anteriores no Brasil estão representadas por círculos sem preenchimento. A árvore foi gerada utilizando o método UPGMA com o teste *bootstrap* de 500 replicatas. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando-se o método Kimura 2-parâmetros no software MEGA7. As cepas de CHIKV usadas na análise foram nomeadas com o número de acesso/país/ano de acordo com as informações disponíveis no *GenBank*. O vírus O'nyong nyong foi usado como sequência de nucleotídeos não-relacionada ("outgroup").

Para avaliar a identidade entre as amostras obtidas em diferentes locais do Estado de Alagoas realizou-se um alinhamento de nucleotídeos comparando-as com primeira cepa do CHIKV isolada na Tanzânia em 1953 e outras cepas do genótipo ECSA do CHIKV provenientes de diferentes países em todo o mundo depositadas no *GenBank* nos últimos anos (Figura 8).

Conforme mostrado na Figura 8, com exceção da amostra IR095 proveniente do município de Marechal Deodoro que apresentaram uma mutação na posição 10477, trocando o nucleotídeo T para A, todas as outras dez amostras do CHIKV analisadas neste estudo apresentaram-se idênticas nesta região de nucleotídeos umas com as outras. Interessantemente, diversas substituições de nucleotídeos foram detectadas em todas as amostras em comparação com a cepa da Tanzânia (10249C>A, 10297T>C e 10420A>T). Assim, para avaliação de possíveis mutações nas sequências de aminoácidos foi realizada a tradução *in silico* e posterior alinhamento entre as amostras das sequências de aminoácidos obtidas. No entanto, o alinhamento das sequências de aminoácidos entre as sequências provenientes de Alagoas em comparação com a cepa da Tanzânia não mostrou nenhuma substituição de aminoácidos nas amostras obtidas, considerando a região da proteína *E1* analisada (dados não mostrados).

**Figura 8 – Alinhamento de seqüências de nucleotídeos de amostras provenientes de Alagoas (n=11) em comparação com cepas do genótipo ECSA do CHIKV provenientes de vários países do mundo**



Legenda: As seqüências de nucleotídeos das amostras seqüenciadas neste estudo (indicadas por círculos preenchidos de preto) foram comparadas com as de outras cepas isoladas no Brasil (indicadas por círculos sem preenchimento), juntamente com as seqüências de nucleotídeos de cepas pertencentes ao genótipo ECSA (Tanzânia, Gabão, China), ao Asiático (Filipinas, Suriname e Ilhas Cayman) e ao Ocidental Africano (Nigéria). As cepas de CHIKV usadas na análise foram nomeadas com o número de acesso/país/ano de acordo com as informações disponíveis no *GenBank*.

## 5.4 Prospecção de marcadores imunológicos no soro de pacientes na fase aguda virêmica da infecção pelo CHIKV

### 5.4.1 Aspectos epidemiológicos das amostras

Para esta análise foram utilizadas 36 amostras positivas para o CHIKV por RT-qPCR na fase aguda virêmica da infecção com até 5 dias pós-início dos sintomas, e 23 amostras de doadores saudáveis. A média de idade dos doadores saudáveis (grupo controle negativo) foi de  $30,6 \pm 9,74$  anos, enquanto do grupo de pacientes acometidos pela infecção aguda por CHIKV foi de  $43,22 \pm 19,88$  anos (Tabela 4). A média de dias após o início dos sintomas no grupo de pacientes analisado foi de  $2,97 \pm 1,40$  (Tabela 4).

**Tabela 4 – Características das amostras utilizadas no estudo (média de idade, gênero, IgM e IgG anti-CHIKV e dias pós-início dos sintomas)**

Grupo	n	Média de idade $\pm$ SD	Homens (%)	Mulheres (%)	IgM CHIKV+	IgG CHIKV+	Média (d.p.s.) $\pm$ SD
Controle negativo	23	$30,6 \pm 9,74$	73,91	26,09	0	0	-
CHIKV +	36	$43,22 \pm 19,88$	41,67	58,33	3	0	$2,97 \pm 1,40$

Legenda: d.p.s = dias pós-início dos sintomas, SD = desvio padrão.

### 5.4.2 Detecção de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV

A fim de confirmar a não infecção aguda por CHIKV no grupo controle negativo foi realizado o teste de ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV (Tabela 5) sendo utilizadas somente amostras negativas para IgM anti-CHIKV. Além disso, a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-CHIKV também foi realizada no grupo de pacientes positivos na RT-qPCR cujos resultados são mostrados na tabela 6.



**Tabela 5 – Amostras obtidas de doadores de sangue saudáveis utilizadas como controle negativo (n=23)**

<b>IR- Imunoreg</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Município</b>	<b>IgM Anti- CHIKV</b>	<b>IgG Anti- CHIKV</b>
8.1	-	Feminino	Maceió	(-)	(-)
12.1	41	Masculino	Maceió	(-)	(-)
13.1	36	Feminino	Maceió	(-)	(-)
17.1	46	Masculino	Maceió	(-)	(-)
18.1	34	Masculino	Maceió	(-)	(-)
19.1	24	Masculino	Maceió	(-)	(-)
20.1	41	Masculino	Maceió	(-)	(-)
21.1	45	Masculino	Maceió	(-)	(-)
22.1	21	Masculino	Maceió	(-)	(-)
24.1	20	Feminino	Maceió	(-)	(-)
25.1	41	Feminino	Maceió	(-)	(-)
26.1	40	Masculino	Maceió	(-)	(-)
27.1	25	Masculino	Maceió	(-)	(-)
29.1	22	Masculino	Maceió	(-)	(-)
30.1	19	Masculino	Maceió	(-)	(-)
34.1	22	Masculino	Maceió	(-)	(-)
37.1	41	Masculino	Maceió	(-)	(-)
40.1	27	Masculino	Maceió	(-)	(-)
42.1	24	Masculino	Maceió	(-)	(-)
44.1	24	Feminino	Maceió	(-)	(-)
48.1	19	Feminino	Maceió	(-)	(-)
1.1	-	Masculino	Maceió	(-)	(-)
2.1	-	Masculino	Maceió	(-)	(-)

Legenda: – dado não obtido; (-) – negativo.

**Tabela 6 – Amostras positivas para CHIKV na fase aguda virêmica com até 5 dias pós-início dos sintomas**

IR-Imunoreg	Idade	Sexo	Dias pós-sintomas	Município	IgM Anti-CHIKV	IgG Anti-CHIKV
5	71	Feminino	4	Maceió	(-)	(-)
6	78	Masculino	5	Paripueira	(+)	(-)
12	62	Masculino	5	Maceió	(+)	(-)
16	30	Feminino	5	Maceió	(-)	(-)
18	54	Feminino	3	Maceió	(-)	(-)
24	30	Feminino	1	Maceió	(-)	(-)
35	7	Feminino	3	Maceió	(-)	(-)
36	29	Feminino	3	Maceió	(-)	(-)
40	16	Feminino	3	Branquinha	(-)	(-)
44	47	Feminino	5	Maceió	(-)	(-)
62	43	Masculino	5	Maceió	(-)	(-)
108	34	Masculino	2	Maceió	(-)	(-)
164	35	Masculino	1	Marechal Deodoro	(-)	(-)
167	36	Feminino	6	Marechal Deodoro	(-)	(-)
176	39	Feminino	2	São Miguel dos Campos	(-)	(-)
179	21	Feminino	1	Igaci	(-)	(-)
2	26	Feminino	2	Maceió	(-)	(-)
3	46	Masculino	1	Maceió	(-)	(-)
10	32	Feminino	2	Maceió	(-)	(-)
19	38	Feminino	2	Maceió	(-)	(-)
20	31	Feminino	2	Atalaia	(-)	(-)
29	68	Masculino	1	Maceió	(-)	(-)
31	73	Masculino	3	Maceió	(-)	(-)
33	30	Feminino	2	Maceió	(-)	(-)
34	66	Feminino	3	Maceió	(-)	(-)
49	34	Masculino	3	Maceió	(-)	(-)
52	65	Masculino	3	Maceió	(-)	(-)
95	61	Masculino	2	Marechal Deodoro	(-)	(-)
102	71	Masculino	4	Maceió	(-)	(-)
104	23	Feminino	5	Maceió	(-)	(-)
109	82	Masculino	4	Maceió	(B)	(-)
117	59	Feminino	4	Teotônio Vilela	(-)	(-)
162	20	Masculino	2	Marechal Deodoro	(-)	(-)
169	31	Feminino	2	Marechal Deodoro	(-)	(-)
172	17	Masculino	2	Pilar	(-)	(-)
183	51	Feminino	4	Santana do Ipanema	(-)	(-)

Legenda: (+) positivo; (-) negativo; (B) *Borderline*.

