

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR SUPORTADA POR ALGORITMOS
DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PERMITE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES
MOLECULARES NO LÍQUIDO SINOVIAL EM MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO
PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

HUGO MOREIRA MACHADO

UBERLÂNDIA – MG

2024

Hugo Moreira Machado

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR SUPORTADA POR ALGORITMOS
DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PERMITE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES
MOLECULARES NO LÍQUIDO SINOVIAL EM MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO
PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador: Robinson Sabino da Silva

UBERLÂNDIA – MG

2024

Hugo Moreira Machado

**APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR SUPORTADA POR ALGORITMOS
DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PERMITE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES
MOLECULARES NO LÍQUIDO SINOVIAL EM MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO
PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora:

Presidente da Banca: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva - Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

1º Membro: Prof. Dr. Roberto da Cunha Luciano

2º Membro: Prof. Dr. Igor Santana de Melo

Suplente: Prof. Dr. Tiago de Castro e Couto

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M149 2024	Machado, Hugo Moreira, 1986- APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR SUPOSTADA POR ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PERMITE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NO LÍQUIDO SINOVIAL EM MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA [recurso eletrônico] / Hugo Moreira Machado. - 2024. Orientadora: Robinson Sabino Silva. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.574 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Ciências médicas. I. Silva, Robinson Sabino, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências da Saúde. III. Título. CDU: 61
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências da Saúde				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico Nº 11/PPGCSAUDE				
Data:	24.05.2024	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	15:31h
Matrícula do Discente:	12112CSD007				
Nome do Discente:	Hugo Moreira Machado				
Título do Trabalho:	APLICAÇÃO DE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR SUPORTADA POR ALGORITMOS DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL PERMITE DETECÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES NO LÍQUIDO SINOVIAL EM MODELO ANIMAL DE INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA				
Área de concentração:	Ciências da Saúde				
Linha de pesquisa:	Diagnóstico, Tratamento e Prognóstico das Doenças e Agravos à Saúde				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Intervenções de Estilo de Vida e Microbiota Intestinal				

Reuniu-se na sala 210E - Sala 210 - Campus Umuarama, pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Profs. Drs. Igor Santana de Melo (UFAL), Roberto da Cunha Luciano (UFU) e Robinson Sabino da Silva (UFU), orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa, Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente

ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robinson Sabino da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/05/2024, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Igor Santana de Melo, Usuário Externo**, em 24/05/2024, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberto da Cunha Luciano, Usuário Externo**, em 29/05/2024, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5432543** e o código CRC **0DBCA620**.

Referência: Processo nº 23117.034757/2024-71

SEI nº 5432543

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, à minha família pelo incentivo, aos meus pais pelo apoio fundamental para que eu chegasse até aqui, à minha madrinha Maria José que me acolheu com muito amor e carinho na cidade de Uberlândia, à minha companheira Anaísa que foi fundamental nessa jornada com sua paciência e dedicação. Ao Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva pelas orientações, dedicação e paciência que, com seus ensinamentos e competência, contribuiu para minha formação nessa importante etapa da minha vida que é o mestrado. Aos colegas do Grupo de Inovação em Diagnóstico e Salivar e Nanobiotecnologia da UFU, em especial ao Marco Guevara que foi importante para que eu obtivesse os conhecimentos necessários para a pesquisa.

A todos, minha eterna gratidão.

