



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES
E EPIDEMIOLÓGICOS DA CHIKUNGUNYA NA
POPULAÇÃO DO ESTADO DO MARANHÃO.**

EDUARDO MENDES DOS SANTOS

São Luís- MA

2021

EDUARDO MENDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES
E EPIDEMIOLÓGICOS DA CHIKUNGUNYA NA
POPULAÇÃO DO ESTADO DO MARANHÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Ciências aplicadas à Saúde do Adulto.

Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas e endêmicas no maranhão.

Orientador: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

Coorientadora: Profa. Dra. Josélia Alencar Lima

Coordenador: Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luís

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos
pelo(a) autor(a).Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Mendes dos Santos, Eduardo.

AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES E EPIDEMIOLÓGICOS DA
CHIKUNGUNYA NA POPULAÇÃO DO ESTADO DO
MARANHÃO / Eduardo Mendes dos Santos. - 2021.

78 p.

Coorientador(a): Josélia Alencar Lima. Orientador(a): Maria do
Desterro Soares Brandão Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do
Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2021.

1. Arboviroses. 2. Chikungunya. 3. Colinesterase. 4.
Epidemiologia. I. Alencar Lima, Josélia. II. Soares Brandão
Nascimento, Maria do Desterro. III. Título.

EDUARDO MENDES DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, MOLECULARES E
EPIDEMIOLÓGICOS DA CHIKUNGUNYA NA POPULAÇÃO DO
ESTADO DO MARANHÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado apresentada em sessão pública considerou o candidato aprovado em 28/12/2021.

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Profa. Dra. Josélia Alencar Lima (Coorientadora)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Prof. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

AGRADECIMENTO

Primeiramente a Deus, pois sem Ele este trabalho não seria possível, nos momentos de fraqueza foi Ele que me deu forças;

À minha família, em especial aos meus pais, Bernardo Leocardio dos Santos e Maria do Socorro Mendes, pela compreensão e amor incondicional;

Ao meu irmão Marcos Antônio Mendes dos Santos pelo o incentivo e sempre me encorajar;

Ao meu amigo Arysso Tysson Machado Buna;

À minha querida orientadora professora Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento pela credibilidade, apoio e confiança recebida;

À minha coorientadora professora Dra. Josélia Alencar Lima pela confiança e por sempre me encorajar e fazer ver a ciência da melhor forma, graças a sua paixão pelo que faz.

À minha querida amiga Kátia Regina Assunção Borges pelo apoio e incentivo constante;

A todos os amigos da turma 18 do Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto;

À Universidade Federal do Maranhão – UFMA que forneceu toda estrutura física e familiar para concretização da pesquisa;

Ao Programa de Mestrado Saúde do Adulto pelo apoio, contribuição e acolhida;

Aos professores do Programa de Mestrado Saúde do Adulto pelos ensinamentos;

As secretarias municipais de saúde de São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Vargem Grande e Santa Inês por terem facilitado a realização da pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão – FAPEMA pelo incentivo financeiro com a bolsa de mestrado;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Maranhão – FAPEMA pelos insumos do Projeto Nº 32/2018 CIDADES intitulado VÍRUS ZIKA, CHIKUNGUNYA e DENGUE: Caracterização molecular de vírus circulantes como estratégia de controle em cidades do estado do Maranhão-IDH.

EPÍGRAFE

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.”

Veronica A. Shoffstall

RESUMO

As arboviroses compreendem a um grupo de doenças virais transmitidas ao homem por meio da picada de artrópodes fêmeas infectadas. Os arbovírus possuem ampla distribuição geográfica, estando presente em quase todos os continentes do globo terrestre e são considerados um grave problema de saúde pública, sendo responsáveis por causar surtos e epidemias no mundo. Os principais arbovírus que acometem a saúde humana e de outros animais vertebrados, como os primatas, são membros de cinco famílias: Bunyaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Reoviridae e Rhabdovidae. O vírus Chikungunya, Dengue e Zika são considerados endêmicos no Brasil, ocasionando todos os anos uma alta taxa de incidência. Isso ocorre devido ao não controle do principal mosquito transmissor desses vírus, o mosquito *Aedes Aegypti*, pela própria população e ações governamentais. Nesta perspectiva o presente estudo tem como objetivo caracterizar os aspectos sociodemográficos e clínicos da Chikungunya na população do estado do Maranhão. Os dados sociodemográficos e clínicos foram obtidos através da aplicação de um questionário em 179 pacientes atendidos em unidades de saúde dos municípios de São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Santa Inês e Vargem Grande. De 2019 a 2020, o Maranhão registrou 706 casos prováveis de chikungunya, sendo que, em 2020 houve uma redução de 74,8% dos casos se comparado a 2019. Das 179 amostras apenas 3 deram positivo para Chikungunya. A febre e a mialgia foram os sintomas mais relatados pelos participantes e a atividade da colinesterase plasmática não apresentou resultados significativos para identificação de casos de arboviroses, no entanto, devido ao tamanho de nossa amostra e dados mais robustos, salientamos que é preciso continuar com essa hipótese uma vez que dados refletem positivamente para a dosagem da colinesterase plasmática em pacientes acometidos por Covid. Contudo, faz-se necessário continuar estudando o comportamento dessas arboviroses em nossa população, principalmente com o advento de novos surtos, não somente de dengue, zika e chikungunya, mas também de covid e gripe.

Palavras-chaves: Arboviroses; Chikungunya, Colinesterase; Epidemiologia.

ABSTRACT

Arboviruses comprise a group of viral diseases transmitted to humans through the bite of infected female arthropods. Arboviruses have a wide geographic distribution, being present in almost all the continents of the globe and are considered a serious public health problem, being responsible for causing outbreaks and epidemics in the world. The main arboviruses that affect human health and other vertebrate animals, such as primates, are members of five families: Bunyaviridae, Flaviviridae, Togaviridae, Reoviridae and Rhabdovidae. Chikungunya, Dengue and Zika viruses are considered endemic in Brazil, causing a high incidence rate every year. This is due to the lack of control of the main mosquito that transmits these viruses, the *Aedes Aegypti* mosquito, by the population and government actions. In this perspective, this study aims to characterize the sociodemographic and clinical aspects of Chikungunya in the population of the state of Maranhão. Sociodemographic and clinical data were obtained by applying a questionnaire to 179 patients treated at health units in the cities of São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Santa Inês and Vargem Grande. From 2019 to 2020, Maranhão registered 706 probable cases of chikungunya, and in 2020 there was a reduction of 74.8% of cases compared to 2019. Of the 179 samples, only 3 were positive for Chikungunya. Fever and myalgia were the symptoms most reported by the participants and plasma cholinesterase activity did not show significant results for the identification of arboviruses, however, due to the size of our sample and more robust data, we emphasize that it is necessary to continue with this hypothesis since data reflect positively on the measurement of plasma cholinesterase in patients affected by Covid. However, it is necessary to continue studying the behavior of these arboviruses in our population, especially with the advent of new outbreaks, not only of dengue, zika and chikungunya, but also of covid and flu.

Keywords: Arboviruses; Chikungunya, Cholinesterase; Epidemiology.

Lista de figuras

Figura 1. Representação da estrutura do vírus Chikungunya -----	19
Figura 2. Ciclo do vírus CHIK na célula -----	27
Figura 3. Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya nos anos de 2019 e 2020 no Maranhão -----	41
Figura 4. Curva epidemiológica da chikungunya no Brasil em 2019 e 2020. -	41
Figura 5. Grupo controle (n=8 - amostras com PCR CHIKV negativo e IgG CHIKV negativo) -----	55
Figura 6. Grupo amostras CHIKV n=21 - amostras com PCR CHIKV negativo e IgG positivo.-----	55

Lista de tabelas

Tabela 1. Caracterização sociodemográfica -----	42
Tabela 2. Características de Saneamento básico -----	44
Tabela 3. Relação saneamento básico e doença -----	46
Tabela 4. Análise entre estado civil e DENV 1.-----	46
Tabela 5. Comportamento da ZIKV, DENV 1 e DENV 4 na ocupação dos pacientes -----	47
Tabela 6. Relação entre a variável renda e as doenças CHIKV e DENV 3 -----	48
Tabela 7 Caracterização dos sinais e sintomas dos pacientes -----	48
Tabela 8. Proporção de indivíduos que apresentaram febre e mialgia nas doenças -----	49
Tabela 9. Variável Conjuntivite e dor nas juntas nas doenças -----	50
Tabela 10. Variável Conjuntivite e dor nas juntas nas doenças -----	51
Tabela 11. Análise de proporção entre a variável febre e dias de febre nas doenças -----	51
Tabela 12. Análise da variável vômito e prova do laço nas doenças -----	52
Tabela 13. Análise da variável comorbidades frente as doenças. -----	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh -----	Acetilcolina
AChE -----	Acetilcolinesterase
BChE -----	Butirilcolinesterase
cDNA -----	DNA complementar

CHIK	-----	Chikungunya
CHIKV	-----	Chikungunya vírus
ddH₂O	-----	Água livre de nucleases
ddNTPS	-----	Dideoxynucleotídeos
DNA	-----	Ácido desoxirribonucleico
dNTPS	-----	Desoxirribonucleotídeos
DEN	-----	Dengue vírus
E1	-----	Glicoproteína do Envelope 1
E2	-----	Glicoproteína do Envelope 2
ECSA	-----	Leste-Centro-Sul Africano
IFN	-----	Interferon
IOL	-----	Linhagem do Oceano Índico
Kb	-----	Kilobases
Km²	-----	Quilômetros quadrado
LCR	-----	Líquido cefalorraquidiano
mg	-----	Miligramas
min	-----	Minutos
nAChR	-----	Receptores nicotínicos da acetilcolina
ng	-----	Nanogramas
NsP	-----	Proteínas não estruturais
ORFs	-----	Open reading Frame
Pb	-----	Pares de base
PCR	-----	Reação da Cadeia da Polimerase
PRNT	-----	Teste de Neutralização por Redução de Placas
Proteína C	-----	Proteína do Capsídeo
qRT-PCR	-----	Transcriptase Reversa Seguida da Reação da Cadeia da Polimerase
SNC	-----	Sistema Nervoso Central
SFV	-----	Vírus da Floresta de Semliki
TNF-α	-----	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 ARBOVIROSES	17
2.2 DENGUE	18
2.3 ZIKA VÍRUS	19
2.4 CHIKUNGUNYA	20
2.4.1 ORINGEM DO CHIKV	21
2.4.2 EPIDEMIOLOGIA DO CHIKV	23
2.4.3 GENÓTIPOS DO CHIKV	25
2.4.4 ESTRUTURA VIRAL DO CHIKV	25
2.4.5 TRANSMISSÃO DO CHIKV	26
2.4.6 FISIOPATOLOGIA DO CHIKV	27
2.4.7 ASPECTOS CLÍNICOS DO CHIKV	30
2.4.7.1 FASE AGUDA, PÓS-AGUDA E FASE CRÔNICA	30
2.4.8 DIAGNÓSTICO	31
2.4.8.1 SOROLOGIA	33
3. AS COLINESTERASES COMO MARCADORES INFLAMATÓRIOS	34
4. OBJETIVOS	37
4.1 OBJETIVO GERAL	37
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5. MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	38
5.2 PACIENTES E AMOSTRAS	38
5.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	39
5.4 ENSAIO ENZIMÁTICO	40
5.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DOS ARBOVÍRUS	40
5.6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	41
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 DADOS EPIDMIOLÓGICOS E SOCIODEMOGRÁFICOS	43
6.2 ANÁLISE DOS PACIENTES COM qPCR PARA CHIKV	57
6.3 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE	57

7. CONCLUSÃO	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses compreendem um grupo de vírus que são transmitidos por artrópodes, muito deles insetos hematofagos. Os Arbovírus (ARthropod BORne VÍRUS), como são chamados, possuem ampla distribuição geográfica, pois são encontrados em quase todos os continentes, menos na Antártida, pelo fato do vetor ter afinidade a lugares de clima tropical ou temperado (WEAVER; VASILAKIS, 2009; RUST, 2012).

Os principais arbovírus que acometem os animais vertebrados, como os primatas e os humanos, são membros de cinco famílias: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (FIGUEIREDO, 2007). O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus pertencente à família *Togaviridae* (THIBERVILLE et al, 2013). O CHIKV foi isolado pela primeira vez por Ross (1952-1953) em Newala, Tânzania, onde o principal vetor do vírus foi o mosquito do gênero *Aedes*, principalmente o *Aedes aegypti*. E desde então, surtos de CHIKV se tornaram frequentes no continente africano como vistos no Quênia em 2004; Ilhas Camarões (2005), ultrapassando a barreira do continente e chegando a outros territórios como as ilhas Reunión, Seychelles, Maurício, Madagascar e Mayotte (PIALOUX et al., 2007). Em 2006, na ilha francesa Reunión, houve registro de mais de 240 mil casos e 250 óbitos (SIMON et al., 2006; REITER et al., 2006; TSETSARKIN et al, 2007).

Devido a grande mobilidade urbana, avanço da globalização e a variação do vetor ocorrido na ultima grande epidemia ocorrida na Ilha francesa de Reunion, a doença espalhou-se rapidamente, chegando no continente europeu e também nas Américas (ENSERINK, 2006; TSETSARKIN et al, 2007;).

No Brasil, sua primeira notificação epidemiológica ocorreu em setembro de 2014 no estado do Amapá e posteriormente na Bahia, onde casos agudos de febre associados a dores articulares apontavam para a doença desencadeada por este vírus (HONÓRIO et al, 2015). No entanto, acredita-se que o vírus tenha chegado antes de 2014, não sendo detectado pela vigilância epidemiológica como aponta Souza et al., 2019.

Contudo, fatores socioambientais das cinco regiões do Brasil contribuíram para uma disseminação acelerada do CHIKV em decorrência da proliferação do vetor, sendo registrado em 2016 cerca de 271.824 casos prováveis de CHIKV em todo território brasileiro (COLUCCI, 2016; BRASIL, 2016). Em 2017 a região Nordeste foi a mais afetada pelo CHIKV respondendo por 76% (141.363 casos) dos casos prováveis em todo o país (BRASIL, 2017), onde foram observados pelos agentes de saúde casos de febre, fortes dores musculares e articulares na população afetada, sintomas característicos da doença.

A doença Chikungunya pode evoluir em duas fases: aguda ou febril (com duração até 10 dias) e crônica (>90 dias). Na fase aguda, as manifestações clínicas variam muito, e vão desde a febre alta com cefaleia e náuseas à mialgia e artralgia simétrica (THIBERVILLE et al, 2013). Quando há persistência desses dois últimos sintomas por muito tempo, considera-se a doença em sua fase crônica, em que 40 a 80% dos pacientes desenvolvem manifestações reumáticas não resolvidas associadas à inflamação e à destruição do tecido musculoesquelético, podendo levar à deformidade articular e incapacitação laboral (CHOPRA et al., 2006).

Os sintomas crônicos da chikungunya assemelham-se muito aos da artrite reumatoide, sendo difícil distinguir entre essas duas situações clínicas apenas com base na clínica do paciente (THANAPATI et al, 2017). Com isso, as respostas inflamatórias à infecção e dano tecidual são caracterizadas por uma complexa interação entre citocinas pró e anti-inflamatórias, e outros mediadores inflamatórios direcionados à erradicação de invasores que auxiliam na diferenciação entre as duas doenças (PAVLOV; TRACEY, 2005).

Células, natural killer (NK) e natural killer T (NKT), componentes importantes do sistema imune inato, estão criticamente envolvidos nas respostas imunes do hospedeiro a agentes infecciosos, como vírus e fungos, e a células malignamente transformadas (WALDHAUER, STEINLE 2008; BIRON et al, 1999).

Essas células expressam citocinas, como o Interferon gama ($\text{IFN-}\gamma$) e o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), uma das mais potentes citocinas osteoclastogênicas detectada comumente nos processos artríticos (SUHRBIER et al, 2009; SHEGARFI et al, 2012). Há relatos recentes de infiltração de células NK e NKT no líquido sinovial de pacientes que sofrem de chikungunya crônico (HOUARAU et al., 2010; PAZM ANY, 2005), e a expressão de $\text{IFN-}\gamma$ $\text{TNF-}\alpha$ por essas células tem sido associada à cronicidade em chikungunya (THANAPATI et al, 2017).

Em modelos de artrite induzida por chikungunya em comundongos, níveis elevados de $\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ foram associados à inflamação artrítica (GARDNER et al, 2010). O $\text{TNF-}\alpha$ é um sinalizador precoce da resposta inflamatória local, funcionando no controle da mesma. Mas sua liberação excessiva provoca inflamação, dano tecidual secundário e mesmo desenvolvimento do choque séptico (TRACEY, 2002).

No ano 2000 foi descoberta a via anti-inflamatória colinérgica, um mecanismo parassimpático para inibir a liberação do TNF na inflamação (BOROVIKOVA et al, 2000). O SNC parassimpático secreta acetilcolina, neurotransmissor que inibe a liberação do $\text{TNF-}\alpha$ e outras citocinas (interleucinas 1, 6 e 18), conseqüentemente inibindo o processo inflamatório (PAVLOV, TRACEY, 2004; BOROVIKOVA et al, 2000).