#### 5.4.3 Quantificação de citocinas e quimiocinas

Com o objetivo de realizar uma prospecção de marcadores imunológicos associados a fase aguda precoce da infecção pelo CHIKV os níveis de citocinas e quimiocinas foram quantificados em amostras de soro de pacientes positivos para a detecção do genoma viral com até cinco dias após o início dos sintomas e comparados ao grupo de doadores saudáveis (grupo controle negativo).

Dentre as citocinas quantificadas e comparadas entre os grupos de pacientes infectados pelo CHIKV e o grupo de doadores saudáveis verificou-se um aumento significativo nos níveis de IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  nos pacientes com CHIKV, conforme mostrado na Figura 9 e Tabela 7. No entanto, não foi verificado um aumento na concentração de IL-1 $\beta$ , IL-12p70 e IL-4 no soro dos pacientes positivos quando comparado ao grupo de pacientes saudáveis (Tabela 7 e Figura 9).

Ao avaliar os níveis das quimiocinas séricas detectou-se um aumento de IL-8; MIG; MCP-1 e IP-10 na fase aguda da infecção quando comparado os pacientes com CHIKV ao grupo de doadores saudáveis (Tabela 9 e Figura 10). Neste estudo, não foi detectado um aumento na concentração sérica da quimiocina RANTES, também denominada de CCL-5, embora os valores obtidos na quantificação foram estimados numericamente baseando-se na logística de 5 parâmetros (*5-parameter logistic*) a partir dos valores obtidos da curva-padrão. Além disso, para as citocinas IL-2 e TNF- $\alpha$  os valores obtidos estavam abaixo do limite de detecção para a metodologia empregada (dados não mostrados).

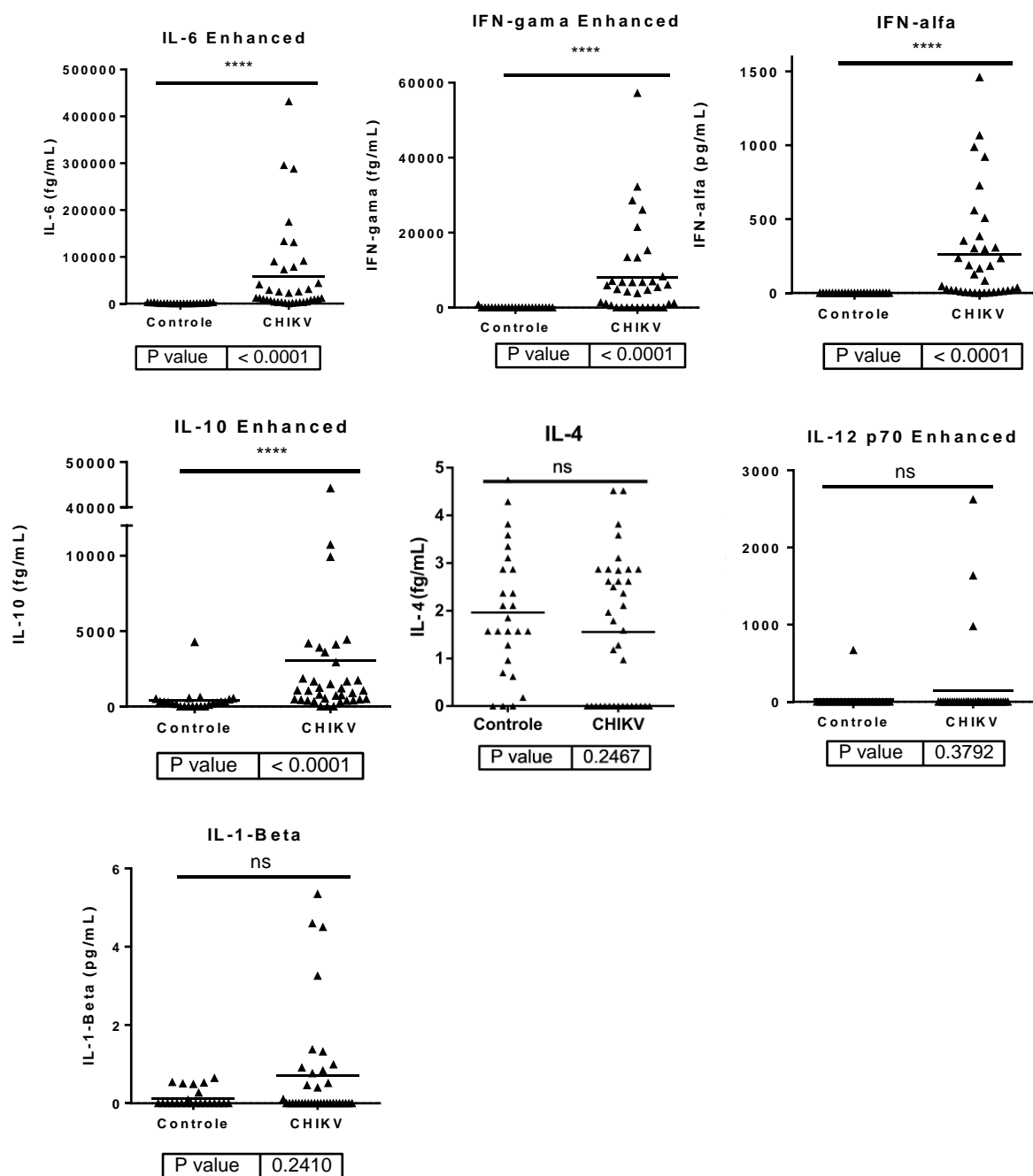
Assim, verificou-se que a resposta imune presente nos pacientes na fase aguda da infecção pelo CHIKV foi caracterizada por uma resposta inflamatória mediada principalmente por IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 e MIG, associadas a um aumento de IFN- $\alpha$ , que possui uma potente atividade antiviral.

**Tabela 7 – Níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pacientes na fase aguda virêmica da infecção pelo CHIKV e doadores saudáveis**

Citocina/ Quimiocina	CHIKV Positivo				Doadores Saudáveis				valor de <i>p</i>
	Média	Variação	Unidade	Mediana	Média	Variação	Unidade	Mediana	
<b>IL-4</b>	1,87	(0,0-17,05)	pg/μL	1,44	1,88	(0,0-4,29)	pg/μL	1,85	0,2699
<b>(ES) IL-6</b>	58505,82	(0,0-431725,9)	fg/μL	11614,70	789,69	(0,0-2611,68)	fg/μL	433,33	<b>&lt;0,0001</b>
<b>(ES) IL-10</b>	3041,78	(0,0-44219,1)	fg/μL	1049,69	412,94	(0,0-4276,53)	fg/μL	255,20	<b>&lt;0,0001</b>
<b>(ES) IFN-γ</b>	8062,91	(0,0-57220,14)	fg/μL	4774,58	34,37	(0,0-790,48)	fg/μL	0,00	<b>&lt;0,0001</b>
<b>(ES) IL-12p70</b>	145,49	(0,0-2622,01)	fg/μL	0,00	29,06	(0,0-668,39)	fg/μL	0,00	0,3792
<b>IL-1β</b>	0,71	(0,0-5,35)	pg/μL	0,00	0,13	(0,0-0,65)	pg/μL	0,00	0,241
<b>IFN-α</b>	259,12	(0,0-1461,29)	pg/μL	105,00	0,00	(0,0-0,0)	pg/μL	0,00	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IP-10</b>	3277,11	(35,51-10332,81)	pg/μL	2278,88	41,71	(17,04-88,15)	pg/μL	33,46	<b>&lt;0,0001</b>
<b>MCP-1</b>	1227,66	(34,11-9579,98)	pg/μL	448,12	85,97	(32,58-227,87)	pg/μL	74,04	<b>&lt;0,0001</b>
<b>MIG</b>	1880,43	(17,61-20834,63)	pg/μL	318,78	31,07	(9,38-86,8)	pg/μL	29,04	<b>&lt;0,0001</b>
<b>IL-8</b>	65,45	(2,27-981,36)	pg/μL	20,37	2,41	(0,0-6,32)	pg/μL	2,47	<b>&lt;0,0001</b>
<b>RANTES</b>	7294,14	(399,1-21420,57)	pg/μL	6560,54	6815,58	(3673,26-8664,44)	pg/μL	6993,99	0,6695