RESUMO

A infecção pelo vírus da Chikungunya (CHIKV) frequentemente se manifesta pela artralgia simétrica nas articulações periféricas, tenossinovite, inflamação nos ligamentos articulares e cerca de 60% dos pacientes podem desenvolver sintomas crônicos, o que pode impactar diretamente sua qualidade de vida. O diagnóstico correto da infecção por CHIKV é complexo e envolve técnicas de múltiplas etapas com reagentes de biologia molecular de alto custo laboratorial. Diante da necessidade de explorar abordagens inovadoras para a detecção da infecção por CHIKV no líquido sinovial, a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com Refletância Total Atenuada (ATR-FTIR) sem uso de reagentes tem se mostrado uma ferramenta promissora para identificação de moléculas relacionadas a presença de partículas virais neste fluido. Desta forma, este estudo teve como objetivo identificar alterações em grupos funcionais dos componentes do fluido sinovial usando a plataforma ATR-FTIR suportada por algoritmos de inteligência artificial para detectar potenciais lesões condrais e osteocondrais em modelo *in vivo* de infecção por CHIKV. Camundongos C57/BL6 (n=6) foram inoculados com 20 μL (1×10^5 FFU com CHIKV), enquanto camundongos do grupo controle (n=6) receberam 20 μL de placebo. O fluido sinovial foi coletado 7 dias após a infecção pelo CHIKV, e os espectros infravermelhos do líquido sinovial foram analisados em plataforma ATR-FTIR sem utilização de reagentes. O algoritmo de inteligência artificial Redes Neurais Artificiais teve acurácia de 83%, sensibilidade de 66% e especificidade de 100% para detectar alterações de composição do fluido sinovial induzidas pela infecção pelo CHIKV. Os três principais modos vibracionais utilizados no algoritmo para discriminar o líquido sinovial de camundongos infectados pelo CHIKV em comparação com os controles foram 1655 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} , todos relacionados com lipídeos. Assim, este estudo demonstrou o potencial da plataforma biofotônica para avançar na aplicação da espectroscopia ATR-FTIR em doenças ortopédicas, sendo pioneiro na obtenção de espectros infravermelhos do líquido sinovial. Estes achados destacam o potencial das plataformas ATR-FTIR suportadas por algoritmos de Redes Neurais Artificiais como uma ferramenta sustentável, sem reagentes, não invasiva e rápida para detectar alterações induzidas pela infecção por CHIKV no líquido sinovial.

Palavras chave: febre Chikungunya, biomarcadores, líquido sinovial, lesões articulares, redes neurais artificiais, inteligência artificial.

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) infection often manifests with symmetric arthralgia in peripheral joints, tenosynovitis, inflammation in joint ligaments, and approximately 60% of patients may develop chronic symptoms, directly impacting their quality of life. The correct diagnosis of CHIKV infection is complex and involves multi-step techniques with high-cost molecular biology reagents. Given the need to explore innovative approaches for CHIKV infection detection in synovial fluid, attenuated total reflectance Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy without the use of reagents has emerged as a promising tool for identifying molecules related to the presence of viral particles in this fluid. Thus, this study aimed to identify alterations in functional groups of synovial fluid components using the ATR-FTIR platform supported by artificial intelligence algorithms to detect potential chondral and osteochondral lesions in an in vivo model of CHIKV infection. C57/BL6 mice (n=6) were inoculated with 20 μL (1×10^5 FFU of CHIKV), while control group mice (n=6) received 20 μL of placebo. Synovial fluid was collected 7 days after CHIKV infection, and the infrared spectra of the synovial fluid were analyzed supported by artificial neural network algorithm classification. The results showed a sensitivity of 66%, specificity of 100%, and accuracy of 83% in detecting alterations in the CHIKV infection model. Identifying vibrational modes at 1655 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} , and 1060 cm^{-1} related to lipids could be used to discriminate synovial fluid from CHIKV-infected mice compared to controls. Thus, this study demonstrated the potential of the biophotonic platform to advance the application of ATR-FTIR spectroscopy in orthopedic diseases, pioneering in obtaining infrared spectra of synovial fluid. These findings highlight the potential of ATR-FTIR platforms supported by artificial neural network algorithms as a sustainable, reagent-free, non-invasive, and rapid tool for detecting alterations induced by CHIKV infection in synovial fluid.