A acetilcolina, não é sintetizada apenas na célula neuronal. Nos últimos anos tem sido demonstrado que vários tipos de células não neurais são capazes de expressar a gama de proteínas que formam um sistema colinérgico, ou seja, a enzima sintetizadora de acetilcolina (ACh), a colina acetiltransferase (ChAT), receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR), e as enzimas de hidrólise de ACh, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (Kummer et al., 2008). Assim, sistemas colinérgicos não neuronais foram identificados em tecidos humanos consistindo de células epiteliais, endoteliais e mesoteliais, bem como nas fibras musculares e células gliais, parenquimatosas e imunes (WESSLER et al., 2003).

A AChE hidrolisa especificamente e rapidamente a ACh, e sua função é crítica para encerrar as respostas colinérgicas. Já a BChE hidrolisa preferencialmente butiril- e succinil-colina, e pode substituir a AChE na eliminação da ACh quando a AChE está inibida ou ausente (MASSOULIÉ et al., 1993). No sangue, a AChE é encontrada principalmente nos eritrócitos enquanto a BChE é encontrada no plasma.

Ambas as enzimas apresentam alteração de suas atividades em várias condições clínicas, exercendo funções não neuronais, e intervêm em processos celulares importantes, como proliferação, diferenciação, apoptose e reconhecimento célula-célula, bem como no processo inflamatório (SOREQ and SEIDMAN, 2001). Apesar dos estudos da infecção por CHIKV, são escassos relatos na literatura da quantificação da acetilcolinesterase AChE ou da BChE (enzima que hidrolisa a acetilcolina) em indivíduos infectados por esse arbovírus, assim como nenhuma outra arbovirose. Um aumento da atividade dessas enzimas seria responsável direto por um rápido aumento do processo inflamatório oriundo do estímulo viral.

Diante do exposto, faz-se necessário ter uma melhor compreensão da ação e circulação desta arbovirose na população do estado do Maranhão, tendo em vista a gravidade que possíveis surtos podem provocar. Mas também buscar meios rápidos, baratos e eficazes de detectar rapidamente a possibilidade de desencadeamento de um processo inflamatório que pode se tornar crônico.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Arboviroses

Durante décadas, as arboviroses, doenças causadas por vírus que se disseminam por meio da picada de artrópodes infectados, como mosquitos e carrapatos, vêm gerando um grave problema de saúde pública (WILDER-SMITH, 2017). Nos últimos anos, a atual dinâmica de urbanização, globalização e mobilidade internacional tem promovido o surgimento de doenças transmitidas por artrópodes, principalmente Zika, dengue, febre amarela e chikungunya, gerando grandes surtos epidêmicos nos mais diversos pontos do globo terrestre, principalmente nas regiões em desenvolvimento (LOPES et al., 2014).

Em virtude do seu veículo de transmissão ser principalmente por mosquitos, os arbovírus, são considerados uma grave problema de saúde de âmbito mundial, uma vez que a distribuição desses mosquitos vetores como o *Aedes spp*, ocorre de forma extensa em quase todos os continentes, principalmente aqueles que situam-se nos trópicos e subtropicais do globo terrestre, podendo ser considerado endêmico em muitos países onde os meios climáticos junto com a falta de estrutura sanitária o favoreçam (STRUCHINER et al, 2015). Os vetores mais importantes de arbovírus em humanos são aqueles pertencentes aos gêneros *Culex* e *Aedes* (WEAVER; REISEN, 2010).

As infecções por arbovírus podem ter uma variedade de manifestações clínicas, desde febre leve e doenças indiferenciadas a certas síndromes do sistema nervoso, articulações e febre hemorrágica. Normalmente, as infecções mais graves são registradas apenas após grandes epidemias, que geralmente apresentam efeitos imprevisíveis sobre a morbidade e mortalidade como visto na epidemia da Ilha de Reunião (2005), e na Índia (2006) (QUATRESOUS, 2005; RAVI, 2006). Embora as manifestações clínicas nos portadores dessas arboviroses se confundam, há manifestações clínicas que são peculiares de cada arbovirose.

2.2. Dengue

A dengue é uma doença infecciosa febril causada por um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, transmitido principalmente pelo mosquito *A. aegypti* (BRASIL, 2019). O vírus da dengue apresenta quatro sorotipos diferentes, o DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4- e sua incidência ocorre principalmente em áreas tropicais e subtropicais (Ministério da Saúde. 2001; ANDRADE. 2010). No Brasil a dengue é considerada endêmica, tendo a circulação simultânea dos quatro sorotipos em todas as regiões do país, tendo o sorotipo DEN-2 mais prevalente apresentando sinais e sintomas semelhantes da DEN-1, DEN-3 e DEN-4 (OLIVEIRA et al., 2010; BACK; LUNDKVIST, 2013).

As manifestações clínicas apresentadas pela dengue variam de sintomas leves (forma clássica) a casos graves (dengue hemorrágica), sendo que este último na ausência de cuidados e com a evolução do quadro, casos fatais de dengue hemorrágica podem ocorrer em 4% dos infectados (MORAES et al., 2013).

Após a picada do mosquito fêmea infectado no homem, o tempo de latência, necessário para o surgimento dos sintomas, é em média de 5 a 6 dias com início abrupto de febre alta acompanhada de um ou mais sintomas como forte dor de cabeça, dor atrás dos olhos, perda do paladar e apetite, manchas e erupções na pele semelhantes ao sarampo, principalmente no tórax e membros superiores, náuseas e vômitos, tonturas, extremo cansaço, moleza, os pacientes também podem apresenta mialgia e leve artralgia, caracterizando a doença em seu estado clássico (BRASIL, 2001; WHO, 2009). Quanto à dengue hemorrágica, que é a forma grave da doença, é observado que nos primeiros dias de infecção os sintomas são semelhantes ao da dengue clássica, no entanto, entre o terceiro e o quarto dia com o controle da febre, há um agravamento da situação e o quadro evolutivo do paciente tende a piorar drasticamente com o aparecimento de manifestações hemorrágicas com sangramento na pele, gengivorragia e epistaxe, choques onde a pressão arterial e o pulso são imperceptíveis e problemas neurológicos (WHITEHORN; SIMMONS, 2011; FIOCRUZ, 2021).

A diferença ocorre quando acaba a febre e começam a surgir os sinais de alerta: Dores abdominais fortes e contínuas, vômitos persistentes, pele pálida, fria e úmida, sangramento pelo nariz, boca e gengivas, manchas vermelhas na pele, sonolência, agitação e confusão mental, sede excessiva e boca seca, pulso rápido e fraco, dificuldade respiratória e perda de consciência. Já o quadro clínico da dengue hemorrágica se agrava rapidamente, apresentando sinais de insuficiência circulatória e choque, podendo levar o paciente à morte em até 24 horas (VALLE et al., 2015).

O diagnóstico da infecção por este vírus é realizado com base em exames laboratoriais por meio de testes usando o material biológico do paciente, normalmente o sangue, onde é feito a pesquisa do material genético do vírus (LANCIOTTI et al., 1992), ou a presença de anticorpos das classes IgM e IgG para dengue (SHU, 2004), já que somente as manifestações clínicas podem ser inconclusivas, principalmente em regiões onde há circulação de outras arboviroses como CHIKV e ZIKV (MUSTAFA, 2015; MULLER et al., 2017).

2.3 Zika Vírus

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus emergente que pertence à família Flaviviridae, gênero Flavivirus e tem importância clínica no mundo por reunir patógenos humanos como o vírus da dengue (DENV sorotipos 1 a 4), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus do oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV). O ZIKV é transmitido por fêmeas de mosquitos *Aedes* (*Stegomyia*) spp., e recentes evidências sugerem que também possa ser transmitido por *Culex quinquefasciatus* (HAYES, 2009).

A infecção por este vírus também se dá pela forma congênita, pelo ato sexual, e possivelmente por transfusão sanguínea (VASCONCELOS, 2015). Estima-se que 80% das infecções de ZIKV são assintomáticas, os sintomas mais comuns são febre, cefaléia, mal-estar, erupção maculopapular, mialgia e artralgia, sendo por vezes confundido com os sintomas de DENV (GUEDES, 2017). Embora os sintomas comuns da infecção por ZIKV sejam leves, em alguns casos também ocorrem graves complicações neurológicas como

microcefalia em recém-nascidos e síndrome de Guillain-Barré em adultos (MACKENZIE, GUBLER, PETERSEN, 2004).

O diagnóstico da ZIKV pode ser feito com bases nos achados clínicos e laboratoriais, tendo o uso de técnicas parecidas na identificação de outras arboviroses como a detecção do material genético do vírus em tecidos e fluídos provenientes dos pacientes (LANCIOTTI, 2007) e identificação da presença de anticorpos contra o vírus (STAPLES et al., 2016).

2.4 Chikungunya

O gênero *Alfavírus*, apresenta diversos sorotipos agrupados com base em suas propriedades antigênicas (BURT et al., 2012), sendo o CHIKV pertencente ao complexo antigênico do vírus da floresta Semliki (SERGON et al., 2008). Estudos indicam que CHIKV é de origem africana, no qual diversas e distintas linhagens genéticas foram identificadas como a linhagem da África ocidental, a linhagem oriental, central e sul africano que inclui um genótipo asiático. (PAL, 2015; WICHIT et al., 2017). A diversidade de genótipos e a adaptação evolutiva do vírus ao mosquito vetor vêm sendo associados aos surtos mais frequentes observados desde os anos 2000 (KOGA et al., 2017).

O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus que apresenta um RNA de cadeia simples de sentido positivo, medindo aproximadamente 12 kb e contendo 2 sequências de leitura aberta (ORFs- opening reading frames) (SMITH et al., 2015). O vírion maduro de CHIKV contém duas glicoproteínas, a proteína de fusão E1 e a de ancoramento E2, a qual é gerada a partir de um precursor poliproteico p62-E1, pela clivagem proteolítica (SMITH et al., 2015). O genoma viral do CHIKV codifica 4 proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4) e cinco proteínas estruturais, sendo flanqueado por regiões não traduzidas com um tampão de N-metil guanossina 5' e uma cauda de poli-A, entre as quais residem duas ORFs (Figura 1) (PINTO et al., 2015).

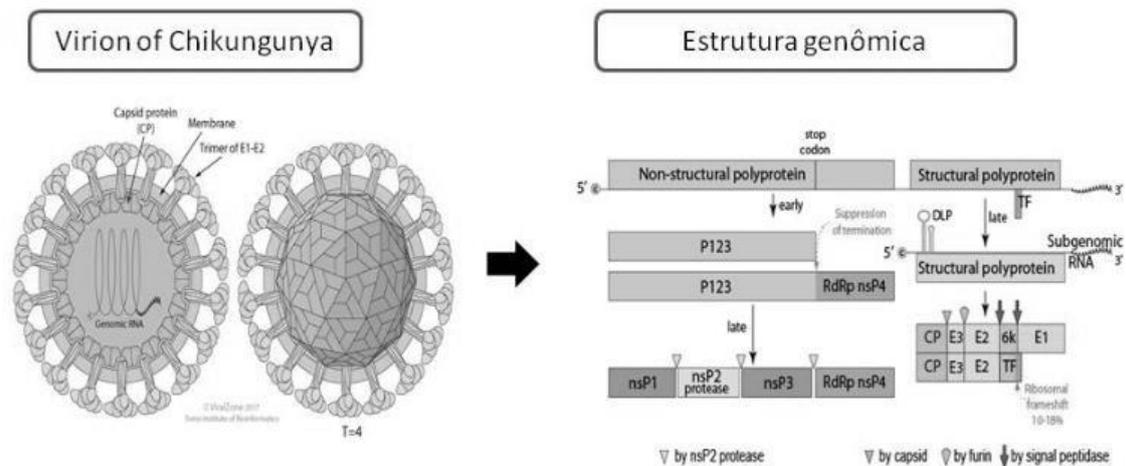


Figura 1. Representação da estrutura do vírus Chikungunya. Fonte: expasy.com / Viral Zone 2010 Swiss Institute of Bioinformatics.

2.4.1 ORIGEM DO CHIKV

O termo “Chikungunya” tem origem no idioma Makonde, falado em algumas áreas do sul da Tanzânia e norte de Moçambique, que significa “aquele que se dobra”, referindo-se à postura adquirida pelo paciente devido às severas artralgias (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). O CHIKV foi isolado em 1952, pela primeira vez, em paciente na Tanzânia, na África. A partir de então, diversas epidemias foram documentadas nessa região e no Sudoeste Asiático. Em 2004, no Quênia, aconteceu grande surto, atingindo prevalência de aproximadamente 75% da população (BURT et al., 2012).

No final de 2014 e início de 2015, serviços de vigilância epidemiológica de estados do Nordeste brasileiro relataram um surto de doença exantemática com quadro clínico caracterizado por exantema de início precoce, sem febre ou febre baixa, acompanhada de artralgia, edema articular e conjuntivite (SOUZA et al., 2019). Devido à presença de artralgia, a infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV) foi investigada e atestada por testes sorológicos e pela técnica de PCR (polymerase chain reaction) (SILVA et al., 2014). Contudo, casos autóctones de Chikungunya foram confirmados, em 2014, simultaneamente em

duas regiões: Norte, em Oiapoque / Amapá e, no Nordeste, em duas cidades (Feira de Santana e Riachão do Jacuípe-Bahia (TEIXEIRA et al., 2015; NUNES et al., 2015).

No mesmo ano, os casos da doença foram relatados em Brasília, Mato Grosso do Sul, Roraima e Goiás (HONÓRIO et al., 2015). Em 2015, o vírus se espalhou por todo o país, tendo o maior número de casos confirmados na Região Nordeste, onde o clima tropical é muito favorável ao desenvolvimento dos vetores. Pela análise dos casos diagnosticados no Nordeste brasileiro, pode-se inferir que a incidência dessa infecção viral está intimamente relacionada à proliferação vetorial e, conseqüentemente, às condições sanitárias da região (VU; JUNGKIND; LABEAUD 2017). No município de Natal, capital do Estado do Rio Grande do Norte, por exemplo, a maioria dos casos procedia da Zona Norte da cidade, onde apenas 5% da rede de esgotamento sanitário são adequadamente tratadas (VERSTEEG et al., 2016). Em Natal, os dados entomológicos apontam para presença significativa dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (POWERS; LOGUE, 2007).

Em 2016, da Semana Epidemiológica (SE) 1 a SE 52, foram registrados 271.824 casos prováveis de CHIK no Brasil, sendo confirmados 151.318 (55,7%) (BRASIL, 2017a). Em 2017, até a SE 52 (até 30/12/2017), foram registrados 185.737 casos de CHIK, com incidência de 90,1 casos/100 mil habitantes, dos quais, 151.966 foram confirmados (81,8%). A Região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis (142.131 casos; 76,5%) e a maior taxa de incidência (249,7/100 mil habitantes), com destaque para o Estado do Ceará, com 16 1271,0/100 mil habitantes (BRASIL, 2018).

Em 2018, até a SE 52, a Região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis de CHIK (52.966 casos; 60,4%) em relação ao total do país. Em seguida, aparecem as Regiões Centro-Oeste (13.862 casos; 15,8 %), Nordeste (11.287 casos; 12,9 %), Norte (9.315 casos; 10,6 %) e Sul (257 casos; 0,3 %) (BRASIL, 2018). No Brasil, a CHIK é uma doença de notificação compulsória, de acordo com a Portaria MS/GM nº 2.472, de 31 de agosto de 2010. A ocorrência de casos suspeitos pode indicar possível surto, portanto, as autoridades de saúde pública mais próxima devem ser imediatamente notificadas, de acordo

com as recomendações do Regulamento Sanitário Internacional (BRASIL, 2014).

2.4.2 EPIDEMIOLOGIA CHIKV

O CHIKV é um alfavírus originário da África, primeiramente isolado em 1952 no Planalto Makonde da província do sul da Tanzânia, antigo Tanganyika (THIBERVILLE et al., 2013). Após o isolamento do vírus, em 1953 sabe-se que o mesmo permaneceu circulante em ciclos silvestres na África, sendo a primeira reemergência documentada com sua introdução no sudeste asiático e na Índia, no ano de 2005, instalando-se em um ciclo esporádico de transmissão urbana que permanece atualmente (HONÓRIO et al., 2015). Esses surtos documentados estão associados a mutações no genoma viral do CHIKV que facilitaram a replicação do vírus em mosquitos *Ae. albopictus* (THIBERVILLE et al., 2013).

Em 2004, no Quênia, a segunda re-emergência do vírus ocorreu atingindo diversas ilhas do Oceano Índico, Índia e sudeste asiático. No ano de 2006, o vírus atingiu as Ilhas La Réunion, na África, sendo essa epidemia estudada por muitos pesquisadores devido ao surgimento de mutações virais levando a uma transmissibilidade mais eficaz pelo *Ae. Albopictus* (2015; FROS; PIJLMAN, 2016). Em outubro de 2013, o CHIKV alcançou o continente americano através do Caribe, resultando em milhares de infecções. Em maio de 2014 o Caribe apresentava mais de 100.000 suspeitos e 4.000 casos laboratoriais confirmados, e durante as duas semanas epidemiológicas seguintes, o número de casos reportados foi dobrado (SLAVOV et al., 2015).