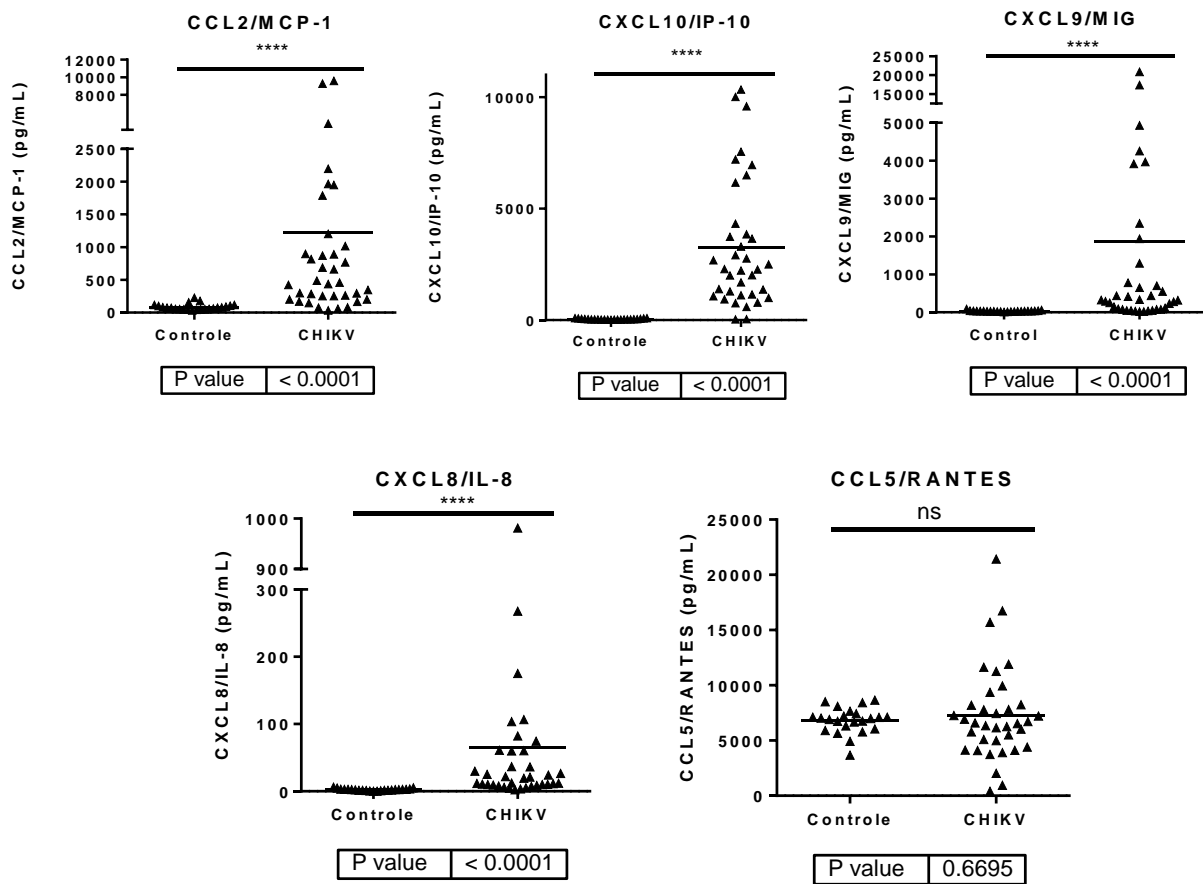
Legenda: Foram consideradas diferenças significantes valores onde  $p < 0,05$  para o teste U de Mann-Whitney. Na coluna da média está mostrado a média  $\pm$  SEM (erro padrão da média).

**Figura 9 – Níveis de citocinas séricas quantificadas pela metodologia de CBA**



Legenda: As citocinas IL-10, IL-12p70, IL-6 e IFN-gama foram quantificadas utilizando a metodologia de CBA *Enhanced Sensitivity* e seus valores expressos em fg/mL. As citocinas IL-2, IL-4 e IFN-alfa foram quantificadas pela metodologia de *CBA Kit Th1/Th2 II* e seus valores expressos em pg/mL. A barra horizontal representa a média. Controle – grupo de doadores saudáveis (n=23); CHIKV: grupo de pacientes positivos para CHIKV na fase aguda virêmica até cinco dias pós-início dos sintomas (n=36). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos utilizando-se o Teste U de Mann-Whitney.

**Figura 10 – Níveis de quimiocinas séricas quantificadas pela metodologia de CBA**



Legenda: Controle – grupo de doadores saudáveis (n=23); CHIKV: grupo de pacientes positivos para CHIKV na fase aguda virêmica até cinco dias pós-início dos sintomas (n=36). A barra horizontal representa a mediana. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos utilizando-se o Teste U de Mann-Whitney.

## 6. DISCUSSÃO

O CHIKV é um grave problema de saúde pública que causa epidemias de grande magnitude em várias localidades, principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Além disso, não existe um tratamento específico ou uma vacina atualmente disponível para esta infecção viral. A propagação do vírus também foi observada em toda a América do Norte e Europa onde casos desta infecção foram relatados em Los Angeles, Barcelona, Itália, Grécia, entre outros (BOCANEGRA et al., 2016; FREDERICKS; FERNANDEZ-SESMA, 2014; KELVIN, 2011; KENDRICK et al., 2014; MINER et al., 2015; TSIODRAS et al., 2016; ZAMMARCHI et al., 2016).

No Brasil, a primeira transmissão autóctone do CHIKV foi reportada no ano de 2014 sendo detectado o genótipo asiático deste vírus na cidade de Oiapoque, no Amapá (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; PAHO, 2014). Posteriormente, no mesmo ano, casos autóctones desta infecção ocasionada pelo genótipo ECSA do CHIKV foram confirmados na cidade de Feira de Santana, Bahia (NUNES et al., 2015). Portanto, no Brasil, dois focos iniciais provenientes de dois genótipos virais diferentes deste vírus foram estabelecidos. Nos anos seguintes os genótipos, asiático (ano de 2014-2015) e ECSA (ano de 2016), foram detectados no Rio de Janeiro, destacando-se o potencial de disseminação deste arbovírus para outras regiões do país (CONTEVILLE et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

No ano de 2016, o número de casos relatados de infecção pelo CHIKV aumentou em vários estados brasileiros, sendo que surtos desta arbovirose foram reportados principalmente na região nordeste do Brasil, onde ocorre a co-circulação de outros arbovírus, como por exemplo, os vírus da Dengue e o vírus Zika (NUNES et al., 2015; RODRIGUES FARIA et al., 2016; ROSSINI; LANDINI; SAMBRI, 2016; TEIXEIRA et al., 2015). Assim, estudos relacionados a genotipagem e análise filogenética do CHIKV são necessários em diversas localidades do mundo corroborando e contribuindo com as ações e estratégias de vigilância epidemiológica em saúde pública.