Keywords: Chikungunya fever, biomarkers, synovial fluid, joint lesions, artificial neural networks, artificial intelligence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Testes diagnósticos para a detecção do Chikungunya vírus (CHIKV)	17
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dinâmica espaço-temporal da Febre Chikungunya entre 2013 e 2022 no Brasil (DE SOUZA <i>et al.</i> , 2023)	13
Figura 2. Articulações mais atingidas na artralgia crônica decorrente da FC (SUHRBIER, 2019)	15

LISTA DE ABREVIATURAS

μl: Microlitros (10^{-6} litros)

μm: Micrômetros (10^{-6} metros)

ATR-FTIR: Espectrometria de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier

cDNA: DNA complementar

CHIKV: vírus da Chikungunya

cm⁻¹: comprimento de onda

DNA: ácido desoxirribonucleico

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FC: Febre Chikungunya

FFU: (*Focus-Forming Unit*) Unidade formadora de foco

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

IL-6: interleucina 6

MCP-1: proteína quimiotática de monócitos-1

MIP-1: proteína inflamatória de macrófagos-1

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: (*reverse transcription polymerase chain reaction*) Reação de Transcriptase combinada com a Reação em Cadeia da Polimerase

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1. Febre Chikungunya (FC): aspectos epidemiológicos	12
2.2. Febre Chikungunya (FC): aspectos reumatológicos	14
2.3. Diagnóstico da FC	16
2.4. 18	
2.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	19
3. OBJETIVOS	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos específicos	20
4. ARTIGO	21
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

A Febre Chikungunya (FC) é causada pelo vírus da Chikungunya (CHIKV), do gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* (Gould *et al.*, 2017). Após a fase aguda da doença, cerca de 40% a 59% dos pacientes desenvolvem sintomas crônicos após a infecção pelo CHIKV, incluindo dores, artrite inflamatória e distúrbios relacionados, que podem implicar em danos articulares irreversíveis (Amaral *et al.*, 2023; Rodríguez-Morales *et al.*, 2016). Assim, a FC está associada a elevada morbidade devido à artralgia persistente que pode levar à incapacidade e, consequentemente, redução da qualidade de vida (Cardona-Ospina; Diaz-Quijano; Rodríguez-Morales, 2015; Marimoutou *et al.*, 2015).

O diagnóstico laboratorial da FC envolve exames clínicos e procedimentos laboratoriais de alto custo que estão disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) e deve ser acompanhado por um médico para confirmar a infecção pelo vírus e Moreira *et al.*, 2022; PAHO, 2022). As técnicas mais comumente utilizadas incluem a detecção do material genético viral por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) em amostras de sangue. Outros biofluidos corporais podem ser utilizados, incluindo o fluido sinovial e testes sorológicos (por exemplo, teste imunoenzimático) que permite a identificação de anticorpos específicos contra CHIKV produzidos pelo hospedeiro em resposta à infecção (Fischer *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2022; PAHO, 2022). Além disso, em casos raros de complicações neurológicas, pode ser necessária a análise do líquido cefalorraquidiano (LCR) para a detecção do material genético viral ou a realização de técnicas de imuno-histoquímica em amostras de tecido (Mehta *et al.*, 2018). A combinação dessas técnicas laboratoriais desempenha um papel fundamental no diagnóstico preciso da FC, permitindo a escolha da terapêutica adequada e o monitoramento da disseminação do vírus (PAHO, 2022).

Diante da complexidade e importância do diagnóstico correto, torna-se imprescindível a exploração de abordagens inovadoras, englobando o desenvolvimento de técnicas avançadas de pesquisa de biomarcadores em diferentes fluidos e tecidos biológicos, aliadas a novas metodologias. O fluido sinovial das articulações é um potencial candidato, pois as partículas virais podem permanecer nas cavidades das articulações sinoviais apesar da eficácia da resposta imune do hospedeiro, levando a alterações na patologia articular e, consequentemente, relacionado diretamente a fase crônica da doença (Srivastava *et al.*, 2020). Além disso, a identificação do perfil molecular do fluido sinovial após infecção pelo CHIKV ainda é incipiente, o que pode ser também aplicado na busca de preditores da FC para a fase crônica