Boletins epidemiológicos relacionados às arboviroses circulantes no Brasil são constantemente emitidos pelo site da Secretaria de Saúde. A dengue, a febre da Chikungunya e a febre pelo vírus Zika são doenças de notificação compulsória e estão presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, sendo que a febre pelo vírus Zika foi acrescentada a essa lista apenas pela Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016, do Ministério da Saúde (SINAN, 2017). Isso implica que quaisquer

casos suspeitos de infecção por uma dessas arboviroses devem ser cadastrados através de fichas individuais de 24 notificações e investigação em um banco de dados nacional denominado SINAN (Sistema de informação de agravos de notificação).

As fichas de cadastro utilizadas na notificação dessas doenças de agravo contêm informações importantes para estratégias epidemiológicas como sexo, área residencial (urbano ou rural), estado e município de residência, data dos primeiros sintomas, município, estado e país da infecção (para determinação de casos autóctones), além disso, informações relacionadas às características clínicas dos pacientes (SINAN, 2017). O SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) objetiva registrar os dados sobre agravos de notificação em todo o território nacional, fornecendo informações para análise do perfil da morbidade e contribuindo, desta forma, para a tomada de decisões em nível municipal, estadual e federal. Em 2014, a primeira transmissão autóctone foi detectada no Brasil, na cidade de Oiapoque (Amapá) (HONÓRIO et al., 2015).

O Brasil era um país considerado indene para o vírus da Chikungunya, o que indica que os habitantes não apresentavam memória imunológica para o mesmo (HONORIO, 2014). Além desse fator, suas características climáticas e ambientais associadas à ineficácia do controle dos mosquitos do gênero *Aedes*, garantiram que o vírus da Chikungunya encontrasse no Brasil um cenário de alta receptividade a sua disseminação (PANCETTI et al., 2015). Ao longo de 2014, 2.772 casos de CHIKV foram confirmados, distribuídos em seis Unidades Federativas: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1) (SVS, 2015). No ano de 2016 foram registrados no país 277.882 casos prováveis de febre Chikungunya (taxa de incidência de 133,0 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.829 municípios, dos quais 151.318 (55,7 %) foram confirmados, ocorrendo 196 óbitos (SVS, 2016). Em 2017, foram registrados 185.605 casos prováveis de CHIKV, com uma incidência de 90,1 casos/100 mil hab., destes, 151.101 (81,4%) foram confirmados, tendo a região Nordeste com o maior número de casos prováveis de chikungunya (142.006 casos; 76,5%) em relação ao total do país. Além terem sido confirmados laboratorialmente 168 óbitos em 2017 (SVS, 2017). Em 2019 foram 1.544 mil casos de dengue, 132 mil casos de chikungunya e mais de 10

mil casos de zika (SVS, 2020). Em 2020, o Brasil registrou mais de 900 mil casos de dengue, 82 mil casos de chikungunya e mais de 7 mil casos de zika (SVS, 2021).

Já em 2021, foram notificados 36.242 casos prováveis (taxa de incidência de 17,1 casos por 100 mil hab.) no país. Esses números correspondem a uma diminuição de 18,7% dos casos em relação ao ano de 2020. A região Nordeste apresentou a maior incidência com 29,1 casos/100 mil hab., seguida das regiões Sudeste (20 casos/100 mil hab.) e Norte (3,3 casos/100 mil hab (SVS, 2021).

2.4.3 GENÓTIPOS DO CHIKV

Foram descritos três genótipos do CHIKV: Asiático (As), Africano Ocidental (WAf) e Leste-Centro-Sul Africano (ECSA). O ECSA deu origem à linhagem Oceano Índico (IOL), responsável por epidemias nas ilhas do Oceano Índico, na Índia continental e na Europa, a partir de 2004 (VOLK et al., 2010). Durante isolamento viral, realizado em dezembro de 2005, na Ilha de Reunião que faz parte do território francês situada no Oceano Índico, a mutação A226V na glicoproteína E1 apareceu em mais de 90% dos casos (CAGLIOTI et al., 2013; TSETSARKIN et al., 2011; BURT et al., 2012). O genótipo predominante nas Américas é o genótipo Asiático (FERANDEZ; NAVARRO, 2015).

2.4.4. Estrutura viral

O Chikungunya é um arbovírus do gênero Alphavirus, pertencente à família Togaviridae, constituído por RNA (CAGLIOTI et al., 2013), pertence ao complexo antigênico da Floresta Semliki. Entre esses arbovírus capazes de causar doenças em seres humanos estão os vírus Mayaro, O'Nyong-nyong e Ross River (CLETON et al., 2012). O CHIKV é uma partícula esférica, com aproximadamente 70 nm de diâmetro, formada por um envelope composto por uma bicamada lipídica e 240 cópias da proteína do capsídeo. Nesse envelope, estão inseridos 80 espigões em forma de trímero, formados por glicoproteínas E1 e E2 (THIBERVILLE et al., 2013).

O vírus se liga a célula através da glicoproteína E2, incluindo peptídeo de fusão que medeia a entrada da nucleocapsídeo no citoplasma do endossoma (LEUNG et al., 2011). No centro do vírus, está o capsídeo que contém uma cadeia de RNA. Na superfície, localizam-se as glicoproteínas E1 e E2 do envelope, junto com a bicamada lipídica (FERNANDEZ; NAVARRO, 2015).

2.4.5. TRANSMISSÃO

A capacidade do mosquito de infectar outro hospedeiro suscetível é influenciada por alguns fatores intrínsecos (por exemplo, vetor e genética viral, competência vetorial e traços da história de vida do vetor) e extrínsecos (por exemplo, temperatura, chuvas e uso da terra), fatores que, por sua vez, influenciam a atividade do vírus e a biologia do mosquito, em muitos aspectos (KRAMER; CIOTA, 2015). O CHIKV é transmitido aos seres humanos por meio da picada mosquito fêmea do gênero *Aedes spp*, *Ae. albopictus* e, particularmente, *Aedes aegypti*, que é um dos vetores mais eficientes para arbovírus (COFFEY et al., 2014).

O *Ae. albopictus* é o segundo maior transmissor do CHIKV. Uma mutação associada a uma substituição de aminoácidos na glicoproteína envolvida (E1-A226V) permitiu ao vírus se adaptar melhor ao vetor, aumentando, assim, a capacidade de transmitir e disseminar o vírus (TSETSARKIN et al., 2007). Na epidemia por CHIK, ocorrida na Ilha da Reunião, em 2005-2006, destacou-se com o vetor *A. albopictus*, enquanto *A. aegypti* foi importante para disseminação do CHIKV na Índia (KRAMER et al., 2015).

A entrada, permanência e expansão dos mosquitos do gênero *Aedes* nas Américas está associada a fatores como desmatamentos, mudanças climáticas, ausência de água, saneamento básico, urbanização desorganizada e deslocamentos populacionais, os quais podem direcionar caminhos das doenças, sendo influenciada pelas adaptações genéticas dos vírus a hospedeiros, vetores, mutação viral e o novo ambiente (DONALISIO et al., 2017). Dois distintos ciclos de transmissão têm sido bem documentados: silvestre e urbano. Na África, o Alphavirus circula em complexos ciclos silvestres envolvendo vetores do gênero *Aedes* e primatas não humanos.

A transmissão no ciclo silvestre pode se espalhar infectando pessoas que moram próximas ao habitat silvestre. O mosquito silvestre, vetor do CHIKV, inicia uma transmissão inter-humana durante pequenos surtos. Epidemias ocorrem na África, quando o CHIKV é introduzido em áreas urbanas, onde vetores antropofílicos, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, podem iniciar transmissão homem-mosquito-homem. O CHIKV é capaz de iniciar transmissão em ciclo urbano sustentado que depende apenas do *Aedes aegypti* e/ou do *Aedes albopictus* e do homem como hospedeiro e amplificador do vírus (GALÁN-HUERTA et al., 2015). Outras espécies de mosquitos, de diferentes partes do mundo, têm a capacidade de transmitir CHIKV, incluindo: *Eretmapodites chrysogaster*, *Culex annulirostris* e *Anopheles stephensi* (COFFEY et al., 2014).

A transmissão através destes vetores está relacionada à distribuição geográfica e aos tipos de ciclos de transmissão (COFFEY et al., 2014). Existem casos documentados sobre a transmissão do CHIKV por outros mecanismos, além do vetorial, como a transmissão do vírus da mãe para criança, quando a gestante estiver infectada, levando, muitas vezes, a uma infecção neonatal grave e até óbito (GÉRARDIN et al., 2008). Também foram documentados casos por transmissão sanguínea, por meio da manipulação de sangue infectado por profissionais de laboratório. Essa possibilidade gera preocupação também na transfusão de sangue e a doação de órgãos para transplantes (PETERSEN et al., 2010; STAPLES et al., 2009). Outro estudo demonstrou a transmissão pela via ocular, o CHIKV foi detectado em quatro dos 12 doadores saudáveis de enxerto de córnea, demonstrando o risco potencial de transmissão durante o transplante de tecido (COUDERC et al., 2012).

2.4.6 FISIOPATOLOGIA DA CHIKV

Após período de incubação médio de dez dias, o mosquito torna-se capaz de transmitir o vírus a um hospedeiro suscetível, tal como um humano. Em humanos picados por um mosquito infectado, os sintomas da doença aparecem após um período de incubação intrínseco médio de 3-7 dias (intervalo 1-12 dias) (BRASIL, 2014). Após a picada do mosquito, os vírus atingem o nível

intradérmico e entram nos capilares subcutâneos. Depois da replicação inicial no nível das células que são suscetíveis, como fibroblastos e macrófagos (CHEN et al., 2014). Posteriormente, migram pela corrente sanguínea para o fígado, músculos, articulações e cérebro (MATUSALI et al., 2019).

Durante a primeira semana de infecção, a carga viral pode atingir 10⁹ cópias/mL no sangue. A viremia no hospedeiro vertebrado pode durar dois a 10 dias após a infecção (KAM et al., 2009; PANNING et al., 2008). Ainda podem ocorrer alguns eventos patológicos subclínicos, como apoptose de hepatócitos (no fígado) e adenopatia (nos órgãos linfoides), enquanto a dor muito forte e a evolução para artrite, em alguns casos, estão associadas à infiltração de células mononucleares e replicação viral nos músculos e articulações (KOHLENER et al., 2018).

Após a formação do endossoma, a alteração no pH promovem mudanças nas proteínas do envelope do vírus, acarretando a fusão da membrana viral com a membrana endossomal. Depois do RNA viral ser liberado dentro da célula hospedeira, é traduzido para formar as quatro proteínas do complexo de replicação viral (nsP1-nsP4), em seguida, ocorre a síntese do RNA sub-genômico e genômico, o RNA sub-genômico por sua vez é traduzido nas proteínas estruturais da cápside, pE2 (precursor de E2 e E3), E1 e 6K, que se associam para formar a nucleocapsídeo, incorporando o RNA genômico durante o processo de maturação (LEUNG et al., 2011). As proteínas precursoras de envelope são transportadas para o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, onde são submetidas a modificações pós-transducionais para formar o heterodímero E-E2 (BROECKEL et al., 2015) (Figura 2). Essas proteínas são transportadas para membrana celular do hospedeiro para formar picos de envelope viral. O vírus é, então, liberado da célula hospedeira, através do processo de brotamento (Figura 2).

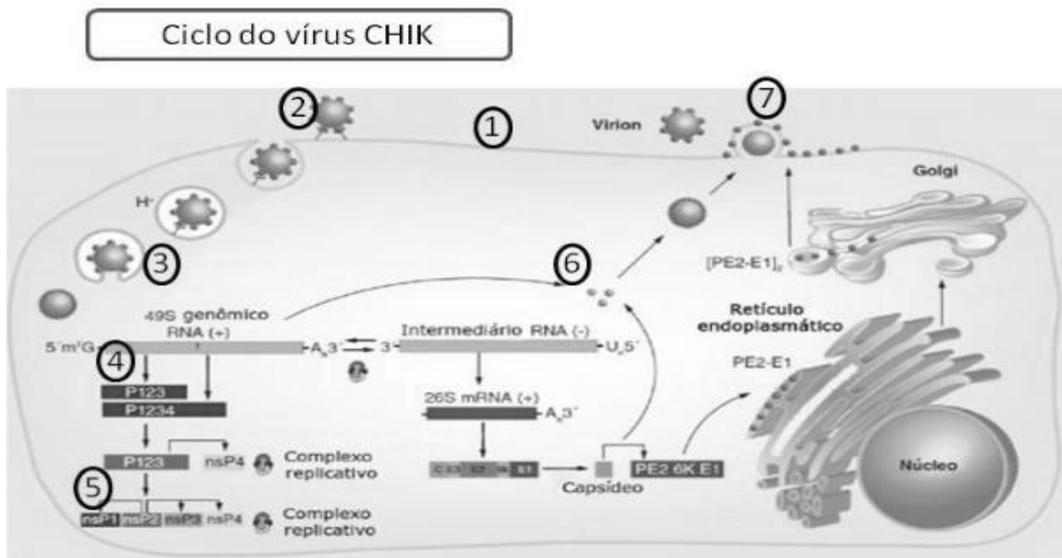


Figura 2. Ciclo do vírus CHIK na célula. 1: célula do hospedeiro. 2: endocitose. 3: fusão de membranas. 4: tradução. 5: processamento. 6: empacotamento do genoma viral. 7: brotamento de novas partículas virais. Fonte: Adaptado de MOTA *et al.*, 2015.

Estudos, nos anos 1960-1980, mostraram que o CHIKV cresce em painel de linhagens celulares não humanas, incluindo células Vero, células embrionárias de galinha, BHK21 e L929 células semelhantes a fibroblastos e HEp-2 células hepáticas (GLASGOW, 1966; RINALDO *et al.*, 1975).

Em experimentos de cultura de tecidos humanos, o vírus se replica em várias células aderentes, como células primárias e linhas celulares epiteliais e endoteliais, fibroblastos e, em menor grau, monócitos. O início da doença coincide com o aumento da viremia na circulação desencadeando a ativação de resposta imune inata, com produção de interferons (IFNs) tipo I (SOURISSEAU *et al.*, 2007; SOLIGNAT *et al.*, 2009). Os pacientes eliminam o vírus uma semana após infecção, e somente neste momento, há evidência de imunidade adaptativa específica ao CHIKV (isto é, respostas mediadas por células T e anticorpos) (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A resposta inflamatória resultante coincide com a produção de mediadores imunes e infiltração de articulações e tecidos circundantes por células imunes (BURT *et al.*, 2017).

2.4.7 ASPECTOS CLÍNICOS DA CHIKV

A infecção por CHIKV é caracterizada como doença reumática debilitante associada à inflamação, dor articular e destruição de tecidos musculoesqueléticos. A artrite é mais frequentemente simétrica, na fase aguda (SIMON *et al.*, 2015). A infecção, geralmente, é autolimitada e os sintomas agudos, geralmente, se resolvem em uma semana, no entanto, a dor articular pode persistir por anos (COUTURIER *et al.*, 2012). A doença causada pelo CHIKV pode evoluir em três fases: aguda, pós-aguda e crônica. A fase aguda tem duração de até duas semanas. Caso as dores articulares persistam, caracteriza-se o início da fase pós-aguda, que pode durar até três meses. Quando os sintomas ainda persistirem, tem início a fase crônica. Ainda podem ocorrer as manifestações atípicas da CHIK, casos em que não apresentam febre, nem dor articular, afetando diversos órgãos e sistemas do corpo humano.

2.4.7.1 FASES CLÍNICAS DA CHIKV

A fase aguda é, geralmente, caracterizada pela tríade clássica: febre, artralgia intensa e erupções cutâneas (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012). A febre que ocorre repentinamente pode ser contínua, intermitente ou bifásica, de curta duração (BRASIL, 2017b). A artralgia que ocorre nos dias iniciais da doença está em quase 100% dos pacientes e pode desenvolver artrite progressivamente dentro de poucos dias. As manifestações cutâneas são observadas com frequência variável, envolvem, principalmente, rosto, tronco e extremidades. Essas manifestações, comumente, aparecem após a artralgia e a mialgia, entre o segundo e o quinto dia após o início da doença, persistindo por dois a três dias (KUCCHARZ; CEBULABYRSKA, 2012). Exantemas maculares e maculopapulares, eritema difuso, com ou sem prurido, e edema facial são as apresentações mais comuns.

Outros tipos de lesões cutâneas também podem ser observados nesta fase aguda, como vesículas, bolhas, dermatite esfoliativa, eritema nodoso, hiperpigmentação, fotossensibilidade, exacerbação de dermatoses existentes,

como psoríase e úlceras, envolvendo a mucosa oral (BORGHERINI et al., 2008). Nessa fase, ainda podem aparecer outros sintomas, como dor de cabeça, confusão transitória, fadiga, calafrios, náuseas, vômitos, anorexia, dor nas costas, conjuntivite e outras manifestações oculares (KUCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012).

Na fase pós-aguda as manifestações clínicas iniciais perduram por até três meses, com exceção da febre que normalmente desaparece após os primeiros 15 dias após a infecção. Nessa fase os pacientes apresentam apenas pequenas melhoras, de curto período de tempo, tendo após, novas recidivas como as dores articulares, por exemplo, (CUNHA; TRINTA 2017). Alguns pacientes também apresentam astenia, exantema maculopapular além de desenvolver fadiga, artralgia crônica e depressão em virtude do convívio com as fortes dores (BVS, 2017).