O Estado de Alagoas está localizado na região nordeste do Brasil, fazendo fronteira com os Estados de Pernambuco, Bahia e Sergipe, onde em 2016, evidenciou-se um grande aumento no número de casos suspeitos de infecção pelo CHIKV. De acordo com informações epidemiológicas do Ministério de Saúde do

Brasil, a incidência do número de casos suspeitos desta arbovirose em Alagoas aumentou de 41,5 no ano 2015 para 514,8 casos a cada 100.000 habitantes no ano de 2016 (BRASIL, 2017). Assim, um dos objetivos deste estudo consistiu em realizar a genotipagem e análise filogenética do CHIKV em amostras de pacientes provenientes do surto desta infecção em Alagoas em 2016. Por meio do sequenciamento de DNA e posterior análise filogenética, detectamos a presença do genótipo ECSA do CHIKV circulante em diversos municípios do Estado de Alagoas durante a epidemia de 2016. Interessantemente, no mesmo ano, no Estado de Sergipe, que faz fronteira com Alagoas, foi reportada a primeira identificação de um mosquito *Ae. aegypti* infectado naturalmente pelo genótipo ECSA do CHIKV nas Américas (COSTA-DA-SILVA et al., 2017).

No presente estudo, todas as amostras analisadas provenientes de diversas localidades do Estado de Alagoas (n=11) foram caracterizadas como pertencentes ao genótipo ECSA. A análise do alinhamento de nucleotídeos entre as amostras obtidas evidenciou somente uma substituição de nucleotídeos na amostra IR95, proveniente da cidade de Marechal Deodoro, região metropolitana de Maceió, embora esta mutação não tenha promovido uma troca de aminoácido nesta região analisada. Por meio do alinhamento comparativo da sequência de nucleotídeos da região parcial codificante para a proteína *E1* das amostras deste estudo com outras sequências depositadas e disponíveis no banco de dados do *GenBank*, detectou-se semelhança das mesmas com as cepas do genótipo ECSA reportadas tanto em Feira de Santana no ano de 2014, quanto em Sergipe no ano de 2016 (Identidade de 1,0) (COSTA-DA-SILVA et al., 2017; NUNES et al., 2015). Além disso, um estudo recente detectou o genótipo ECSA em amostras oriundas de pacientes do nordeste brasileiro, incluindo amostras de Maceió – AL, corroborando com os nossos resultados (CHARLYS DA COSTA et al., 2017).

Além disso, diversas substituições de nucleotídeos foram detectadas em todas as amostras analisadas neste estudo quando comparadas a primeira cepa ECSA isolada na Tanzânia no ano de 1953. Embora essas substituições de nucleotídeos foram verificadas nas amostras sequenciadas, ao analisar a tradução destas sequências, não foram detectadas alterações de aminoácidos nesta região correspondente a uma parte da proteína do envelope viral *E1*.



Além da caracterização molecular do genótipo do CHIKV circulante em Alagoas no surto de 2016, um dos objetivos deste estudo foi realizar a prospecção de marcadores imunológicos associados a fase aguda virêmica desta arbovirose. Para isso, foram quantificados 14 analitos solúveis, incluindo diversas citocinas e quimiocinas, em amostras de soro de pacientes positivos para a detecção do genoma viral com até 5 dias após o início dos sintomas. Como controle negativo, foram utilizadas amostras de soro de doadores de sangue saudáveis e com sorologia negativa para IgM anti-CHIKV.

Por meio da análise estatística comparativa foi constatado um aumento nos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IFN- $\gamma$  em relação ao grupo controle. Além disso, um aumento de IL-10, que possui uma atividade imunossupressora foi evidenciada sugerindo uma possível tentativa de modulação negativa Th1 buscando uma homeostasia do sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (DE MAEYER; DE MAEYER-GUIGNARD, 1992).

A interleucina-6 possui uma grande variedade de atividades biológicas e de regulação da resposta imune, como hematopoiese, resposta imune de fase aguda e inflamação. Possui ainda importante papel na atração de eosinófilos para o local da inflamação (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990; MIHARA et al., 2012) sendo produzida por células B, T e monócitos (HIRANO et al., 1990). Esta citocina pode ser secretada por macrófagos em resposta a patógenos, além de estimular a síntese proteínas de fase aguda em hepatócitos humanos (HEINRICH et al., 1990).

Dois estudos realizados na Índia e Singapura em 2011 descreveram que em pacientes que se recuperaram completamente da infecção por CHIKV, o nível de IL-6 voltou à normalidade, porém, em pacientes com artrite crônica o nível desta citocina permaneceu elevado, indicando uma forte associação da mesma com o desenvolvimento da artrite crônica decorrente desta infecção viral (CHAAITANYA et al., 2011; CHOW et al., 2011). Em outro estudo, foi mostrado uma correlação positiva dos níveis desta citocina com a carga viral, visto que os níveis de IL-6 e IL-8 foram significativamente maiores em pacientes infectados pelo CHIKV com elevada carga viral quando comparado a pacientes que apresentavam uma baixa carga viral (REDDY et al., 2014). Além disso, tem-se associado altos níveis de IL-6 como um possível marcador de severidade na infecção pelo CHIKV, juntamente com as citocinas IL-1 $\beta$  e RANTES (NG et al., 2009). Em nosso estudo, verificamos um

aumento significativo de IL-6 ( $55564 \pm 15548$  CHIKV vs.  $756,8 \pm 190,5$  CN - controle negativo) corroborando com estudos prévios, no entanto, não foi detectado um aumento das citocinas IL-1 $\beta$  e RANTES em relação ao grupo controle. Estes resultados obtidos podem ser decorrentes da fase aguda precoce da infecção. Corroborando com estes resultados, em camundongos, não se observou aumentos significativos nos níveis destes de IL-1  $\beta$  e RANTES em até 3 dias pós infecção com CHIKV (PAL et al., 2014).

A quimiocina IL-8/CCL2 é conhecida como o fator quimiotático de neutrófilos. Esta quimiocina é secretada por macrófagos ativados e promove o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório (BAGGIOLINI; DEWALD; MOSER, 1994). No presente estudo, verificamos um aumento significativo desta quimiocina no soro dos pacientes na fase aguda da infecção ( $71,88 \pm 26,71$  CHIKV vs.  $2,409 \pm 0,2956$  CN - controle negativo) corroborando com estudos anteriores que reportaram a elevação dos níveis circulantes de IL-8 devido a infecção pelo CHIKV (CHAAITANYA et al., 2011; CHOW et al., 2011). No entanto, outros estudos não verificaram esta alteração ou ainda detectaram uma diminuição desta citocina quando comparado a pacientes saudáveis (CHIRATHAWORN et al., 2010; SIMARMATA et al., 2016). Corroborando com o resultado obtido no presente estudo, em um modelo experimental de infecção pelo CHIKV em camundongos, verificou-se um aumento de IL-8 na fase aguda até o 6º dia pós infecção, sendo os níveis mais elevados detectados no 3º dia pós-infecção viral (PATIL; HUNDEKAR; ARANKALLE, 2012).

A IL-10 é uma citocina com atividade anti-inflamatória com papel central na inibição da resposta imune. Assim como neste trabalho, estudos anteriores mostraram um aumento de IL-10 na infecção pelo CHIKV em fase aguda (CHAAITANYA et al., 2011; NG et al., 2009; SIMARMATA et al., 2016). Em um desses estudos, o nível desta citocina durante a fase aguda obteve o maior valor quando comparado com a fase de recuperação e pós-recuperados (CHAAITANYA et al., 2011). No entanto, Kelvin e colaboradores (2011) detectaram valores menores de IL-10 tanto na fase aguda quanto em 6 meses após o início dos sintomas quando comparados ao grupo controle (KELVIN et al., 2011).

O fator de necrose tumoral – alfa (TNF- $\alpha$ ) é produzido principalmente por monócitos e macrófagos, mas também por células B, células T e fibroblastos (BRADLEY, 2008). Esta citocina está presente em níveis elevados no processo

inflamatório envolvido na artrite reumatoide (CHOY; PANAYI, 2001; YAMANAKA, 2015). Além disso, possui uma função mediadora de apoptose e é um estimulador tanto autócrino quanto parácrino de outras citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e GM-CSF (VASANTHI; NALINI; RAJASEKHAR, 2007). Em estudos anteriores, níveis elevados desta citocina foram detectados na fase aguda da infecção pelo CHIKV (CHIRATHAWORN et al., 2013; SIMARMATA et al., 2016; VENUGOPALAN et al., 2014). Interessantemente, níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  foram detectados por Venugopalan e colaboradores (2014) em pacientes recuperados da doença (VENUGOPALAN et al., 2014). Embora alguns estudos verificaram um aumento de TNF- $\alpha$  decorrente desta infecção, esta informação ainda é controversa na literatura visto que não reportaram alteração nos níveis desta citocina em relação ao grupo de pacientes saudáveis (CHAAITANYA et al., 2011; KELVIN et al., 2011; NG et al., 2009; REDDY et al., 2014; WAUQUIER et al., 2011).

Com relação a fase crônica da doença, em um estudo em pacientes que apresentaram artralgia persistente em decorrência da infecção por CHIKV foi observado que os valores de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIG e RANTES foram maiores durante a segunda semana de desenvolvimento da doença (VENUGOPALAN et al., 2014). Posteriormente, os níveis desses analitos retornaram a valores próximos da normalidade, exceto para as citocinas MIG, MCP-1 e RANTES. Em nosso estudo, destes mesmos analitos, na fase aguda não verificamos um aumento de IL-1 $\beta$ , IL-4, IL12p70 e RANTES.

Os interferons do tipo I são denominados de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  e são conhecidos por sua potente atividade antiviral, além da função moduladora na imunidade inata e específica (DURBIN et al., 2000; MULLER et al., 1994). Além de promover um estado antiviral nas células alvo estas citocinas podem induzir apoptose em células infectadas para alguns vírus (PESTKA et al., 1987; TANAKA et al., 1998) e são cruciais na ativação de células NK e macrófagos (BELARDELLI, 1995; BIRON et al., 1999; BOGDAN, 2000).

O IFN- $\gamma$  é um importante ativador de macrófagos e indutor da expressão de MHC de classe II nestas células (FARRAR; SCHREIBER, 1993). Esta citocina pode ser produzida por células NK na fase inicial da infecção viral, estimulando a produção de quimiocinas como MIG (DE MAEYER; DE MAEYER-GUIGNARD, 1992). É considerada a principal citocina efetora Th1 além de induzir a expressão de

várias quimiocinas como CCL-2/MCP-1, CXCL-9/MIG e CXCL-10/IP-10 (VALLEDOR et al., 2008).

No presente estudo verificamos um aumento significativo nos níveis de quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$  na infecção pelo CHIKV, destacando-se MCP-1, IP-10 e MIG. A quimiocina MCP-1 (proteína quimioatraente monocitária-1) promove o recrutamento de monócitos/ macrófagos para o sítio de inflamação (DESHMANE et al., 2009). Camundongos que superexpressam MCP-1 apresentam um grande número de macrófagos infiltrados no tecido adiposo branco (KAMEI et al., 2006). Em outro estudo, verificou-se que MCP-1 é crítico para a iniciação e desenvolvimento de lesões ateroscleróticas, e que durante a progressão da aterosclerose, há uma deposição de lipídios dentro de macrófagos e monócitos presentes na camada íntima, levando à formação e eventual aumento das lesões ateroscleróticas (GU et al., 1998). MIG/CXCL9 é uma quimiocina para células T induzida por IFN- $\gamma$  que possui papel na resposta imune em infecções virais visto que a ausência de MIG em ratos promoveu uma maior sensibilidade à infecção genital por HSV-2 (WUEST; CARR, 2008). A quimiocina IP-10 é secretada por células endoteliais, neutrófilos, monócitos, fibroblastos, queratinócitos em resposta ao IFN- $\gamma$  (DYER et al., 2009; LUSTER; RAVETCH, 1987). Esta quimiocina promove o recrutamento de monócitos/ macrófagos, células T, células NK e DCs e a adesão de células T à células endoteliais, além de possuir atividade antitumoral (LIU et al., 2011).

Três estudos detectaram um aumento de IFN- $\gamma$  em pacientes acometidos por CHIKV em fase aguda (SIMARMATA et al., 2016; VENUGOPALAN et al., 2014; WAUQUIER et al., 2011) e o aumento de MCP-1 foi detectado na maioria dos estudos que avaliaram pacientes na fase aguda da infecção (CHAAITANYA et al., 2011; CHIRATHAWORN et al., 2013; CHOW et al., 2011; REDDY et al., 2014; SIMARMATA et al., 2016; VENUGOPALAN et al., 2014; WAUQUIER et al., 2011). No caso da MCP-1, foi mostrado que esta quimiocina permaneceu elevada por até 2-3 meses (CHOW et al., 2011). Um aumento de MIG também foi reportado em estudos prévios corroborando com os resultados obtidos em nosso estudo (CHAAITANYA et al., 2011; CHOW et al., 2011; KELVIN et al., 2011; NG et al., 2009; REDDY et al., 2014; SIMARMATA et al., 2016). Com relação a IP-10, estudos anteriores mostraram um aumento desta quimiocina em pacientes com CHIKV principalmente na fase aguda (CHAAITANYA et al., 2011; CHOW et al.,

2011; REDDY et al., 2014). Neste estudo, evidenciamos um aumento significativo de IP-10 na fase aguda virêmica da infecção ( $3107 \pm 468,8$  CHIKV vs.  $42,31 \pm 4,374$  CN - Controle negativo).

Devido a fase inicial precoce da infecção por CHIKV avaliada neste estudo, provavelmente a elevada produção de IFN- $\gamma$  detectada seja em virtude da ativação, recrutamento e proliferação das células NK contra o vírus (DOKUN et al., 2001; GREGOIRE et al., 2007).

Muito embora em alguns estudos o período de início dos sintomas seja semelhante (fase aguda, crônica ou pacientes já recuperados), outros fatores poderiam justificar as divergências encontradas entre vários trabalhos para as mesmas citocinas/quimiocinas, como, por exemplo, a carga viral, o genótipo do vírus, alelos do MHC, gênero, idade, polimorfismos e diferentes etnias influenciando na resposta imune desenvolvida (HARALAMBIEVA et al., 2014; KLEIN, 2012; KORVA et al., 2013; OBADA et al., 2017; SUGIMOTO et al., 2003).

Em resumo, a tabela a seguir compara as citocinas e quimiocinas quantificadas neste estudo em pacientes acometidos por CHIKV em fase aguda em relação a outros trabalhos científicos publicados previamente na literatura.

**Tabela 8 – Citocinas e quimiocinas avaliadas neste estudo frente a outros trabalhos científicos**

Estudo	Citocina/Quimiocina													
	IL-1 b	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	INF-a	IFN- $\beta$	TNF-a	IP-10	RANTES	MCP-1	MIG
CHOW <i>et al.</i> , 2011														
CHAAITHANYA <i>et al.</i> , 2011														
CHIRATHAWORN, 2013														
REDDY, 2014 (RNA +)														
VENUGOPALAN, 2014														
NG <i>et al.</i> , 2009					↓							↓		
SIMARMATA <i>et al.</i> , 2016														
WAUQUIER <i>et al.</i> , 2011												*		
KELVIN <i>et al.</i> , 2011		↓	↓			↓	↓							
Nº de trabalhos que avaliaram o analito	8	6	8	9	8	8	5	5	7	8	8	5	9	7
Nº de trabalhos detectaram elevação	3	1	4	8	5	3	2	5	3	3	7	4	7	6
Este Estudo														

Legenda:

	Elevado
	Não significante
↓	Níveis abaixo do grupo controle
	Não avaliado ou não descrito
*	Valor extrapolado

Referências: (CHAAITANYA *et al.*, 2011; CHIRATHAWORN *et al.*, 2013; CHOW *et al.*, 2011; KELVIN *et al.*, 2011; NG *et al.*, 2009; REDDY *et al.*, 2014; SIMARMATA *et al.*, 2016; VENUGOPALAN *et al.*, 2014; WAUQUIER *et al.*, 2011).

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo relata o genótipo ECSA durante o surto CHIKV de 2016 em diferentes municípios do Estado de Alagoas, destacando-se a necessidade de vigilância e investigação epidemiológica molecular na disseminação de genótipos distintos deste vírus no Brasil e no mundo.