Já na fase crônica há uma persistência dos sintomas articulares, musculoesquelética e neuropáticas nos pacientes, sendo que cerca de 40 a 80% deles adentram na cronicidade por CHIK (SISSOKO et al., 2008). As dores articulares dessa fase se assemelham aos da artrite reumatoide e normalmente o acometimento é poliarticular e simétrico. Além das dores articulares outras manifestações também foram descritas como fadiga, cefaleia, prurido, alopecia, exantema, bursite e tenossinovite (CUNHA; TRINTA 2017).

2.4.8. DIAGNÓSTICO

A infecção por CHIKV é diagnosticada com base em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Início agudo de febre e artralgia intensa ou artrite que não é explicado por outros distúrbios, é considerado como possível caso de CHIK. O caso torna-se provável se o paciente viveu ou visitou áreas epidêmicas, sendo confirmado quando é positivo em pelo menos um teste laboratorial (WHO, 2009). Os testes biológicos irão depender do estado clínico do paciente. Em casos dos sintomas atípicos, desfecho complicado ou anormal, é necessária diferenciação de diagnósticos para sepse, dengue (possível coinfeção), malária, leptospirose, reações imunológicas pósestreptocócicas e outras

infecções primárias virais, necessitando realizar exames laboratoriais adicionais (SIMON *et al.*, 2015).

As amostras clínicas utilizadas para o diagnóstico podem ser: sangue, plasma, soro, líquido cefalorraquidiano (LCR), saliva e urina. As amostras destinadas ao isolamento viral e à pesquisa de RNA devem ser mantidas em freezer -70°C até o uso. Amostras para sorologia podem ser mantidas a -20°C . O descongelamento repetido dessas amostras deve ser evitado (BRASIL, 2017b). O diagnóstico laboratorial confirmativo da infecção pelo CHIKV baseia-se no isolamento viral, na identificação de RNA viral através de técnicas moleculares, como RT-29 PCR, em tempo real e a detecção de anticorpos IgM e IgG, por meio de testes sorológicos, utilizando ensaios imuno-absorventes enzimáticos (ELISA) e/ou testes imunocromatográficos rápidos.

O tipo de teste escolhido dependerá do tempo decorrido entre o início dos sintomas e dia da coleta da amostra (Lo PRESTI *et al.*, 2014). A técnica de Isolamento viral utiliza replicação viral, produzida através de cultura em células, permitindo isolamento destas. É feita em mosquitos coletados no campo ou em amostras de soro na fase aguda (≤ 8 dias). O soro obtido de sangue total colhido durante a primeira semana de doença deve ser transportado refrigerado (entre 2°C - 8°C ou gelo seco) o mais rapidamente possível, dentro de 48 horas, para o laboratório para ser inoculado em linhagem de células sensíveis ou uso de camundongos (PAHO, 2011). CHIKV produz efeito citopático nas células hospedeira, mudando a sua morfologia em, aproximadamente, três dias, quando inoculado em variedade de tipos celulares.

A confirmação do isolamento de CHIKV pode ser através de imunofluorescência ou RT-PCR. Embora o isolamento viral seja método altamente específico, o tempo necessário para obter resultados é longo (BRASIL, 2014). Apesar de ser considerado o padrão ouro para detecção, o isolamento viral feito em linhagens celulares não é considerado ideal para diagnóstico precoce, devido ao custo e o tempo (WEAVER *et al.*, 2016).

2.4.8.1 SOROLOGIA

Pacientes infectados com CHIKV respondem com a produção de anticorpos na fase inicial da doença, podendo ser detectadas concentrações de imunoglobulina M (IgM) de três a oito dias após o início dos sintomas e pode persistir por meses até dois anos, bem como imunoglobulina G (IgG) anti-CHIKV, neutralizantes, detectada a partir de quatro a dez dias do início dos sintomas e podem persistir por anos e, possivelmente, pelo resto da vida. Os anticorpos são importantes para depuração da infecção viral. Os anticorpos neutralizantes persistem por pelo menos 21 meses e, provavelmente, por anos, protegendo contra novas infecções por CHIKV (BURT *et al.*, 2017; WERVER; LECUIT, 2015). Diferentes kits imunocromatográficos comercialmente disponíveis podem detectar os anticorpos IgM para CHIK.

Técnicas com uma melhor a utilizam o vírus completo como antígeno, comparada àquelas que usam proteínas recombinantes (PAHO, 2011). O soro obtido a partir de sangue total é utilizado em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e teste de neutralização por redução de placas (PRNT). PRNT é necessário para confirmar a MAC-ELISA, uma vez que a reatividade cruzada no MAC-ELISA entre alguns dos membros do sorogrupo do vírus da Floresta de Semliki (SFV) foram observados (por exemplo, o vírus Mayaro). Em situações em que o ensaio PRNT não está disponível, outros testes sorológicos, por exemplo, inibição da hemaglutinação (HI), podem ser usados para identificar infecção por alfavírus; no entanto, o PRNT é necessário para confirmar infecção recente por CHIKV (PAHO, 2011).

Outra estratégia para confirmação laboratorial é a sorologia pareada. Neste caso, duas amostras devem ser coletadas, a primeira na fase aguda da doença e a segunda, aproximadamente, 15 dias após a primeira. O aumento de quatro vezes no título dos anticorpos demonstra a reatividade específica (BRASIL, 2017b). A reação da cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular empregada para obter-se a amplificação exponencial de pequenas quantidades de DNA *in vitro*, empregando elementos do processo natural de replicação do DNA. A PCR de transcriptase reversa (RT-PCR) é

utilizada para amplificação do RNA, necessária para síntese de DNA complementar. Nessa técnica a fita de DNA complementar sintetizada servirá de molde para reação da cadeia da polimerase (HUGGETT *et al.*, 2005).

Trabalhos utilizando RT-PCR em tempo real para detectar RNA do CHIKV foram descritos, visando identificar o gene NSP1 ou E1. Estes testes moleculares são capazes de detectar o RNA viral somente durante a fase virêmica em pacientes, que geralmente dura do dia zero ao dia seis, após a infecção (PASTORINO *et al.*, 2004; PASTORINO *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2018). A RT-PCR pode ser projetada em ensaio multiplex para detectar outros arbovírus, o que pode ser útil para triagem de pacientes, sobretudo, em áreas de cocirculação viral (WEAVER; LECUIT, 2015). Ao considerar a sensibilidade, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) recomenda o uso de protocolos do RT-PCR CHIKV do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e do Instituto Pasteur.

Soro e líquido são utilizados para os testes de Reação de Cadeia da Polimerase (RT-PCR), assim como o isolamento do vírus (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). Com a reação da RT-PCR do vírus CHIK, é possível obter o diagnóstico mais rápido e preciso do vírus. Em geral, a sequência dos testes realizados é: RT-PCR entre o dia 0 e 5, RT-PCR e sorologia entre os dias 5 e 7, somente a sorologia após 7 dias com a pesquisa de anticorpos; já a cultura viral não é realizada rotineiramente. Por outro lado, além desses testes outros podem servir como auxiliares no diagnóstico como a dosagem de proteínas relacionadas a infecção viral que podem servir até mesmo como marcadores de prognóstico de doenças inflamatórias como no caso das colinesterases.

3. AS COLINESTERASES COMO MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Além das células neuronais, muitas outras células, como as do sistema imune (macrófagos, linfócitos, micróglia, etc), são capazes de expressar o sistema colinérgico completo, conhecido como sistema colinérgico não-neuronal (HALDER; LAL, 2021). Esse sistema é constituído pelo neurotransmissor acetilcolina (ACh), receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos

(mAChRs), enzima colina acetiltransferase (ChAT) e as enzimas hidrolíticas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (REALE; COSTANTINI, 2021).

O sistema nervoso colinérgico tem efeitos moduladores na produção de múltiplas citocinas inflamatórias, através da via antiinflamatória colinérgica. A presença de patógenos e danos teciduais periféricos induzem a liberação de citocinas no sítio inflamatório, as quais estimulam o sistema nervoso autônomo parassimpático através de projeções axonais das fibras aferentes sensoriais do nervo vago. No núcleo do trato solitário do cérebro ocorre, então, a ativação da via vagal eferente. Ao ser ativado, o nervo vago secreta ACh, que pode interagir e ativar os nAChRs e produzir efeito supressor da produção de citocinas pró-inflamatórias (D'ELIA et al., 2013).

Dentre os subtipos de nAChRs, o receptor alfa 7 ($\alpha 7$ nAChR) é o mais proeminente devido a sua alta expressão em células do sistema imune (células B, macrófagos, micróglia, células T e células alvo) e sua associação com imunidade humoral e intrínseca. A ativação do $\alpha 7$ nAChR inibe a ativação da via NF- κ B e a produção de citocinas pró-inflamatórias (especialmente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18). Essa via antiinflamatória colinérgica representa, portanto, um alvo neuroimune para as doenças inflamatórias crônicas (COURTIES et al., 2020),

As colinesterases (ChEs; EC 3.1.1.x) são enzimas do grupo da superfamília das α/β hidrolases (NARDINI; DIJKSTRA, 1999), presentes nos tecidos colinérgicos e não colinérgicos, bem como no plasma e outros fluidos corporais. Este grupo de enzimas é dividido em duas categorias distintas, de acordo com seu substrato específico, comportamento na presença de substrato em excesso e suscetibilidade a inibidores (ÇOKUGRAS 2003). A acetilcolinesterase (AChE) é uma colinesterase específica, que hidrolisa a acetilcolina (ACh) e apresenta níveis elevados no tecido nervoso e nos eritrócitos (SOREQ; SEIDMAN 2001, das, 2007). A butirilcolinesterase (BChE) (também chamada pseudocolinesterase) é uma colinesterase não específica, que catalisa a hidrólise da ACh, e de outros ésteres como succinilcolina e butirilcolina, (ÇOKUGRAS 2003, DARVESH et al. 2003); e apresenta níveis elevados no plasma sanguíneo, pâncreas, fígado e sistema nervoso central (KAPLAY, 1976).

Considerando a capacidade hidrolítica da BChE, um aumento na atividade da BChE resultará em níveis reduzidos de ACh sérica e tecidual, com consequente interrupção da resposta antiinflamatória colinérgica, o que amplificaria a inflamação sistêmica, criando um círculo vicioso (DAS, 2007).

Os níveis de BChE são diretamente influenciados pelo processo inflamatório, tendo sua atividade diminuída na fase inflamatória aguda e aumentando rapidamente quando a inflamação reduz (HUBBARD, 2008). Alguns autores têm mostrado que a atividade dessa enzima está bastante aumentada no início do processo inflamatório e bastante reduzida na inflamação sistêmica. Inclusive, durante a inflamação sistêmica, níveis muito reduzidos de BChE indicam inflamação sistêmica severa (ZIVKOVIC et al., 2015). Níveis elevados de BChE em portadores de diabetes (CWIERTNIA et al, 2010; DAS, 2012; GUIMARÃES et al, 2014) também foram descritos. Já a sua atividade reduzida no plasma inferiu um menor tempo de sobrevida em pacientes com câncer de pâncreas (KLOCKER et al, 2020), prognóstico de tumor avançado no câncer cervical (POETSCH et al, 2020) e recentemente foi relatado que em pacientes com pneumonia associado ao Covid-19, o nível de BChE está significativamente associado a gravidade e mortalidade, sendo mais baixo no grupo de morte que no de sobrevida (KUNUTSOR;LAUKKA, 2020).

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar os aspectos clínicos, moleculares e epidemiológicos da Chikungunya na população do estado do Maranhão

.

4.2 Específicos

- Descrever os aspectos sociodemográficos da população das regiões de saúde do Estado do Maranhão;
- Pesquisar os vírus Chikungunya em humano no Estado do Maranhão;
- Investigar as formas clássicas e graves por Chikungunya;
- Conhecer os aspectos epidemiológicos e clínicos do vírus Chikungunya das regiões de saúde do Maranhão;
- Avaliar a atividade das colinesterases no sangue de portadores do CHIKV;
- Analisar a relação entre a variável sociodemográfica e clínica nas arboviroses identificadas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho foram o Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB); Fosfato de Sódio Monobásico; Fosfato de Sódio Bibásico; Iodeto de Acetilcolina; Iodeto de Butirilcolina; Triton X-100; Tetraisopropilpirofosforamida (Iso-OMPA); Reagente de Bradford. Todos adquiridos da Sigma (Merck group) Brasil

Solução A: Fosfato de sódio monobásico 0,2 M; Solução B: Fosfato de sódio bibásico 0,2 M; Solução tampão Fosfato 0,1 M pH 7,4 (20 mL solução A + 80 mL Solução B + água ultra pura q.s.p. 200 mL). Reagente de Ellman (DTNB) 0,01 M; Solução de lise Triton X-100 0.034%; e Iodeto de Acetilcolina 5 mM; Iodeto de Butirilcolina 10 mM, Tetraisopropilpirofosforamida (Iso-OMPA) 10 mM; Solução de sangue total (Sgt) a 2% em tampão de lise; Solução de eritrócitos (RBC) a 2% em tampão de lise e Solução de plasma a 20% em tampão fosfato pH 7.4.

5.2 PACIENTES E AMOSTRAS

Foram coletados em tubos vacutainer contendo EDTA e em tubos vacutainer contendo gel separador, o sangue venoso periférico de 179 pacientes com suspeita de Chikungunya oriundos dos municípios de Santa Inês (48 amostras), Raposa (31 amostras), Paço do Lumiar (24), São José de Ribamar (27), Vargem Grande (19 amostras) e São Luís (30). Todos os pacientes antes da realização da coleta foram esclarecidos sobre a pesquisa e sua importância para o nosso Estado. Logo após, assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assim responderem um questionário sociodemográfico e clínico referente à pesquisa. Os critérios de inclusão foram com base nas manifestações clínicas onde eram observadas as principais características da doença Chikungunya como febre, dor muscular e articular, a idade dos pacientes, onde a idade mínima aceitável era de 18 anos. Já os

critérios de exclusão foram relacionados a manifestações clínicas e o diagnóstico laboratorial confirmado para outras doenças desencadeadas pelo mosquito *Aedes Aegypti* como a Dengue e Zika e o uso de pesticidas. Também foram coletadas amostras de sangue de pacientes que nunca foram diagnosticadas com Chikungunya para servirem de nosso controle, sendo ao todo 30 amostras provenientes do município de São Luís – Ma. A coleta procedeu no período de dezembro de 2019 a fevereiro de 2021. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Maranhão – UFMA, com o parecer 3.428.814.

5.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Amostras dos municípios de São José de Ribamar, Raposa e Paço do Lumiar foram transportadas em galerias, acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo reciclável e enviadas para serem processadas no Laboratório de Cultura de Células (LCC) do prédio de Pós-Graduação em Saúde do Adulto – UFMA. Um mililitro (mL) das amostras, correspondendo ao sangue total, foi aliquotado em tubos Eppendorf de 1,5 ml e armazenados no freezer a -80 °C. O volume restante das amostras foi centrifugado e o plasma foi separado dos eritrócitos e armazenado no freezer a -80 °C. Os eritrócitos foram lavados em solução tampão fosfato a 0,1 M em pH 7,4 na proporção de 1:5 (v/v) e em seguida recentrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos. Logo após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o concentrado de eritrócitos foi congelado a -18 °C até o uso. Já as amostras de Vargem Grande e Santa Inês foram processadas (seguindo o mesmo procedimento acima) e armazenadas no freezer -18 °C por aproximadamente sete dias até seu envio para a Universidade Federal do Maranhão em São Luís, para serem guardadas no freezer -80 °C até seu uso. Todavia, os eritrócitos dos pacientes do município de Santa Inês e Vargem Grande não foram lavados em virtude da falta de solução tampão fosfato.

Para o teste, a concentração dos eritrócitos foi de 2% lisado em tampão de lise Triton X-100 a 0.034%. O sangue total foi diluído a 2% em solução

tampão fosfato a 0,1 M em pH 7.4 e em tampão de lise Triton X-100 a 0.034%, já o plasma foi diluído a 20% em tampão fosfato a 0,1 M em pH 7.4. As diluições preparadas (1 ml de cada amostra), foram refrigeradas até ser realizado o teste na placa de 96 poços.

5.4 ENSAIO ENZIMÁTICO

A atividade das colinesterases do sangue total, dos eritrócitos e do plasma, foi determinada pelo método de Ellman et al. (1961), modificado para microplacas em triplicata. O ensaio foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços em um volume de reação final de 200 µl composto da seguinte forma: DTNB 0.32 mM; Amostra: 0.2% Sgt, ou 0.2% RBC ou Plasma 2%; e, dez minutos depois, adição do substrato (ATCI 0,5 mM ou 1,0 mM BTCl) . Foi realizada a curva de inibição da BChE com inibidor específico, tetraisopropilpirofosforamida 1, 0 mM (Iso OMPA) e, posteriormente, o sangue total era inibido com Iso OMPA 300 uM;. A atividade enzimática (absorbância / min) foi determinada por subtração dos valores de branco do valor de cada atividade, e expressa como a mudança no desvio óptico em 450 nm.

5.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO CHIKV

Para o diagnóstico por biologia molecular, foi realizada a extração do RNA total utilizando o kit comercial de extração e purificação de RNA QIAMP Viral Mini Kiti (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), seguindo as recomendações do fabricante para posterior realização da qRT-PCR.