Com relação a prospecção de marcadores imunológicos (citocinas e quimiocinas) de fase aguda presentes no soro de pacientes infectados pelo CHIKV, uma resposta pró-inflamatória e antiviral mediada por IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MCP-1, IP-10 e MIG foi detectada, caracterizando-os como os principais biomarcadores imunológicos séricos nesta fase da infecção. Estudos posteriores com grupos de pacientes em fase crônica e/ou convalescentes, serão necessários para avaliação de quais analitos que se mostraram elevados, como IL-6, IL-8, MCP-1 possam estar relacionados a severidade da doença e/ou poliartralgia persistente.

Esses resultados podem contribuir para a compreensão da resposta imune desenvolvida durante a infecção pelo CHIKV e sua imunopatologia, assim como, colaborar na descoberta e validação de marcadores imunológicos de fase aguda que possam estar associados ao prognóstico e à morbidade aplicados futuramente ao diagnóstico e monitoramento terapêutico desta arbovirose re-emergente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(ICTV), I. C. O. T. O. V. ICTV Taxonomy history: Orthobunyavirus. August 2016 2017. Disponível em: < [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20162122](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20162122) >. Acesso em: 06/11/2017.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. **Adv Immunol**, v. 55, p. 97-179, 1994.

BARON, S.; FONS, M.; ALBRECHT, T. Viral Pathogenesis. In: BARON, S. (Ed.). **Medical Microbiology**. 4th. Galveston (TX), 1996. ISBN 0963117211.

BELARDELLI, F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. **APMIS**, v. 103, n. 3, p. 161-79, Mar 1995.

BIRON, C. A. et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 189-220, 1999.

BOCANEGRA, C. et al. Imported cases of Chikungunya in Barcelona in relation to the current American outbreak. **J Travel Med**, v. 23, n. 3, Mar 2016.

BOGDAN, C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. **Curr Opin Immunol**, v. 12, n. 4, p. 419-24, Aug 2000.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. 2. Cytokines and chemokines. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S460-75, Feb 2003.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 149-60, Jan 2008.

BRASIL, M. D. S.-. Boletim Epidemiológico Nº48. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 48, n. 3, p. 11, 2017.

BRASIL., M. D. S. S. D. V. E. S. D. D. V. D. D. T. **Febre de chikungunya: manejo clínico**. MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S., SECRETARIA DE ATENÇÃO BÁSICA. Editora MS: Giovanini Evelim Coelho, Roberta Gomes Carvalho, Rodrigo Fabiano do Carmo Said: 28 p. 2015.

BREHIN, A. C. et al. Production and characterization of mouse monoclonal antibodies reactive to Chikungunya envelope E2 glycoprotein. **Virology**, v. 371, n. 1, p. 185-95, Feb 05 2008.

CAGLIOTI, C. et al. Chikungunya virus infection: an overview. **New Microbiol**, v. 36, n. 3, p. 211-27, Jul 2013.



CHAAITANYA, I. K. et al. Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. **Viral Immunol**, v. 24, n. 4, p. 265-71, Aug 2011.

CHARLYS DA COSTA, A. et al. Spread of Chikungunya Virus East/Central/South African Genotype in Northeast Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 10, p. 1742-1744, Oct 2017.

CHEN, C. I. et al. Comparative pathogenesis of epidemic and enzootic Chikungunya viruses in a pregnant Rhesus macaque model. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, n. 6, p. 1249-58, Dec 2010.

CHIRATHAWORN, C. et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pac J Trop Med**, v. 6, n. 8, p. 631-4, Aug 2013.

CHIRATHAWORN, C. et al. Serum IL-18 and IL-18BP levels in patients with Chikungunya virus infection. **Viral Immunol**, v. 23, n. 1, p. 113-7, Feb 2010.

CHOW, A. 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. 149-57, Jan 15 2011.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, v. 344, n. 12, p. 907-16, Mar 22 2001.

CHRETIEN, J. P. et al. Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. **Am J Trop Med Hyg**, v. 76, n. 3, p. 405-7, Mar 2007.

CHUA, C. L. et al. The neutralizing role of IgM during early Chikungunya virus infection. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171989, 2017.

CHUA, H. H. et al. A fatal case of chikungunya virus infection with liver involvement. **Med J Malaysia**, v. 65, n. 1, p. 83-4, Mar 2010.

CHUSRI, S. et al. Kinetics of Chikungunya Infections during an Outbreak in Southern Thailand, 2008–2009. **Am J Trop Med Hyg**, v. 90, n. 3, p. 410-7, Mar 5 2014.

CONTEVILLE, L. C. et al. Phylogenetic analyses of chikungunya virus among travelers in Rio de Janeiro, Brazil, 2014-2015. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 347-8, May 2016.

COSTA-DA-SILVA, A. L. et al. First report of naturally infected *Aedes aegypti* with chikungunya virus genotype ECSA in the Americas. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 6, p. e0005630, Jun 2017.

COUDERC, T. et al. 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, p. e29, Feb 08 2008.

DAVIS, L. E.; BECKHAM, J. D.; TYLER, K. L. North American encephalitic arboviruses. **Neurol Clin**, v. 26, n. 3, p. 727-57, ix, Aug 2008.

DE MAEYER, E.; DE MAEYER-GUIGNARD, J. Interferon-gamma. **Curr Opin Immunol**, v. 4, n. 3, p. 321-6, Jun 1992.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J Interferon Cytokine Res**, v. 29, n. 6, p. 313-26, Jun 2009.

DOKUN, A. O. et al. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. **Nat Immunol**, v. 2, n. 10, p. 951-6, Oct 2001.

DUONG, V. et al. Reemergence of Chikungunya virus in Cambodia. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 12, p. 2066-9, Dec 2012.

DURBIN, J. E. et al. Type I IFN Modulates Innate and Specific Antiviral Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 8, p. 4220-4228, 2000.

DYER, K. D. et al. Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2649-56, Sep 24 2009.

FARRAR, M. A.; SCHREIBER, R. D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 11, p. 571-611, 1993.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5th. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. ISBN 9780781760607 (alk. paper)

0781760607 (alk. paper).

FREDERICKS, A. C.; FERNANDEZ-SESMA, A. The burden of dengue and chikungunya worldwide: implications for the southern United States and California. **Ann Glob Health**, v. 80, n. 6, p. 466-75, Nov-Dec 2014.

GARMASHOVA, N. et al. The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2472-2484, 11/15

09/21/received

10/26/accepted 2007.

GASQUE, P. et al. Chikungunya virus pathogenesis and immunity. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 15, n. 4, p. 241-9, Apr 2015.

GOULD, E. A. et al. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 12, p. 1702-4, Dec 2010.

GREGOIRE, C. et al. The trafficking of natural killer cells. **Immunol Rev**, v. 220, p. 169-82, Dec 2007.

GU, L. et al. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. **Molecular Cell**, v. 2, n. 2, p. 275-281, 1998.

HALSTEAD, S. B. et al. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. **Am J Trop Med Hyg**, v. 18, n. 6, p. 997-1021, Nov 1969.

HAMMON, W. M.; SATHER, G. E. Virological Findings in the 1960 Hemorrhagic Fever Epidemic (Dengue) in Thailand. **Am J Trop Med Hyg**, v. 13, p. 629-41, Jul 1964.

HARALAMBIEVA, I. H. et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in cellular viral receptors and attachment factor-related genes and humoral immunity to rubella vaccination. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99997, 2014.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J**, v. 265, n. 3, p. 621-36, Feb 01 1990.

HER, Z. et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. **J Immunol**, v. 184, n. 10, p. 5903-13, May 15 2010.

HIRANO, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. **Immunol Today**, v. 11, n. 12, p. 443-9, Dec 1990.

HOARAU, J. J. 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. 5914-27, May 15 2010.

HORCADA, M. L.; DIAZ-CALDERON, C.; GARRIDO, L. Chikungunya fever. Rheumatic manifestations of an emerging disease in Europe. **Reumatol Clin**, v. 11, n. 3, p. 161-4, May-Jun 2015.

HOZ, J. M. et al. Fatal cases of Chikungunya virus infection in Colombia: Diagnostic and treatment challenges. **J Clin Virol**, v. 69, p. 27-9, Aug 2015.

IGARASHI, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. **J Gen Virol**, v. 40, n. 3, p. 531-44, Sep 1978.

JADHAV, M. et al. Chikungunya disease in infants and children in Vellore: a report of clinical and haematological features of virologically proved cases. **Indian J Med Res**, v. 53, n. 8, p. 764-76, Aug 1965.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 837-56, Sep 2009.

JUPP, P. G. et al. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 75, n. 1, p. 15-9, 1981.

KAMEI, N. et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J Biol Chem**, v. 281, n. 36, p. 26602-14, Sep 08 2006.

KELVIN, A. A. Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. **J Infect Dev Ctries**, v. 5, n. 6, p. 441-4, Jul 04 2011.

KELVIN, A. A. et al. Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 8, p. e1279, Aug 2011.

KENDRICK, K. et al. Notes from the field: Transmission of chikungunya virus in the continental United States--Florida, 2014. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 63, n. 48, p. 1137, Dec 05 2014.

KIELIAN, M.; REY, F. A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. **Nat Rev Microbiol**, v. 4, n. 1, p. 67-76, Jan 2006.

KLEIN, S. L. Sex influences immune responses to viruses, and efficacy of prophylaxis and therapeutic treatments for viral diseases. **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 34, n. 12, p. 1050-1059, 09/26 2012.

KORVA, M. et al. Viral load and immune response dynamics in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. e358-e366, 2013/08/01/ 2013.

KOYAMA, S. et al. Innate immune response to viral infection. **Cytokine**, v. 43, n. 3, p. 336-41, Sep 2008.

KUMAR, S. et al. Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection. **Virology**, v. 9, p. 313, Dec 19 2012.

LABADIE, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **J Clin Invest**, v. 120, n. 3, p. 894-906, Mar 2010.

LAHARIYA, C.; PRADHAN, S. K. Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: A review. **J Vector Borne Dis**, v. 43, n. 4, p. 151-60, Dec 2006.

LANCIOTTI, R. S. et al. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 764-7, May 2007.

- LELAND, D. S.; GINOCCHIO, C. C. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 49-78, Jan 2007.
- LEO, Y. S. et al. Chikungunya outbreak, Singapore, 2008. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 5, p. 836-7, May 2009.
- LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 514, Feb 08 2014.
- LIU, M. et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 3, p. 121-30, Jun 2011.
- LOHACHANAKUL, J. et al. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 with low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009-2010 outbreak in Thailand. **Microbiol Immunol**, v. 56, n. 2, p. 134-8, Feb 2012.
- LUSTER, A. D.; RAVETCH, J. V. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). **J Exp Med**, v. 166, n. 4, p. 1084-97, Oct 01 1987.
- MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry into animal cells. **Adv Virus Res**, v. 36, p. 107-51, 1989.
- MAVALANKAR, D.; SHASTRI, P.; RAMAN, P. Chikungunya epidemic in India: a major public-health disaster. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 5, p. 306-7, May 2007.
- MCINTOSH, B. M. et al. Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962. I. Mosquitoes, Wild Primates and Birds in Relation to the Epidemic. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 58, p. 45-51, Mar 1964.
- MESSAOUDI, I. et al. Chikungunya virus infection results in higher and persistent viral replication in aged rhesus macaques due to defects in anti-viral immunity. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2343, 2013.
- MIHARA, M. et al. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**, v. 122, n. 4, p. 143-59, Feb 2012.
- MINER, J. J. et al. Chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 67, n. 5, p. 1214-1220, May 2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. D. V. E. S. Saúde atualiza situação do vírus Chikungunya. **Portal da Saúde**, 01/10/2014 2014. Disponível em: <  
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/14907-saude-atualiza-situacao-do-virus-chikungunya>>. Acesso em: 06/11/2017.

MOURYA, D. T.; MISHRA, A. C. Chikungunya fever. **Lancet**, v. 368, n. 9531, p. 186-7, Jul 15 2006.

MULLER, U. et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. **Science**, v. 264, n. 5167, p. 1918-1921, 1994.

NG, L. F. et al. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4261, 2009.

NUNES, M. R. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Med**, v. 13, p. 102, Apr 30 2015.

OBADA, M. et al. Impact of genetic polymorphisms of four cytokine genes on treatment induced viral clearance in HCV infected Egyptian patients. **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 18, n. 2, p. 111-119, 2017/04/01/ 2017.

PADBIDRI, V. S.; GNANESWAR, T. T. Epidemiological investigations of chikungunya epidemic at Barsi, Maharashtra state, India. **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol**, v. 23, n. 4, p. 445-51, 1979.

PAHO, P. A. H. O. Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas- EW 38: September 19, 2014.

[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=7928&Itemid=40931&lang=en](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=7928&Itemid=40931&lang=en), v. 38, 19/09/2014 2014.

PAL, P. et al. Chikungunya viruses that escape monoclonal antibody therapy are clinically attenuated, stable, and not purified in mosquitoes. **J Virol**, v. 88, n. 15, p. 8213-26, Aug 2014.

PANNING, M. et al. Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 416-22, Mar 2008.

PASTORINO, B. et al. Development of a TaqMan RT-PCR assay without RNA extraction step for the detection and quantification of African Chikungunya viruses. **J Virol Methods**, v. 124, n. 1-2, p. 65-71, Mar 2005.

PATIL, D. R.; HUNDEKAR, S. L.; ARANKALLE, V. A. Expression profile of immune response genes during acute myopathy induced by chikungunya virus in a mouse model. **Microbes Infect**, v. 14, n. 5, p. 457-69, May 2012.

PEGRAM, H. J. et al. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. **Immunol Cell Biol**, v. 89, n. 2, p. 216-24, Feb 2011.

PESTKA, S. et al. Interferons and their actions. **Annu Rev Biochem**, v. 56, p. 727-77, 1987.

PETITDEMANGE, C. et al. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002268, Sep 2011.

PEYREFITTE, C. N. et al. Circulation of Chikungunya virus in Gabon, 2006-2007. **J Med Virol**, v. 80, n. 3, p. 430-3, Mar 2008.

PEYREFITTE, C. N. et al. Chikungunya virus, Cameroon, 2006. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 768-71, May 2007.

PFEFFER, M. et al. Specific detection of chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v. 49, n. 1, p. 49-54, Feb 2002.

PHUKLIA, W. 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. 179-88, Nov 06 2013.

PIALOUX, G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 5, p. 319-27, May 2007.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 2, p. 471-9, Feb 2000.

PRINCE, H. E. et al. Chikungunya virus RNA and antibody testing at a National Reference Laboratory since the emergence of Chikungunya virus in the Americas. **Clin Vaccine Immunol**, v. 22, n. 3, p. 291-7, Mar 2015.

RAMFUL, D. et al. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, n. 9, p. 811-5, Sep 2007.

RAO, T. R. Vectors of Dengue and Chikungunya Viruses: A Brief Review. **Indian J Med Res**, v. 52, p. 719-26, Jul 1964.

REDDY, V. et al. Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. **J Med Virol**, v. 86, n. 8, p. 1393-401, Aug 2014.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, v. 370, n. 9602, p. 1840-6, Dec 01 2007.

RIANTHAVORN, P. et al. An outbreak of chikungunya in southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. **Int J Infect Dis**, v. 14 Suppl 3, p. e161-5, Sep 2010.

RICHARD, V.; PAOAAFAITE, T.; CAO-LORMEAU, V. M. Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* Populations from French Polynesia for Chikungunya Virus. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 5, p. e0004694, May 2016.

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, Jan 1955.

RODAS, J. D. et al. Genetic Characterization of Northwestern Colombian Chikungunya Virus Strains from the 2014-2015 Epidemic. **Am J Trop Med Hyg**, Jul 18 2016.

RODRIGUES FARIA, N. et al. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLoS Curr**, v. 8, Feb 01 2016.

RODRIGUES, F. M. et al. Etiology of the 1965 epidemic of febrile illness in Nagpur city, Maharashtra State, India. **Bull World Health Organ**, v. 46, n. 2, p. 173-9, 1972.

ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J Hyg (Lond)**, v. 54, n. 2, p. 177-91, Jun 1956.

ROSSINI, G.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Evolution and Epidemiology of Chikungunya Virus. **Methods Mol Biol**, v. 1426, p. 3-10, 2016.