A extração do RNA total das amostras consiste em quatro etapas: lise celular, ligação do RNA a coluna de sílica gel, lavagem e eluição do RNA. No primeiro momento 140 uL das amostras foram incubados com tampão de lise AVL e 5,5 uL de RNA transportador, por 10 minutos para o rompimento celular e liberação dos ácidos nucleicos. Logo após foi adicionado etanol absoluto P.A e, depois, as amostras foram aplicadas em uma coluna contendo uma membrana de sílica gel que irá segurar o RNA viral. No intuito de purificarmos esse RNA retido na coluna de sílica gel, foi realizada a centrifugação e a lavagem com os

tampões AW1 e AW2. Feito isso, realizamos a última etapa, eluição, liberação do RNA viral da membrana de sílica gel, por meio da adição de 60 μ M do tampão AVE e posterior centrifugação. Após a extração o RNA viral foi armazenado em freezer -80 para a utilização.

Para a qRT-PCR, foi utilizada a metodologia descrita por Lanciotti et. al. (2007). O uso dessa metodologia fez-se necessária uma sonda VCHIK 6919P (Applied Biosystems™) marcada com fluorescência, um *primer* iniciador direto VCHIKV 6856F e um inverso VCHIK6981R (Invitrogen) e a sequência de interesse. Além dos *primers* também utilizamos o sistema TaqMan FAST Vírus 1 Step Master Mix (Applied Biosystems) para hibridização de sequências específicas do material genético de interesse. Com isso, os reagentes foram distribuídos em uma placa de 96 poços, com volume final de 15 μ L da mistura com o acréscimo de 5 μ L do RNA extraído na primeira etapa. Para a leitura desse experimento foi utilizado o equipamento ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo as condições de termociclagem descrita por Lanciotti et. al. (2007).

5.6 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Placas COSTAR 3590 de alta afinidade (Corning Inc., EUA) foram sensibilizadas com 20ng por poço de NS1 de ZIKV, DENV1, DENV2, DENV3 ou DENV4, ou 25ng por poço de E2 de CHIKV (Meridian Life Science, EUA) em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) em temperatura de 4°C *overnight*, e depois bloqueadas com tampão PBS-Tween 20® 1,0% por uma hora. As amostras foram diluídas na concentração de 1:400 em tampão de diluição PBS-Tween 20® (Amresco Inc. EUA) 0,1% e dispostas na placa em duplicata. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por uma hora, no ELISA para detecção de IgG total.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com tampão de lavagem PBS-Tween 20® 0,1%. Anticorpos anti-IgG humanas conjugados com peroxidase (Rockland, EUA) foram utilizados como anticorpos

secundários, diluídos na concentração de 1:2000 no mesmo tampão de diluição utilizado para as amostras. Os anticorpos secundários foram incubados por uma hora em temperatura ambiente. Após a incubação dos anticorpos secundários, as placas foram novamente lavadas 5 vezes com tampão de lavagem. A reação foi revelada utilizando solução de ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS; Sigma-Aldrich, EUA), tampão citrato-fosfato (70 mM, pH 4,2) e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, EUA). As reações foram desenvolvidas por 15 minutos e depois interrompidas com solução de 5% de dodecilsulfato de sódio (SDS; Research Products International, EUA). As placas foram lidas em comprimento de onda de 405nm, com onda de referência de 630nm.

Para calcular os resultados, consideramos a média das absorbâncias das duplicatas como valor definitivo da leitura de cada amostra. Três controles negativos foram usados para cada placa. Como controles negativos, amostras de indivíduos assintomáticos residentes de área não endêmica para ZIKV, DENV ou CHIKV foram utilizadas. O *cut-off* da reação foi calculado como a média das absorbâncias dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão dessas médias, com intervalo de confiança de 95%, como recomendado (FREI; ZURAKOWSKI, 1998). Nós estabelecemos como zona de indeterminação todas as leituras contidas na faixa de 10% acima ou abaixo do valor do *cut-off*. Para normalizar os resultados das várias placas testadas, nós calculamos o valor da OD relativa (rOD) de cada amostra, como a razão entre a média das absorbâncias de cada amostra e o valor de *cut-off* da respectiva placa.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise estatística descritiva utilizando o software GraphPadPrism 7 (GraphPad software®, San Diego, CA, EUA), sendo os dados apresentados na forma de figuras e tabelas. Para verificar associação entre as variáveis sociodemográficas e clínicas será utilizado o teste χ^2 (Qui-quadrado), sendo considerado estatisticamente significativo os valores de $p \leq 0,05$. Para as enzimas, os valores de inibição foram calculados por meio de regressão não linear com o software GraphPadPrism 7 (GraphPad software®, San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Dados epidemiológicos e sociodemográficos

De 2019 a 2020, o Maranhão registrou 706 casos prováveis de chikungunya, sendo que, em 2020 houve uma redução de 74,8% dos casos se comparado a 2019. Esta redução pode ser atribuída ao enfrentamento da pandemia do coronavírus (covid-19), por parte das equipes de vigilância epidemiológica estaduais, o que ocasionou atraso ou subnotificação das arboviroses nos Estados brasileiros. Além do receio de boa parte da população de procurar atendimento em uma unidade de saúde durante esse período. Figura 3.

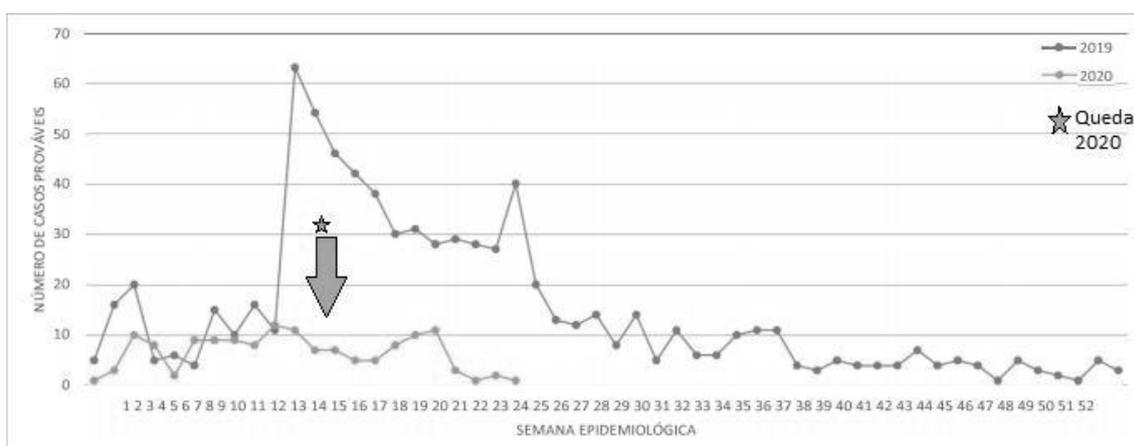


Figura 3. Curva epidêmica dos casos prováveis de chikungunya nos anos de 2019 e 2020 no Maranhão. Fonte: Adaptado, Sinan Online, 2020.

O que aconteceu no Maranhão não foi diferente do restante do país, uma vez que essa redução também é vista na curva epidemiológica divulgada pelo Ministério de Saúde como podemos ver na Figura 4.

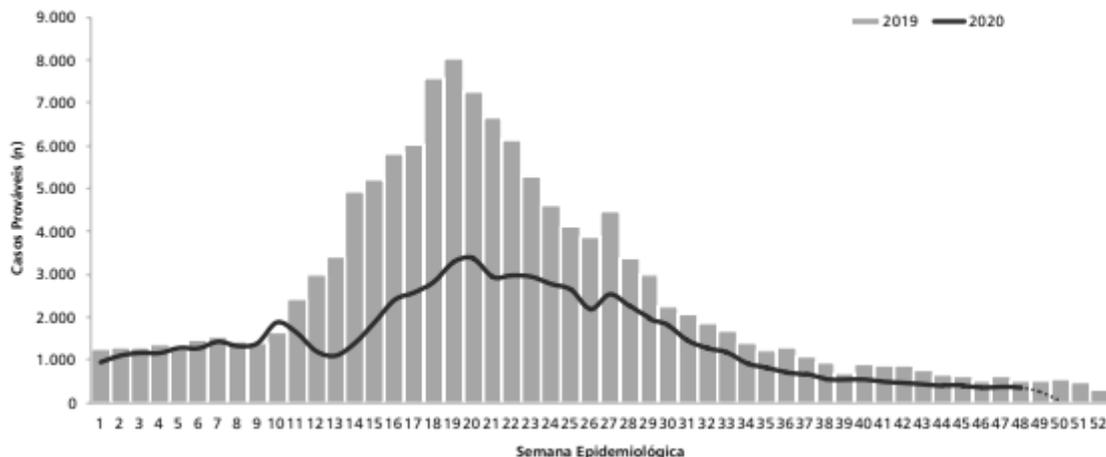


Figura 4. Curva epidemiológica da chikungunya no Brasil em 2019 e 2020.

Fonte: Sinan Online, 2020.

Com isso, amostras de 179 pacientes com suspeita de arboviroses foram coletadas nos hospitais dos municípios de São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Santa Inês e Vargem Grande, do Estado do Maranhão, durante os anos de 2019 e 2020. Municípios pertencentes às Regiões de Saúde Metropolitana, Santa Inês e Itapecuru, respectivamente.

Observou-se que o sexo feminino foi o mais frequente com 105 (59%), e isso pode ser explicado já que as mulheres buscam mais os serviços de saúde dos que os homens. E se tratando de confirmação de diagnóstico por arbovirose, as mulheres são mais frequentes uma vez que testes e exames laboratoriais são solicitados no período gestacional, e como vimos algumas arboviroses estão correlacionados a doenças congênitas como no caso da ZIKV (RODRIGUES *et al.*, 2018).

A maior parte dos participantes se declarou do grupo casado 98 (54%), do grupo parda 147 (82%), com o ensino médio completo 62 (35%) Tabela 1.

Tabela 1. CARACTERIZAÇÃO SOCIODEMOGRÁFICA		
CARACTERÍSTICAS	N =	FREQUÊNCIA %
ESTADO CIVIL		
SOLTEIRO (A)	75	42%
CASADO (A)	98	54%

VIÚVO (A)	3	2%
DIVORCIADO (A)	3	2%
ESCOLARIDADE		
ANALFABETO (A)	10	6%
E. FUNDAMENTAL INCOMPLETO	18	10%
E. FUNDAMENTAL COMPLETO	37	20%
E. MÉDIO INCOMPLETO	27	15%
E. MÉDIO COMPLETO	62	35%
E. SUPERIOR INCOMPLETO	11	6%
E. SUPERIOR COMPLETO	14	8%
COR DA PELE		
BRANCO (A)	31	17%
PARDO (A)	96	54%
NEGRO (A)	52	29%
INDÍGINA	0	0%
OCUPAÇÃO		
SIM	105	59%
NÃO	74	41%
RENDA FAMILIAR		
0-522,50	0	0%
522,50-1,045	93	52%
1,045-1.567,50	57	32%
>1.567,50	29	16%
Q. FAMILIAR		
1	0	0%
2	5	3%
3	26	15%
4	54	30%
>5	94	52%

O grupo de cor parda foi a mais predominante com 86 (58%) de nossa pesquisa, e que somando com a cor negra chega a 79% da população, a cor branca 21%. Por se tratar de uma autodeclaração nossos dados são justificados em virtude da queda do número de autodeclarados brancos no país e um crescente aumento nos números de autodeclarados pardos durante os últimos anos, ultrapassando em 2015 a população de cor branca e no último levantamento chegou a 46% da população enquanto a cor branca 42%, tendo a cada ano uma tendência de crescimento conforme os dados do IBGE (IBGE, 2019).

Outro fator importante de nossa pesquisa foi avaliar as condições sanitárias da população dessas regiões de saúde, já que o meio influencia diretamente na saúde e bem-estar, principalmente quando se trata de doenças transmitidas por mosquitos (SILVA et al 2020). A procedência da água assim como o seu estoque foi questionada e dos 179 participantes, 172 (96%), afirmaram receber água encanada da rede pública municipal e 134 (75%) fazem o seu armazenamento em caixa d'água (Tabela 3).

Tabela 2. Características de Saneamento básico

	FREQUÊNCIA	
	N=	%
PROCEDÊNCIA DA ÁGUA		
		96
REDE PÚBLICA	172	%
POÇO	5	3%
RIO	0	0%
CISTERNA	2	1%
NÃO SABE	0	0%
ESTOCAGEM DA ÁGUA		
		75
CAIXA D'ÁGUA	134	%
TONEL	0	0%
		25
TANQUE	45	%
OUTROS	0	0%
NÃO SABE	0	0%
DESTINO DO ESGOTO		
		19
FOSSA SÉPTICA	34	%
CÉU ABERTO	6	3%
FOSSA NEGRA	0	0%
ESTAÇÃO DE		78
TRATAMENTO	139	%
RIO	0	0%
ENCHENTE NA RUA		
		35
SIM	62	%

NÃO	117	65%
NÃO SABE	0	0%
DESTINO DO LIXO		
COLETA	108	60%
ENTERRA	0	0%
QUEIMA	9	5%
CÉU ABERTO	62	35%
TOTAL		

Fonte: Dados da pesquisa

A maioria dos participantes 139 (78%), disseram que o esgoto era destinado para as estações de tratamento e 34 (19%) por fossa séptica. A coleta de lixo prestado pela prefeitura foi o mais frequente com 108 (60%) e o despejo do lixo a céu aberto com 62 (35%) (Tabela 2).

Com base na análise das repostas do questionário podemos inferir que há sim uma conscientização por parte da população em relação aos cuidados necessários para a estocagem da água.

No entanto, a destinação do lixo deixa a desejar uma vez que 35% dos participantes afirmaram depositar seus resíduos sólidos em locais abertos, o que pode gerar em períodos chuvosos um agravo para a saúde pública, pois a destinação incorreta desses resíduos refletirá na criação de focos primários na disseminação de doenças virais transmitidas principalmente pelo mosquito *Aedes Aegypti*, e em conjuntura com a estrutura das ruas dos municípios estudados, alagamentos nas vias públicas são frequentes gerando um transtorno a mais para a população.

Estudos salientam que indivíduos em condições socioeconômicas mais baixas, vivendo em áreas densamente povoadas (favelas, cortiços) em moradias mal construídas, o que observamos nas regiões de saúde aqui estudadas, tendem a promover as populações de *Aedes aegypti* e conseqüentemente

surtos de arboviroses (NETO et al., 2006; TEXEIRA E BARRETO, 2008; FAZIDAH et al., 2018).

Para analisar a relação entre as variáveis referentes ao saneamento básico e as diferentes arboviroses identificadas pela pesquisa de anticorpos do tipo IgG nos participantes, realizamos um teste qui-quadrado para essas variáveis. As variáveis sexo, cor, escolaridade, rua e lixo são independentes das doenças, isto é, elas apresentam o comportamento esperado para todas as categorias das doenças. Na tabela, apresentamos as variáveis que apresentaram alguma relação com alguma das doenças. A variável estado civil e DENV 1 não são independentes, assim como a variável trabalho e as doenças ZIKV, DENV 1 e DENV 3, a variável Renda e CHIKV e DENV 3, a variável P. Água e DENV 4, a variável E. Água e ZIKV, a variável D. esgoto e CHIKV e a variável IDH e DENV 4, confirmando o que foi exposto acima.

Tabela 3. Relação saneamento básico e doença.

Arboviroses	Estado civil	Trabalho	Renda	P. água	E. água	D. Esgoto	IDH
CHIKV	0,3393* (0,2611)	0,8615 (0,8607)	0,0748* (0,0701)	0,3641* (0,3407)	0,1991* (0,1971)	0,0597* (0,0373)	0,3975*
ZIKV	0,2353* (0,2838)	0,0497 (0,0660)	0,2101* (0,1979)	0,5834* (0,5927)	0,0624* (0,0476)	0,8565* (0,6770)	0,1567*
DEN-1	0,0278* (0,0130)	0,0247* (0,0213)	0,2372* (0,2982)	0,1415* (0,1028)	0,6931* (0,7698)	0,9455* (0,9084)	0,1388
DEN-2	0,2013* (0,1596)	0,1189* (0,1150)	0,4097* (0,4568)	0,6162* (1,000)	0,6586* (0,7996)	0,9888* (1,000)	0,4467* (0,4117)
DEN-3	0,2035* (0,1668)	0,1649* (0,1639)	0,0609* (0,0624)	0,2858* (0,3054)	0,9023* (1,000)	0,9787* (1,000)	0,5493* (0,4599)
DEN-4	0,5407* (0,4548)	0,0108 (0,0110)	0,7219* (0,7489)	0,0062* (0,0067)	0,2333* (0,2825)	0,1394* (0,1433)	<0,0001*

Para cada uma das variáveis que apresentaram dependência com alguma das doenças foram analisadas quais categorias apresentaram comportamento diferente do esperado.

Na tabela 4, foi apresentado a análise para a variável estado civil e DEN-1. As pessoas solteiras apresentaram maiores casos negativos e indeterminados

de DEN-1, enquanto as pessoas casadas que foram negativas para DEN-1 apresentaram menos casos negativos que o esperado.

Tabela 4. Associação entre estado civil e DEN-1.

E. civil/DEN-1	Solteiro	Casado	Divorciado	Separado	Viúvo
Indeterminado	4 1,9553 (2,1382)	1 (1,1027)	0 (0,0559)	0 (0,1676)	0 (0,0838)
Negativo	12 6,2570 (5,2713)	3 8,7598 (3,7872)	0 (0,1788)	0 (0,5363)	1 (1,9973)
Positivo	54 (0,9816)	94 (0,6498)	2 (0,0312)	6 (0,0936)	2 (0,1586)

A variável trabalho e as doenças ZIKV, DEN-1 e DEN-4 (Tabela 5), apresentaram comportamento diferente para algumas categorias. Os pacientes com diagnóstico indeterminado para ZIKV foram maiores que o esperado para aqueles que não trabalhavam, enquanto para os pacientes que trabalhavam o número de casos foi menor. Os pacientes que não trabalham apresentaram mais casos indeterminados e negativos para a doença DEN-1. Os pacientes com diagnóstico negativo foram maiores para a doença DEN-4 para aqueles que não trabalhavam, enquanto para aqueles que trabalhavam o número observado de pacientes foi menor que o esperado.

Tabela 5. Comportamento da ZIKV, DEN-1 e DEN-4 na ocupação dos pacientes.

Ocupação	ZIKV		DEN-1		DEN-4	
	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim
Indeterminado	11 6,4358 (3,2370)	5 9,5642 (2,1781)	4 2,0112 (1,9667)	1 (1,3234)	8 (0,0167)	11 (0,0113)
Negativo	7 (0,1357)	13 (0,0913)	10 6,4358 (1,9739)	6 (1,3283)	25 16,8939 (3,8896)	17 25,1062 (2,6173)
Positivo	54 (0,2154)	89 (0,1449)	58 (0,4852)	100 (0,3265)	39 (1,5092)	79 (1,0156)

Em relação à renda dos participantes, constatamos que, cerca de 93 (52%), declararam possuir renda menor ou igual a R\$ 1.045,00 e 57 (32%) de R\$1.045, 00 a R\$1.567,50 e 29 (16%) acima de R\$1.567,50 por família, além de 94 (52%) dessas famílias terem de cinco ou mais integrantes (Tabela 2).

A variável renda e as doenças CHIKV e DENV 3 (Tabela 6), não apresentaram independência. Os pacientes com renda entre um salário e meio e dois salários apresentam menores casos indeterminados para essas doenças, enquanto apresentaram mais casos positivos. O número de casos indeterminados de DENV 3 foi maior que o esperado entre aqueles com renda entre meio e um salário mínimo, aqueles com renda entre um salário e meio e dois salários mínimos o número de casos indeterminados e negativos foi menor.

Tabela 6. Relação entre a variável renda e as doenças CHIKV e DENV 3.

P. aquisitivo	CHIKV			DEN-3		
	R\$ 1,100,00	R\$ 1,567,00	>R\$ 1,567,00	R\$ 1,100,00	R\$ 1,567,00	>R\$ 1,567,00
Indeterminado	16 (0,5752)	12 (0,1968)	26,2011 (2,8462)	63,0894 (2,7422)	1 (0,8696)	01,4469 (1,4469)
Negativo	40 (0,3098)	28 (0,0503)	15 (0,2710)	7 (0,5482)	5 (0,1428)	02,4804 (2,4804)
Positivo	23 (1,2894)	23 (0,0023)	2013,6425 (2,9627)	66 (0,3016)	57 (0,0084)	37 (0,4664)

Por se tratar de dados socioeconômicos e o quanto o mesmo se torna importante para o IDH dos municípios, nossos resultados mostram uma relação significativa no tocante renda e doença, sobretudo quando o número de casos positivos de CHIK e DENV 3 são altos. E segundo o IBGE (2019) o Maranhão é o estado que possui a menor renda domiciliar do país com sua população sobrevivendo com 645 reais apenas, exaltando o observado onde metade dos participantes afirmou possuir renda menor ou igual a um salário mínimo.

E ainda que os municípios aqui estudados tenham um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDHM) de classificação Média (IBGE, 2010), considerado bom para o desenvolvimento econômico e social dos municípios, a distribuição dos recursos não acontece de forma igual, tendo nichos sociais de desenvolvimento pelos municípios de nosso estado. Com isso,

esse indicador se torna relevante no que se diz respeito à qualidade de vida da família, uma vez que o recurso financeiro é peça chave na saúde do indivíduo.

Mattos *et al.*, 2007, estudando os fatores de risco para dengue em Belo Horizonte, Brasil, identificou que o grupo com maior risco para ter dengue por aqueles onde o chefe de família possui uma menor renda, maior densidade domiciliar e maior proporção de crianças e idosos.

Em relação às manifestações clínicas apresentadas pelos participantes no momento da pesquisa, a febre e a mialgia foram as mais relatadas com 179 (100%) para febre e 141 (94,6%) para mialgia (Tabela 7).

Tabela 7. CARACTERIZAÇÃO DOS SINAIS E SINTOMAS DOS PACIENTES		
SINAIS E SINTOMAS	N/T	%
	17	
FEBRE	9	100%
	14	
MIALGIA	1	94,60%
CONJUNTIVITE	29	19,50%
ARTRALGIA	73	49%
I. ARTICULAR	30	20,10%
DOR AO CAMINHAR	54	36,20%
	11	
NÁUSEAS	9	79,80%
VÔMITO	94	63%
ERUPÇÕES NA PELE	85	57%
COCEIRA	80	53,60%

A artralgia apresentou uma representatividade de 49% e a inflamação articular de 20%, sendo que esses sintomas são característicos para a CHIK. Um dado interessante é que desse grupo apenas 36% teve dificuldade ao caminhar devido as fortes dores articulares, tendo esse mesmo sintoma estendido por alguns meses.

Zeana (2016) identificou transtornos reumáticos em pacientes que retornaram do Caribe, onde as principais queixas relatadas foram às dores musculares, fadiga e inchaço nas articulações, o considerando infecção por CHIK. Além desses, a náuseas e o vomito teve uma relevância de 80% e 63% respectivamente, contudo assim com a febre a mialgia, não são sintomas específicos para a CHIK, podendo também estar relacionado a outras arboviroses como a DENV e a ZIKV (ROBISON, MC et al 1955; IOOS, S., et al 2014).

Com isso, considerando a proporção de pacientes que apresentaram cada um dos sintomas, apresentamos a proporção de indivíduos que apresentaram febre (esquerda) e mialgia (direita) em cada uma das categorias, por exemplo, dos indivíduos que foram positivos para CHIKV 98,48% apresentaram febre.

Tabela 8. Proporção de indivíduos que apresentaram febre e mialgia nas doenças.

Sintomas	Febre			Mialgia		
Doença	Indeterminado	Negativo	Positivo	Indeterminado	Negativo	Positivo
CHIKV	1	0,9759	0,9848	0,9667	0,9277	0,9242
ZIKV	1	1	0,979	1	1	0,9161
DEN-1	1	0,9375	0,9873	0,8	0,875	0,943
DEN-2	1	1	0,981	0,8	0,9375	0,9367
DEN-3	1	1	0,9812	1	0,9167	0,9313
DEN-4	1	0,9286	1	1	0,881	0,9407

O sintoma de conjuntivite é apresentado em menos de 20% dos indivíduos que foram positivos para as diferentes doenças, já a dor nas juntas foi apresentada por quase a metade dos indivíduos que foram positivos ou negativos para as diferentes doenças.

Tabela 9. Variável Conjuntivite e dor nas juntas nas doenças.

	Conjuntivite			Dor nas juntas		
	Indeterminado	Negativo	Positivo	Indeterminado	Negativo	Positivo
CHIKV	0,1667	0,1566	0,1667	0,4	0,4578	0,5455
ZIKV	0,125	0,1	0,1748	0,3125	0,35	0,5175
DEN-1	0,2	0,125	0,1646	0,4	0,4375	0,4873
DEN-2	0,2	0,0625	0,1709	0,6	0,4375	0,481
DEN-3	0,2857	0,0833	0,1625	0,2857	0,5	0,4875
DEN-4	0,1053	0,2143	0,1525	0,6842	0,5238	0,4322

O sintoma de inchaço articular (Tabela 10), foi apresentado por menos de 20% dos indivíduos que foram positivos para as diferentes doenças. O sintoma de dor ao caminhar foi apresentado por aproximadamente 30% dos indivíduos que foram positivos para as diferentes doenças.

Tabela 10. Variável Conjuntivite e dor nas juntas nas doenças.

	I Articular			Dor ao Caminhar		
	Indeterminado	Negativo	Positivo	Indeterminado	Negativo	Positivo
CHIKV	0,1333	0,2048	0,1515	0,1667	0,2892	0,3182
ZIKV	0,25	0,1	0,1748	0,25	0,25	0,2867
DEN-1	0	0,0625	0,1899	0	0,25	0,2911
DEN-2	0	0,0625	0,1899	0,4	0,1875	0,2848
DEN-3	0	0,1667	0,1812	0,1429	0,3333	0,2812
DEN-4	0,1579	0,1905	0,1695	0,2632	0,4048	0,2373

Também foi analisada a proporção de indivíduos que apresentaram febre segundo sua duração em dias (Tabela 11). A proporção foi calculada por linhas, por exemplo, para CHIKV os pacientes com casos indeterminados tiveram 3,33% 0 dias de febre, 13,33% 2 dias de febre, 43,33% 3 dias de febre, 26,67% 4 dias de febre e 13,33% 5 dias de febre, totalizando dessa forma o 100% dos casos indeterminados para CHIKV. Para o CHIKV a maioria dos pacientes apresentou 3 dias de febre. Para ZIKV indeterminado ou negativo a maioria apresentou 4 dias de febre, já para os casos positivos a maioria apresentou 3 dias de febre. Para a dengue a maioria apresentou 3 dias de febre, alguns casos indeterminados apresentaram a mesma proporção de 3 ou 5 dias de febre.

Tabela 11. Análise de proporção entre a variável febre e dias de febre nas doenças.

		Dias de febre				
		0	2	3	4	5
CHIKV	Indeterminado	0,0333	0,1333	0,4333	0,2667	0,1333
	Negativo	0,0843	0,0723	0,3976	0,2771	0,1687
	Positivo	0,0455	0,1212	0,3939	0,3333	0,1061
ZIKV	Indeterminado	0,0625	0,0625	0,25	0,4375	0,1873
	Negativo	0,05	0	0,25	0,4	0,3
	Positivo	0,0629	0,1189	0,4406	0,2657	0,1119
DEN-1	Indeterminado	0	0,2	0,4	0	0,4
	Negativo	0,0625	0,0625	0,3125	0,375	0,1875
	Positivo	0,0633	0,1013	0,4114	0,2975	0,1266
DEN-2	Indeterminado	0	0,2	0,4	0	0,4
	Negativo	0,0625	0,125	0,25	0,3125	0,25
	Positivo	0,0633	0,0949	0,4177	0,3038	0,1203
DEN-3	Indeterminado	0	0	0,4286	0,1429	0,4286

	Negativo	0,0833	0,0833	0,1667	0,4167	0,25
	Positivo	0,0625	0,1062	0,4188	0,2938	0,1187
DEN-4	Indeterminado	0,2105	0,0526	0,3158	0,1579	0,2632
	Negativo	0,1667	0,0952	0,4048	0,2619	0,0714
	Positivo	0	0,1102	0,4153	0,3305	0,1441

Ao redor de 60% dos pacientes apresentou vômitos como pode ser visto na tabela 11. A prova do laço foi feita em menos de 3% dos indivíduos analisados, caracterizando uma falha na triagem dessas doenças, já que esse teste tem muita relevância na tomada de decisão dos profissionais de saúde por detectar o indicador hemorrágico do grau I da febre hemorrágica da dengue (BARROS et al., 2021).

Tabela 12. Análise da variável vômito e prova do laço nas doenças.

	Vômitos			Prova do Laço		
	Indeterminado	Negativo	Positivo	Indeterminado	Negativo	Positivo
CHIKV	0,5667	0,6627	0,6515	0	0,0241	0
ZIKV	0,625	0,65	0,6434	0	0	0,014
DEN-1	1	0,5	0,6456	0	0	0,0127
DEN-2	0,4	0,625	0,6519	0	0	0,0127
DEN-3	0,5714	0,5	0,6562	0	0	0,0125
DEN-4	0,6316	0,5476	0,678	0	0,0238	0,0085

Foram analisadas as comorbidades apresentadas pelos indivíduos analisados (Tabela 13). Foram reportadas como comorbidades a diabetes, hipertensão e diabetes ou somente hipertensão. A grande maioria dos indivíduos relatou não possuir comorbidades.

Tabela 13. Análise da variável comorbidades frente as doenças.

		Comorbidades			
		Diabetes	Diabetes/P.alta	P.alta	Não
CHIKV	Indeterminado	0,1	0,0667	0	0,8333
	Negativo	0,1084	0,0482	0,0964	0,747
	Positivo	0,0606	0,0455	0,0606	0,8333
ZIKV	Indeterminado	0,125	0	0	0,875
	Negativo	0,15	0	0	0,85
	Positivo	0,0769	0,0629	0,0839	0,7762
DEN-1	Indeterminado	0	0	0	1
	Negativo	0	0,0625	0,0625	0,875
	Positivo	0,1013	0,0506	0,0696	0,7785
DEN-2	Indeterminado	0,2	0	0	0,8
	Negativo	0,0625	0	0,0625	0,875
	Positivo	0,0886	0,057	0,0696	0,7848
DEN-3	Indeterminado	0,2857	0	0	0,7143
	Negativo	0	0	0,0833	0,9167
	Positivo	0,0875	0,0563	0,0688	0,7875
DEN-4	Indeterminado	0,0526	0,0526	0	0,8947
	Negativo	0,1429	0,0952	0,0714	0,6905
	Positivo	0,0763	0,0339	0,0763	0,8136

6.2 Análise dos pacientes com qPCR positivo para CHIKV

Além do teste sorológico, foi realizada a pesquisa de identificação viral nas amostras dos pacientes, seguindo como critério o tempo de infecção explanado pelos participantes. Das amostras avaliadas, três pacientes apresentaram qPCR positivo para CHIKV, um participante do município de Vargem Grande, um em Santa Inês e um São José de Ribamar.

O paciente de Vargem Grande teve IgG negativo para CHIKV e para as outras doenças com exceção de DEV 4 no qual foi indeterminado, nos dando uma ideia de transição onde o organismo do paciente estava começando a produzir anticorpos IgG, de sexo masculino, de 50 anos de idade, casado, que trabalha, com renda entre um e um salário e meio, água de rede pública e estocagem da água em caixa de água, apresentou 5 dias de febre, mialgia, dor nas articulações, coceira, náuseas e vômito, sem comorbidades.

O paciente de Santa Inês teve IgG indeterminado para CHIKV e positivo para as outras doenças, de sexo feminino, de 18 anos de idade, solteira, não trabalha, com renda entre meio e um salário mínimo, água de rede pública e estocagem da água em caixa de água, apresentou 2 dias de febre, mialgia, conjuntivite, erupções cutâneas, coceiras, náuseas e vômito, com diabetes.

O paciente de São José de Ribamar teve IgG positivo para CHIKV e para as outras doenças, de sexo feminino, de 49 anos, casada, trabalha, com renda entre meio e um salário mínimo, água de rede pública e estocagem da água em caixa de água, apresentou 4 dias de febre, mialgia, dor nas articulações, coceiras, náuseas, vômitos, sem comorbidades.

6.3 Atividade das colinesterases

A atividade das colinesterases (AChE e BChE) foi avaliada no sangue total, enquanto as atividades da AChE e da BChE foram avaliadas, respectivamente, no eritrócito e no plasma, em 29 amostras, divididas em dois grupos, o controle (n=8 - amostras com PCR CHIKV negativo e IgG CHIKV negativo), e o grupo amostras CHIKV (n=21 - amostras com PCR CHIKV

negativo e IgG positivo). O resultado pode ser visto nas figuras 5 e 6, respectivamente.

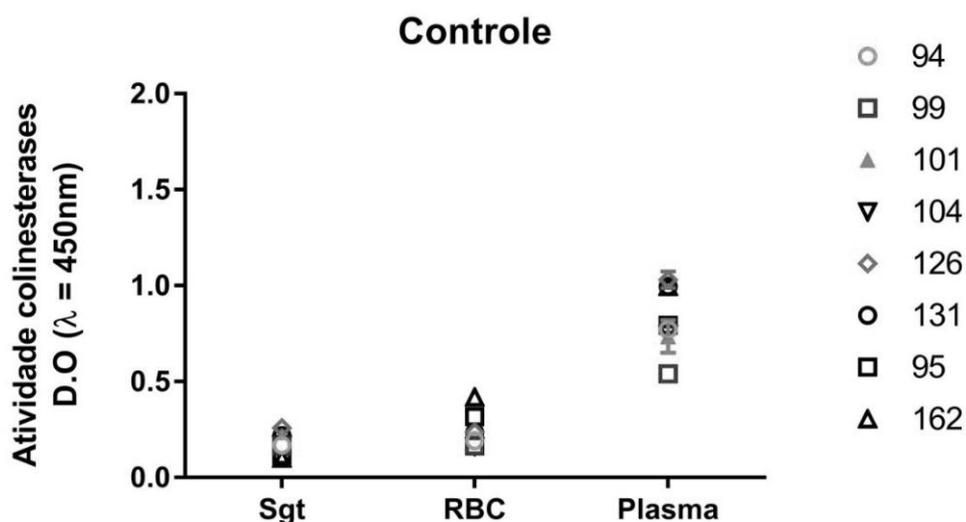


Figura 5. Grupo controle (n=8 - amostras com PCR CHIKV negativo e IgG CHIKV negativo).