ROUGERON, V. et al. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. **J Clin Virol**, v. 64, p. 144-52, Mar 2015.

SALONEN, A.; AHOLA, T.; KAARIAINEN, L. Viral RNA replication in association with cellular membranes. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 285, p. 139-73, 2005.

SANG, Y.; MILLER, L. C.; BLECHA, F. Macrophage Polarization in Virus-Host Interactions. **J Clin Cell Immunol**, v. 6, n. 2, Apr 2015.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med**, v. 3, n. 7, p. e263, Jul 2006.

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

SHAH, K. V.; GIBBS, C. J., JR.; BANERJEE, G. Virological Investigation of the Epidemic of Haemorrhagic Fever in Calcutta: Isolation of Three Strains of Chikungunya Virus. **Indian J Med Res**, v. 52, p. 676-83, Jul 1964.

SHIFERAW, B. et al. The Chikungunya Epidemic: A look at five cases. **IDCases**, v. 2, n. 4, p. 89-91, 2015.



SIMARMATA, D. et al. Early clearance of Chikungunya virus in children is associated with a strong innate immune response. **Sci Rep**, v. 6, p. 26097, May 16 2016.

SOUZA, T. M. et al. First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Curr**, v. 9, Feb 14 2017.

STAPLES, J. E.; FISCHER, M. Chikungunya Virus in the Americas — What a Vectorborne Pathogen Can Do. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 10, p. 887-889, 2014.

STAPLES, J. E.; FISCHER, M. Chikungunya Virus in the Americas — What a Vectorborne Pathogen Can Do. **N Engl J Med**, v. 371, n. 10, p. 887-9, Sep 4 2014.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 491-562, Sep 1994.

SUGIMOTO, K. et al. Influence of ethnicity in the outcome of hepatitis C virus infection and cellular immune response. **Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 590-9, Mar 2003.

TANAKA, N. et al. Type I interferons are essential mediators of apoptotic death in virally infected cells. **Genes Cells**, v. 3, n. 1, p. 29-37, Jan 1998.

TANAY, A. Chikungunya Fever Presenting as a Systemic Disease with Fever, Arthritis and Rash: Our Experience in Israel. **Isr Med Assoc J**, v. 18, n. 3-4, p. 162-3, Mar-Apr 2016.

TANG, B. L. The cell biology of Chikungunya virus infection. **Cell Microbiol**, v. 14, n. 9, p. 1354-63, Sep 2012.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/Central/South African genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 5, p. 906-7, May 2015.

TEO, T. H. et al. Caribbean and La Reunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. **J Virol**, v. 89, n. 15, p. 7955-69, Aug 2015.

THIBERVILLE, S. D. et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res**, v. 99, n. 3, p. 345-70, Sep 2013.

THIRUVENGADAM, K. V.; KALYANASUNDARAM, V.; RAJGOPAL, J. Clinical and pathological studies on chikungunya fever in Madras city. **Indian J Med Res**, v. 53, n. 8, p. 729-44, Aug 1965.

THONNON, J. et al. [Chikungunya virus outbreak in Senegal in 1996 and 1997]. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 92, n. 2, p. 79-82, May 1999.

TSETSARKIN, K. A.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. **Curr Opin Virol**, v. 16, p. 143-150, Feb 2016.

TSETSARKIN, K. A. et al. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 12, p. e201, Dec 2007.

TSIODRAS, S. et al. Imported Chikungunya fever case in Greece in June 2014 and public health response. **Pathog Glob Health**, v. 110, n. 2, p. 68-73, Mar 2016.

VALLEDOR, A. F. et al. Selective Roles of MAPKs during the Macrophage Response to IFN- $\gamma$ . **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4523-4529, 2008.

VASANTHI, P.; NALINI, G.; RAJASEKHAR, G. Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. **APLAR Journal of Rheumatology**, v. 10, n. 4, p. 270-274, 2007.

VENUGOPALAN, A.; GHORPADE, R. P.; CHOPRA, A. Cytokines in acute chikungunya. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111305, 2014.

VOSS, J. E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 468, n. 7324, p. 709-12, Dec 02 2010.

WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **Int J Infect Dis**, v. 58, p. 69-76, May 2017.

WANGCHUK, S. et al. Chikungunya fever outbreak, Bhutan, 2012. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 10, p. 1681-4, Oct 2013.

WAUQUIER, N. et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **J Infect Dis**, v. 204, n. 1, p. 115-23, Jul 01 2011.

WEAVER, S. C. Vector Biology in Viral Pathogenesis. **Nathanson N, editor. Viral Pathogenesis. Lippincott-Raven; New York**, p. 329-352, 1997 1997.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, v. 85, n. 2, p. 328-45, Feb 2010.

WEINBREN, M. P.; HADDOW, A. J.; WILLIAMS, M. C. The occurrence of Chikungunya virus in Uganda. I. Isolation from mosquitoes. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 52, n. 3, p. 253-7, May 1958.

WESTAWAY, E. G. et al. Togaviridae. **Intervirology**, v. 24, n. 3, p. 125-39, 1985.

WONG, H. V. et al. Chikungunya Virus Infection of Aedes Mosquitoes. **Methods Mol Biol**, v. 1426, p. 119-28, 2016.

WU, D. et al. Chikungunya outbreak in Guangdong Province, China, 2010. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 3, p. 493-5, Mar 2012.

WUEST, T. R.; CARR, D. J. The role of chemokines during herpes simplex virus-1 infection. **Front Biosci**, v. 13, p. 4862-72, May 01 2008.

YAMANAKA, H. TNF as a Target of Inflammation in Rheumatoid Arthritis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 15, n. 2, p. 129-34, 2015.

ZAMMARCHI, L. et al. Recent Chikungunya Virus Infection in 2 Travelers Returning from Mogadishu, Somalia, to Italy, 2016. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 11, p. 2025-2027, Nov 2016.

## APÊNDICE

Apêndice - Citocinas avaliadas em diferentes fases da infecção por CHIKV.

Fase	Estudo	Citocinas/Quimiocinas																																	
		IL-1 b	IL-1 Ra	IL-2	IL-2 R	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IL-17	INF-a	IFN-g	TNF-a	IP-10	RANTES	MCP-1	MIG	MIP-1 a	MIP-1 b	EGF	Eotaxin	FGF BASICS	G-CSF	GM-CSF	HGF	VEGF				
Agudo	CHOW <i>et al.</i> , 2011	*					*	*	*		*		*		*			*		*		*													
	CHAAITHANYA <i>et al.</i> , 2011			*						*								*										↓							
	CHIRATHAWORN, 2013																																		
	REDDY, 2014 (RNA +)																																		
	VENUGOPALAN, 2014																																		
	NG <i>et al.</i> , 2009									↓											↓					↓	↓								
	SIMARMATA <i>et al.</i> , 2016						↑A																		↑c						↑c				
	WAUQUIER <i>et al.</i> , 2011										*								*							↓					↓				
	KELVIN <i>et al.</i> , 2011			↓		↓						↓	↓																						
	Não-agudo	CHOW <i>et al.</i> , 2011 (10 dias)			*	*																	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
CHOW <i>et al.</i> , 2011 (4-6 semanas)															*				*					*	*	*	*	*	*	*	*	*			
CHOW <i>et al.</i> , 2011 (2-3 meses)															*									*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
CHAAITHANYA <i>et al.</i> , 2011 (dores)		*					*		*										*		↓										↓				
CHAAITHANYA <i>et al.</i> , 2011 (sem dores)									↓												↓										↓				
CHIRATHAWORN, 2013 (5-13 diass)																									↓										
REDDY, 2014 (RNA - ; IgM +)																					↓	↓	↓												
VENUGOPALAN, 2014 (Recuperados)							*					*					↓	*	*																
KELVIN <i>et al.</i> , (6 meses)				↓		↓						↓	↓																						

Legenda:

■ Elevados

■ Não significativo

■ Níveis abaixo do grupo de doadores saudáveis

■ Não avaliado/Não descrito

■ ↑A Níveis elevados em adultos

■ \* Elevados comparando diferentes fases da doença no mesmo estudo

■ \* Citocina divergente ou Valores extrapolados

■ ↑c Níveis elevados em crianças