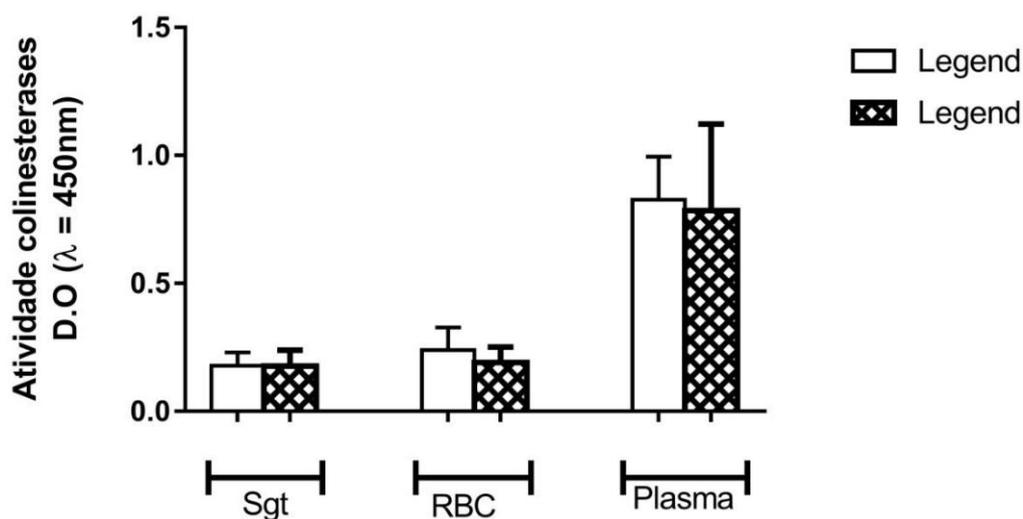


Figura 6. Grupo amostras CHIKV n=21 - amostras com PCR CHIKV negativo e IgG positivo.

Na análise estatística, o teste realizado de normalidade (t-student) e de igualdade das médias (Mann-Whitney) não identificou diferença estatisticamente significativa entre o grupo considerado controle e o grupo amostras.

Como podemos observar, nossos dados sugerem que ainda há circulação do vírus chikungunya nas principais regiões de saúde do Maranhão, e embora os resultados positivos de casos de chikungunya por biologia molecular tenham sido insatisfatórios, sendo identificados apenas três casos das 179 amostras, é sabido que esse número pequeno de casos confirmados pelo presente trabalho se deu pela falta de procura à assistência médica em tempo hábil por parte dos doentes em decorrência do surgimento do coronavírus, que coincidiu no mesmo período das coletas, além dos sintomas iniciais provocado pelo coronavírus ser semelhante aos das arboviroses DEN, CHIKV e ZIKV dificultando no diagnóstico clínico e laboratorial. E uma vez que o tempo de infecção é de suma importância para investigação laboratorial por biologia molecular, muitos dos que procuravam os postos de saúde iam fora do tempo de viremia, onde é possível identificar o vírus nas amostras.

E como a pandemia COVID-19 coincidiu com o ressurgimento da dengue em nosso país (RABIU et al., 2021) os números de casos de arboviroses oscilavam a medida que surtos simultâneos ocorriam gerando falha na vigilância epidemiológica, e deixando o sistema de saúde instável. Tornando-se quase impossível conter a dengue e a chikungunya em nosso país nesse mesmo período.

Todavia, quando foi investigada nas amostras a presença de anticorpos de CHIKV, DENV e ZIKV, nossos resultados mostraram que houve sim o contato da população com alguma dessas arboviroses, e conforme avançava o número de casos de COVID-19 o pico de arboviroses ia decaindo, mascarando o surto ou até mesmo a epidemia de dengue que estava acontecendo, pois a falta de investigação e o diagnóstico incorreto entre dengue e COVID-19 que compartilham alguns sintomas semelhantes nos estágios iniciais foi o principal aliado desse mascaramento, impossibilitando dados corretos sobre a situação dessa doença no ano de 2020 (WILDER-SMITH et al., 2020; LOKIDA et al., 2020).

Nossos dados sociodemográficos também dão ênfase a essa problemática, pois muitos dos pacientes testados positivos sorologicamente para chikungunya residiam em lugares com pouca estrutura e auxílio do governo e como demonstrado por MOUSAVI, 2020, os países mais pobres e os grupos socioeconômicos mais baixos foram desproporcionalmente mais afetados, já

que as condições desfavoráveis e o potencial de epidemias de dengue se sobrepõem a outros surtos de doenças infecciosas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados aqui obtidos, pré-figuram a situação do nosso Estado frente às ações de combate as principais arboviroses que acometem a nossa população, e que diante a desafios inesperados como uma pandemia, falhas no monitoramento de doenças endêmicas fazem estragos de grandes proporções, principalmente para a saúde da população. O grupo social com menor poder aquisitivo em virtude da situação socioambiental em que se encontram são os mais “vulneráveis” e que buscam o sistema de saúde pública, sendo os mais presentes em nossa pesquisa. A febre e a mialgia foram os sintomas mais relatados pelos participantes e a atividade da colinesterase plasmática não apresentou resultados significativos para identificação de casos de arboviroses.

Considerações finais

Contudo, faz-se necessário continuar estudando o comportamento dessas arboviroses em nossa população, principalmente com o advento de novos surtos, não somente de dengue, zika e chikungunya, mas também de covid-19 e gripe de Influenza.

8. Referências

ARAGÃO CF; CRUZ ACR; NUNES NETO JP, et al. Circulation os Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. *Acta Trop.* 2018 Oct; 186:1-4. doi: 10.1016/j.actatropic.2018.06.022. Epub 2018 Jun 19.

ANDRADE.C. S. d . Dengue: o controle da enfermidade pelo Controle social, para o controle dos Vetores. Depto. de Zoologia, IB – UNICAMP 2019. Disponível em: http://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos/Control%20de%20P%20lagas_site.pdf.n Acessado em 23.set.2014. https://www2.ib.unicamp.br/profs/eco_aplicada/arquivos/artigos_tecnicos

ALBUQUERQUE, I. G. C. et al . Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 45, n. 1, p. 128-129, Feb. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000100026>.

ASSIS, C.R.D., LINHARES, A.G., OLIVEIRA, V.M., FRANÇA, R.C.P., SANTOS, J.F., MARCUSCHI, M., CARVALHO, E.V.M., BEZERRA, R.S., CARVALHO JR, L.B. Characterization of catalytic efficiency parameters of brain cholinesterases in tropical fish. *Fish Physiol Biochem.* 2014. DOI 10.1007/s10695-014-9956-1

BARRETO, M. L.; CARMO, E. H. Situação de saúde da população brasileira: tendências históricas, determinantes, e implicações para as políticas de saúde. *Informe Epidemiológico do SUS*, v.3, n.3-4, p. 7-34, 1994

BARRETO. M.L; TEIXEIRA, M.G. Dengue no Brasil: Situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa. *Revista Estudos Avançados*, v. 22, n.64, p. 53 a 72, 2008.

BARROS, AJ de; LAUDARES, S.; ROMÃO, EM.; FREITAS, A. Ávila de .; DIAS, DAF.; VIEGAS, G. . Uma revisão do vírus da dengue e seus vetores. *Pesquisa, Sociedade*

e Desenvolvimento, [S. l.] , v. 10, n. 10, pág. e289101018733, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i10.18733.

BORGHERINI, G.; POUBEAU, P.; JOSSAUME, A. et al. Persistent arthralgia associated with Chikungunya virus: A study of 88 adult patients on reunion island. *Clin Infect Dis*, v. 47, p. 469–475, 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18611153/> DOI: 10.1086 / 590003

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil. Brasília. 100p. 2014. DOI: 10.5205/reuol.7049/7049-61452/-61452-1--1ED-ED.0.903/0903supl201/supl201531515

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Volume 48 N° 3. 2017a. DOI: 10.5205/reuol. DOI: 10.5205/reuol.7049 7049-61452 -61452-1--1ED-ED.0.903 0903supl201supl201531515

BRASIL. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, v. 49, N° 2. ISSN 2358-9450. 2018. DOI: 10.5205/reuol. DOI: 10.5205/reuol.7049 7049-61452 -61452-1--1ED-ED.0.903 0903supl201 supl201531515

BRASIL, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2001. Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. PEAa. Brasília, DF. 82p DOI: 10.5205/reuol. DOI: 10.5205/reuol.7049 7049-61452 -61452-1--1ED-ED.0.903 0903supl201 supl201531515

BRASIL Ministerio da Saude. Maranhão registra 107 municípios em situação de alerta ou risco para dengue, zika e chikungunya. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42064-maranhao-registra-107-municipios-em-situacao-de-alerta-ou-risco-para-dengue-zika-e-chikungunya>. Acesso em 13, fev. 2019.

BOROVIKOVA LV; IVANOVA S; ZHANG M; YANG H; BOTCHIKINA; WALTJKINS LR; WNAG H; ABUMRAD N; EATON JW; TRACEY JK. Vagus nerve

stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, v. 405, n. 6785, p. 458-461, 2000.

BORECKEL, R., HAESE, N; MESSAUDI, I; STREBLOW, D. Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model) *Pathogens*. 2015;4:662–681. doi: 10.3390/pathogens4030662

CAGLIOTI, C.; LALLE, E.; CASTILLETI, C.; CARLETTI, F.; CAPOBIANCHI, M. R.; BORDI, L. Chikungunya virus infection: an overview. *The New Microbiologica*, v. 36, n. 3, p. 211-27, 2013. PMID: 23912863

CLETON, N.; KOOPMANSA, M.; REIMERINKA, J.; GODEKEA, G-J.; REUSKEN, C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol*, v. 55, n. 3, p. 191-203, 2012. DOI: 10.1016 / j.jcv.2012.07.004

COLUCCI, C. Brazilian health authorities on alert after rise in deaths from chikungunya, *Brasilian Medical Journal*; 355, 2016.

COFFEY, L.; FAILLOUX, A.; WEAVER, C. Chikungunya virus–vector interactions. *Viruses*, v. 6, n. 11, p. 4628-63, 2014. DOI: 10.3390 / v6114628

COUDERC, T.; GANGNEUX, N.; CHRÉTIEN, F.; CARO, V.; LE LUONG, T.; DUCLOUX, B. et al. Chikungunya virus infection of corneal grafts. *J Infect Dis*, v. 206, n. 6, p. 851–859, 2012. DOI: 10.1093 / infdis / jis296

COUTURIER, E.; GUILLEMIN, F.; MURA, M. et al. Impaired quality of life after Chikungunya virus infection: A 2-year follow-up study. *Rheumatology (Oxford)*, v. 51, p. 1315–1322, 2012. DOI: 10.1093 / reumatologia / kes015

COSTA AG, SANTOS JD, CONCEIÇÃO JKT, ALECRIM PH, CASSEB AA, BATISTA WC, et al. Aspectos epidemiológicos do surto de Dengue em Coari-AM, 2008 a 2009. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 jul-ago;44(4):471-4. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000400014>

CUNHA, R. V. D.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A

Review. Mem Inst Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, v. 112, n. 8, p. 523-531, 2017.

CARDOSO, CW; PAPLOSKI IA; KIKUTI M; RODRIGUES MS; SILVA MM; CAMPOS GS; SARDI SI; KITRON U; REIS MG; RIBEIRO GS. Outbreak of exanthematous illness associated with Zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. Emerging infectious disease, v. 21, n. 12, p. 2274–2276, 2015.

CASSEB, ADR; CASSEB, LMN; SANDRO, PDS; PEDRO; FDCV. Arbovírus: Importante Zoonose Na Amazônia Brasileira. Veterinária e Zootecnia, v. 20, n. 3, p. 391-403, 2013.

ÇOKU, AN. 2003. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. Turk J Biochem 28: 54-61.

CHOPRA A; ANURADHA V; CHORPADE R; SALUJA M. Acute Chikungunya and persistent musculoskeletal pain following the 2006 Indian epidemic: a 2-year prospective rural community study. Epidemiology & Infection, v. 140, n. 5, p. 842-850, 2011.

DAS UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. Med Sci Monit 2007; 13: RA214-RA221.

DANIS-LOZANO, R.; DÍAZ-GONZÁLEZ, E. E.; TRUJILLO-MURILLO, K. D. C.; CABALLERO-SOSA, S.; SEPÚLVEDA-DELGADO, J.; MALO-GARCÍA, I. R. et al. Clinical characterization of acute and convalescent illness of confirmed chikungunya cases from Chiapas, S.Mexico: a cross sectional study. PLoS One, v. 12, n. 10, 2017. . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186923>

DARVESH. S; HOPKINS. D.A; GEULA, C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. Nat Rev Neurosci 4: 131-138, 2003.

DINGLE, J. T. M; THOMAS, D.P.P.: Invitro studies on human synovial membrane. A metabolic comparison of normal and rheumatoid tissue. *Brit. J. Exp. Path.* 37: 318-324,1956.

SUHRBIER, A.; MAHALINGAM, S. The immunobiology of viral arthritides. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 124, n. 3, p. 301-308, 2009.

ENSERINK M. Infectious diseases. Massive outbreak draws fresh attention to little-known virus. *Science*, v. 311, n. 5764, p. 1085, 2006.

FERREIRA-DE-BRITO A, RIBEIRO IP, MIRANDA RMD, FERNANDES RS, CAMPOS SS, SILVA KABD, et al. First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Oct 2016;111(10):655-8. DOI: 10.1590 / 0074-02760160332

FRANCO, Rosecler Riethmuller. Marcadores inflamatórios e infecciosos em pacientes com síndrome metabólica. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade. <http://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/1571>

FROS, Jelke J.; PIJLMAN, Gorben P. Alphavirus infection: host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. *Viruses*, v. 8, n. 6, p. 166, 2016. doi: 10.3390/v8060166

FIGUEIREDO LTM. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

MORAES, G.H; DUARTE, E.D.F; DUARTE, E.C. “Determinantes da mortalidade por dengue grave no Brasil: um estudo de caso-controle de base populacional”, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , vol. 88, no. 4, pp. 670–676, 2013

GUEDES DR, PAIVA MH, DONATO MM, BARBOSA PP, KROKOVSKY L, DOS S ROCHA SW, et al. Zika virus replication in the mosquito *Culex quinquefasciatus* in Brazil. *Emerging microbes & infectious*. Aug 2017;6(8):e69. doi: 10.1038/ emi.2017.59

GÉRARDIN, P. et al. “Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion.” Ed. Jean-Paul Chretien. PLoS Medicine. v. 5, n. 3, e60, 2008. 10.1371 / journal.pmed.0050060

GLASGOW, L. A. Leukocytes and interferon in the host response to viral infections. II. Enhanced interferon response of leukocytes from immune animals. J. Bacteriol, v. 91, p. 2185–2191, 1966. DOI: 10.1128 / JB.91.6.2185-2191.1966

GARCÍA-AVLLÓN, MS; RIBA-LIENA, I; SERRA-BASANTE, C; ALOM, J; BOOPATHY, J; SÁEZ-VALENO, J. Altered Levels of Acetylcholinesterase in Alzheimer Plasma. PLoS One. 14 de janeiro de 2010; 5(1): e8701. doi: 10.1371/journal.pone.0008701. PMID: 20090844 PMCID: PMC2806824

GARDNER, J; ANRAKU, I; LE TT; LARCHER, T; MAJOR, L; ROQUES, P; SCHRODER, WA; HIGGS, S; SUHR, A. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. Journal of virology, v. 84, n. 16, p. 8021-8032, 2010.

HAYES EB. Zika virus outside Africa. Emerg infect dis. Sep 2009;15(9):1347-1350. doi: 10.3201/eid1509.090442

HONÓRIO, NA; CAMARA, DCP; CALVET, GA; BRASIL, P. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.

HORAU, J.J; JAFFAR BANDEJEE, MC; KREJBICH, T.P; et al. Inflamação crônica persistente e infecção por alfavírus artritogênicos Chikungunya, apesar de uma robusta resposta imune do hospedeiro. J Immunol. 15 de maio de 2010; 184 (10): 5914-27. doi: 10.4049 / jimmunol.0900255. Epub 2010 Apr 19. PubMed PMID: 20404278.

IOOS. S, MALLETT, H.P, LEPARC, G.I, et al. Current Zika vírus epidemiology and recent epidemics. Med Mal Infect 2014;44:302–7.

KAM, Y. W.; ONG, E. K.; RÉNIA, L.; TONG, J. C.; NG, L.F. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes Infect*, v. 11, n. 14-15, p. 1186-96, 2009. DOI: 10.1016 /j.micinf.2009.09.003

KAPLAY, S.S. “Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase of developing human brain,” *Biology of the Neonate*, vol. 28, no. 1-2, pp. 65–73, 1976.

Koga, Rosemary de Carvalho Rocha. ASPECTOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS DE INDIVÍDUOS COM SINAIS E SINTOMAS DE FEBRE CHIKUNGUNYA. 2017. 63 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Ciências Ambientais e Saúde) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia - GO. URI: <http://tede2.pucgoias.edu.br:8080/handle/tede/366>

KOHLER, L. I. A.; AZEVEDO, J.; LIMA, M. A.; MARINHO, R. A.; SOUZA, L. J. Perfil epidemiológico dos pacientes com evolução subaguda e crônica de infecção por Chikungunya. *Rev Soc Bras Clin Med*, v. 16, n. 1, p. 13-7, 2018. <http://www.sbcm.org.br/ojs3/index.php/rsbcm/article/view/318>

KUCHARZ, E. J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. *Eur J Intern Med*, v. 23, n. 4, p. 325-9, 2012. DOI: 10.1016/j.ejim.2012.01.009

KRAMER, L. D.; CIOTA, A. T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol*, v. 15, p. 112–118, 2015. DOI: 10.1016 /j.coviro.2015.10.003

LABADIE, K; LARCHER, T; JOUBERT, C; MANNIOUI, A; DELACHE, B; BROCHARD, P; GUIGAND, L; DUBREIL, L; LEBON, P; VERRIER, B. A doença de Chikungunya em primatas não humanos envolve persistência viral a longo prazo em macrófagos. *J Clin Invest*. Mar 2010; 120 (3): 894-906. doi: 10.1172 / JCI40104. Epub 2010 22 de fevereiro. PubMed PMID: 20179353; PubMed Central PMCID: PMC2827953.

LANCIOTTI, RS; KOSOY, OL; LAVEN, JJ; PANELLA, AJ; VELEZ, J; LAMBERT, AJ; CAMPBELL, GL. Vírus Chikungunya em viajantes norte-americanos retornando da Índia, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2007 maio; 13 (5): 764-7. PubMed PMID: 17553261; PubMed Central PMCID: PMC2738459.

LEUNG, J. Y.; Ng, M. M.; JANG, J.; CHU, H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. *Advances in Virology. Review*, v. 2011, p. 1-9, 2011. DOI: 10.1155 / 2011/249640

LOPES, N; NOZAWA, C; LINHARES, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua* , v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014 . DOI: doi.org/10.5123/S2176-62232014000300007

LO PRESTI, A.; LAI, A.; CELLA, E.; ZEHENDER, G.; CICCOCZZI, M. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: a review. *Asian Pac J Trop Med*, v. 7, n. 12, p. 925- 32. 2014.

LUM, F. M.; NG, L. F. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res*, v. 120, p. 165-74, 2015. DOI: 10.1016 / S1995-7645 (14) 60164-4

MACHADO, A. P. R.; CARVALHO, I. O.; SOBRINHO, H. M. R.. Neuroinflamação na doença de Alzheimer. *Revista Brasileira Militar de Ciências, Goiânia*, v.6, n.14, p.30-38, 2020. DOI: <http://doi.org/10.36414/rbmc.v6i14.33>.

MACKENZIE JS, GUBLER DJ, PETERSEN LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med*. Dec 2004;10(12):S98-S109. DOI: 10.1038 / nm1144

MATTOS, A.M.C; CAIAFA, W.T, AssuncEão RM, Proietti FA. Spatial Vulnerability to Dengue in a Brazilian Urban Area During a 7-Year Surveillance. *J Urban Health*. 84. New York2007. p. 334±45. <https://doi.org/10.1007/s11524-006-9154-2> PMID: 17243024

MATUSALI, G; COLAVITA, F; BORDI, L, et al. Tropism of the Chikungunya Virus. *Viruses*. 2019;11(2):175. Published 2019 Feb 20. doi:10.3390/v11020175

MOUSSAVI, S.M; ANJOMSHOA, M. COVID-19 no Iêmen: uma crise dentro das crises. *Int J Equity Health*. 2020; 19 (1): 1–3. pmid: 32652995

MUSTAFA MS, RASOTJI V, JAIN S, GUPTA V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India*. 2015 Jan;71(1):67-70. doi: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011

MARTINEZ-TORRES, ME. Dengue hemorrágico em crianças: editorial. Havana: José Marti, 1990. 180p MANSUY, JM; LHOMME, S; CAZABAT, M; PASQUIER, C; MARTIN-BLONDEL, G, IZOPET, J. Detecção dos vírus Zika, dengue e chikungunya usando RT-PCR em tempo real multiplex de reação única. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 dez; 92 (4): 284-287. doi: 10.1016 / j.diagmicrobio.2018.06.019. Epub 2018 Jun 28. PubMed PMID: 30029808.

MARJOLEIN, V.M, STOF, SP, LAROSA GJ, VERVOORDELDONK, MJ, TAK, PP. Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis: aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene knockout mice. *Ann Rheum Dis*. 2010 Sep;69(9):1717-23. doi: 10.1136/ard.2009.118554. Epub 2010 May 28. PMID: 20511609.

NAKAJIMA, K., ABE, T., SAJI, R., et al. Colinesterase sérica associada à gravidade e mortalidade da pneumonia por COVID-19. *J Infect* . 2021; 82 (2): 282-327. doi: 10.1016 / j.jinf.2020.08.021

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology*, London, v. 9, n. 6, p. 732- 737, June 1999. DOI: 10.1016 / s0959-440x (99) 00037-8

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; DE VASCONCELOS, J. M.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G.; DE OLIVEIRA, L. F. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*. BioMed Central Lt, v. 13, p. 102, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>

OFEK, K, KRABBE, K.S. Evron T, Debbeco M, Nielsen AR, Brunnsaad H, et al. Cholinergic status modulations in human volunteers under acute inflammation. *J Mol Med* 2007; 85:1239-51.

PAZMANY, L. Do NK cells regulate human autoimmunity?. *Citocina*. 21 de outubro de 2005; 32 (2): 76-80. Epub 2005 outubro 5. Revisão. PubMed PMID: 16169244.

PAVLOV, VA; TRACEY, KJ. Reguladores neurais das respostas imunes inatas e inflamação. *Cell Mol Life Sci*. Setembro de 2004; 61 (18): 2322-31. Reveja. PubMed PMID: 15378203.

PAVLOV, V. A; TRACEY, J. K. The cholinergic anti-inflammatory pathway. *Brain, Behavior, and Immunity*. v. 19, n. 6, p. 493-499, 2005.

PAL, Pankaj. Molecular Characterization of a Novel, Highly Protective Combination Monoclonal Antibody Therapy against Chikungunya Virus. Washington University in St. Louis, 2015. https://openscholarship.wustl.edu/art_sci_etds/455

PANNING, M.; GRYWNA, K.; VAN ESBROECK, M.; EMMERICH, P.; DROSTEN, C. Chikungunya em viajantes que retornam para a Europa da região do Oceano Índico, 2006. *Emerg Infect Dis*, v. 14, n. 3, p. 416-22, 2008. DOI: 10.3201 / eid1403.070906

PETERSEN, L.R.; STRAMER, S.L.; POWERS, A.M. Chikungunya virus: possible impact on transfusion medicine. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 24, n. 1, p. 15-21. 2010. DOI: 10.1016 / j.tmr.v.2009.09.002

Rust RS. Human arboviral encephalitis. *Semin Pediatr Neurol*. 2012 Sep;19(3):130-51. Doi: 10.1016/j.spen.2012.03.002

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol*, v. 88, n. 9, p. 2363-77, 2007. DOI: 10.1099 / vir.0.82858-0

RABIU, A.T; MOHAN, A; CAVADAROGLU, S,XENOPHANTES,e E; COSTA, A.C.S; TSAGKARIS,sagkaris C, et al. Dengue and COVID-19: A double burden to Brazil. *J Med Virol*. 2021. pmid:33755221

REITER, P; FONTINELLE, D; PAUPY, C. (2006) *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: Another emerging problem? *Lancet Infect Dis* 6: 463–464.

RINALDO, C. R. Jr.; OVERALL, J. C. Jr.; GLASGOW, L. A. Viral replication and interferon production in fetal and adult ovine leukocytes and spleen cells. *Infect. Immun*, v. 12, p. 1070–1077, 1975. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC415399/>

RANDELL, E.W, MATHEUS, M.S, ZHANG H, SERAJ, J.S, Sun G. Relationship between butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2005; 38: 799-805.

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

SCHWARTZ, D. A. Autopsy and Postmortem Studies Are Concordant Pathology of Zika Virus Infection Is Neurotropic in Fetuses and Infants With Microcephaly Following Transplacental Transmission. *Arch Pathol Lab Med*, v. 141, n. 1, p. 68-721, 2017. DOI: 10.5858/arpa.2016-0343-OA

SISSOKO, D.; MOENDANDZE, A.; MALVY, D.; GIRY, C.; EZZEDINE, K.; SOLET, J. L.

et al. Seroprevalence and risk factors of chikungunya virus infection in Mayotte, Indian Ocean, 2005–2006: a population-based survey. *PLoS One*, n. 3:e3066, 2008.

STRUCHINER, C.J; ROCKLOV, J; WILDER-SMITH, A MASSAD, E. Aumento da incidência da dengue em Cingapura nos últimos 40 anos: crescimento populacional, clima e mobilidade. *PLoS One*. 2015; 10 : e0136286

SINAN. Sinan dengue/chikungunya. Sistema de Informação de Agravos de Notificação07 de Março de 2017 <http://sinan.saude.gov.br/sinan>

SILVA, N.S et al . Avaliação da Relação Entre a Climatologia, as Condições Sanitárias (Lixo) e a Ocorrência de Arboviroses (Dengue e Chikungunya) em Quixadá-CE no Período Entre 2016 e 2019. *Rev. bras. meteorol.*, São Paulo , v. 35, n. 3, p. 485-492, Sept. 2020 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-

77862020000300485&lng=en&nrm=iso>. access on 30 Apr. 2021. Epub Oct 09, 2020. <https://doi.org/10.1590/0102-77863530014>.

SLAVOV, Svetoslav Nanev et al. Chikungunya Virus (Chikv): General Characteristics and Possible Impact on Hemotherapy. 2015. DOI: 10.4172 / lpma.1000169

SERGON, Kibet et al. Seroprevalence of chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 78, n. 2, p. 333-337, 2008. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18256441/>

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 19 de 2018. Volume 49, 2018

SIMON, F; TOLOU, H; JEANDEL, P. (2006) [The unexpected Chikungunya outbreak]. *Rev Med Interne* 27: 437–441.

SIMON, F.; JAVELLE, E.; CABIE, A. et al. French guidelines for the management of Chikungunya (acute and persistent presentations). *Med Mal Infect*, v. 45, p. 243–263, 2015. DOI: 10.1016 / j.medmal.2015.05.007

SMITH, Scott A. et al. Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against chikungunya virus. *Cell host & microbe*, v. 18, n. 1, p. 86-95, 2015. DOI: 10.1016 / j.chom.2015.06.009

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog*, n. 3, e89, 2007. DOI: 10.1371 / journal.ppat.0030089

SOLIGNAT, M.; GAY, B.; HIGGS, S.; BRIANT, L; DEVAUX, C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*, v. 393, p. 183–197, 2009. DOI: 10.1016 / j.virol.2009.07.024

SOREQ, H; SEIDMAN, S. 2001. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2: 294-302.

RIBEIRO, G.S; KITRON, U. Zika vírus pandemic: a human and public health crisis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.49 no.1 Uberaba Jan./Feb. 2016; doi.org/10.1590/0037-8682-0036-2016.

ROBINSON, MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. Trans R Soc Trop Med Hyg 1955;49(1): 28–32.

SMITH, PK; KROHN, RI; HERMANSON et al,. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985 Oct;150(1):76-85. Erratum in: Anal Biochem 1987 May 15;163(1):279. PubMed PMID: 3843705. SUHRBIER, A.; MAHALINGAM, S. The immunobiology of viral arthritides. Pharmacology & Therapeutics, v. 124, n. 3, p. 301-308, 2009.

TRACEY, KJ. O reflexo inflamatório. Natureza. 2002, 19-26 de Dez; 420 (6917): 853-9. Reveja. PubMed PMID: 12490958.

TSETSARKIN, KA; VANLANDINGHAM, DL, MCGEE, CE; HIGSS, S. Uma única mutação no vírus chikungunya afeta a especificidade do vetor e potencial epidêmico. PLoS Pathog. 2007 dez; 3 (12): e201. PubMed PMID: 18069894; PubMed Central PMCID: PMC2134949.

VALLE, A, O'CONNOR, D.T, TAYLOR, P, ZHU, G, Montgomery GW, Slagboom PE, et al. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. Clin Chem 2006; 52: 1014-20.

VERSTEEG, L.; FEBRES, M. E. C.; BEAUMIER, C. M. The role of cellular immune responses on chikungunya virus infection-induced arthritis. Curr Trop Med Rep, v. 3, n. 2, p. 60–66, 2016. <https://doi.org/10.1007/s40475-016-0074-2>

VOLK, S. M.; CHEN, R.; TSETSARKIN, K. A.; ADAMS, A. P.; GARCIA, T. I.; SALL, A. A. et al. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. J Virol, v. 84, p. 6497–6504, 2010. DOI: 10.1128/JVI.01603-09

VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD, Angelle Desiree. Chikungunya Virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 37, n. 2, p. 371-382, 2017. DOI: 10.1016/j.cll.2017.01.008

WALDHAUER, I; STEINLE, A. NK cells and cancer immunosurveillance. *ONCOGENE*. v. 27, n. 45, p. 5932-5943, 2008.

WEAVER, SC; REISEN, WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WEAVER, SC; VASILAKIS, N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009 Jul;9(4):523-40. doi: 10.1016/j.meegid.2009.02.003. Epub 2009 Feb 13. Review. PubMed PMID: 19460319; PubMed Central PMCID: PMC3609037.

WHO. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention, and control. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, p. 147, 2009.

ZAREA, AL; SANTOS, SM; FERNANDES-OLIVEIRA, ES; CARVALHO, RG; COELHO, GE. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. *Epidemiol Serv Saude*. 2016 abr-jun; 25 (2): 391-404. doi: 10.5123 / S1679-49742016000200017. *Reveja*. Português. PubMed PMID: 27869956.

ZEANA. C, KELLY. P, HEREDIA. W, et al. Post-chikungunya rheumatic disorders in travelers after return from the Caribbean. *Travel Med Infect Dis* 2016;14(1):21–5.

Zivkovic, A.R; Schmidt, K; Sigl, A; Sebastian, O. Decker, Thorsten Brenner, and Stefan Hofer. Reduced Serum Butyrylcholinesterase Activity Indicates Severe Systemic Inflammation in Critically Ill Patients *Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation* vl 2015, Article ID 274607, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/274607>

QUATRESOUS, I. E-alert 27 January: chikungunya outbreak in Reunion, a French overseas department. *Euro Surveill* 2006; 11: E060202.1

RAVI, V. Re-emergence of chikungunya virus in India. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24: 83–84.

OLIVEIRA, M.F, GALVÃO, A.J.M, FERREIRA, O.C Jr, et al. Twolineages of dengue virus type 2, Brazil. *Emerg Infect Dis*.2010;16(3):576–578.19

WHITEHORN, J, SIMMONS, C.P. The pathogenesis of dengue.Vaccine. 2011;29(42):7221–7228

BACK, A.T, LUNDKVIST, A. Dengue viruses – an overview. *InfectEcol Epidemiol*. 2013;3:53.

David A. Muller, Alexandra C. I. Depelsenair, Paul R. Young, Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 215, Issue suppl_2, 1 March 2017, Pages S89–S95, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>

Lanciotti RS Calisher CH Gubler DJ Chang GJ Vorndam AV . Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*1992; 30:545–51.

Shu PY Chen LK Chang SF et al. .Sorotipagem do vírus da dengue com base no envelope e membrana e proteína não estrutural NS1 sorotipo-específico de captura de imunoglobulina M Ensaio de imunoabsorção enzimática. *J Clin Microbiol*2004; 42:2489-94

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1232–1239.

Staples JE, Dziuban EJ, Fischer M, et al. Diretrizes provisórias para avaliação e teste de bebês com possível infecção congênita pelo zika vírus : Estados Unidos, 2016. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2016; 65: 63–67.

BRASIL, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, SVS, 2021. Acessado em 01/09/2021. Disponível:

https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/junho/07/boletim_epidemiologico_svs_21.pdf

Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de Chikungunya até semana epidemiológica 12, 2015. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/17/Boletim-Dengue-SE12-2015.pdf> (acessado em 28/Abr/2015).

» <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/abril/17/Boletim-Dengue-SE12-2015.pdf>

Pancetti FGM, Honório NA, Urbinatti PR, Lima-Camara TN. Twenty-eight years of *Aedes albopictus* in Brazil: a rationale to maintain active entomological and epidemiological surveillance. Rev Soc Bras Med Trop 2015; 48:87-9.

Lokida D, Lukman N, Salim G, Butar-butur DP, Kosasih H, Wulan WN, et al. Diagnosis of COVID-19 in a Dengue-Endemic Area. Am J Trop Med Hyg. 2020;103(3):1220–2. pmid:32762798

WILDER-SMITH, A; TISSEA, H; Ooi EE, COLOMA, J; SCOTT, T.W, GUBLER, D.J. Preventing Dengue Epidemics during the COVID-19 Pandemic. Am J Trop Med Hyg. 2020;103(2):570–1. pmid:32539912.