tornando-se de grande importância clínica (Ferreira *et al.*, 2021; Gualberto Cavalcanti *et al.*, 2019; Sepúlveda-Delgado *et al.*, 2017).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) associada a reflectância total atenuada (ATR) é uma técnica robusta que pode apresentar alta sensibilidade e reprodutibilidade para detectar grupos funcionais específicos de moléculas em uma amostra biológica sem a necessidade de destruição dos componentes celulares ou utilização de reagentes químicos, fornecendo resultado de forma célere com baixo custo de processamento de amostra (Baker *et al.*, 2014; Butler *et al.*, 2019; Caixeta *et al.*, 2023). Portanto, através da identificação de espectros moleculares na análise do fluido sinovial, é possível proporcionar a indicação de componentes moleculares relacionados a efeitos diretos ou indiretos da FC na nas cavidades das articulações sinoviais, o que pode também estar associado a osteoartrite, juntamente com lesões condrais e osteocondrais associadas. Além de evitar complicações de curto e longo prazo, a identificação destes marcadores espectrais da FC no fluido sinovial apresenta potencial para redução de custos de saúde pública e, principalmente, contribuir para melhor qualidade de vida dos pacientes com essa condição médica crônica. O objetivo deste estudo foi identificar o perfil espectral em grupos funcionais dos componentes do fluido sinovial para desenvolvimento de algoritmos de inteligência artificial suportados em plataformas de ATR-FTIR para detectar lesões condrais e osteocondrais em modelo *in vivo* de infecção por CHIKV.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Febre Chikungunya (FC): aspectos epidemiológicos

A FC é causada pelo CHIKV, tendo um efeito considerável na qualidade de vida dos pacientes com doença crônica (Amaral *et al.*, 2023). Classificado como arbovírus, os quais possuem artrópodes (principalmente mosquitos) como vetores, o CHIKV se destaca devido ao seu impacto clínico global, juntamente com o Zika vírus (ZIKV) e o vírus da dengue (DENV) (Hakim *et al.*, 2022). Em relação a sua taxonomia, o CHIKV está incluído no gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* (Gould *et al.*, 2017).

A principal forma de transmissão de FC em humanos ocorre pela picada da fêmea do mosquito *Aedes aegypti* ou *A. albopictus* infectada por CHIKV (Weaver; Chen; Diallo, 2020). Contudo, essa patologia também pode ocorrer por transmissão vertical, gerando nos recém-nascidos quadros graves, como encefalite (Ferreira *et al.*, 2021; Ritz; Hufnagel; Gérardin, 2015). O período médio de incubação do CHIKV é de quatro a sete dias e pode evoluir em três fases: aguda (até 14 dias), sub-aguda (15 dias a três meses) e crônica (mais de três meses) (Bartholomeeusen *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2017; Rudolph *et al.*, 2014).

Os primeiros relatos da infecção pelo CHIKV ocorreram em uma epidemia na Tanzânia em 1952, caracterizada como uma doença febril, exantemática, com frequente artralgia grave e associada à dor prolongada nas articulações (Robinson, 1955). A palavra Chikungunya é derivada da língua local da Tanzânia e significa “aquele que se dobra”, em referência à posição encurvada dos indivíduos que sofriam das dores intensas causadas pela FC (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). O CHIKV é enzoótico, primitivamente encontrado em regiões tropicais e subtropicais como a África, a Ásia e a América do Sul (Zeller; Van Bortel; Sudre, 2016).

No Brasil, os primeiros casos confirmados da FC ocorreram em 2013 na região Norte, e nos anos seguintes, a doença expandiu-se, atingindo outros Estados da Federação como Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais (Nunes *et al.*, 2015). Segundo pesquisa realizada por Souza e colaboradores (2023), entre março de 2013 e junho de 2022, ocorreram 253.545 casos de FC confirmados laboratorialmente e notificados no país. Eles foram distribuídos principalmente em sete grandes ondas epidêmicas entre 2016 e 2022 que resultaram entre 24.097 e 44.604 casos confirmados anualmente. Desde 2014, todas as macrorregiões do Brasil foram afetadas pela FC com predomínio das regiões Norte e Nordeste (Figura 1).

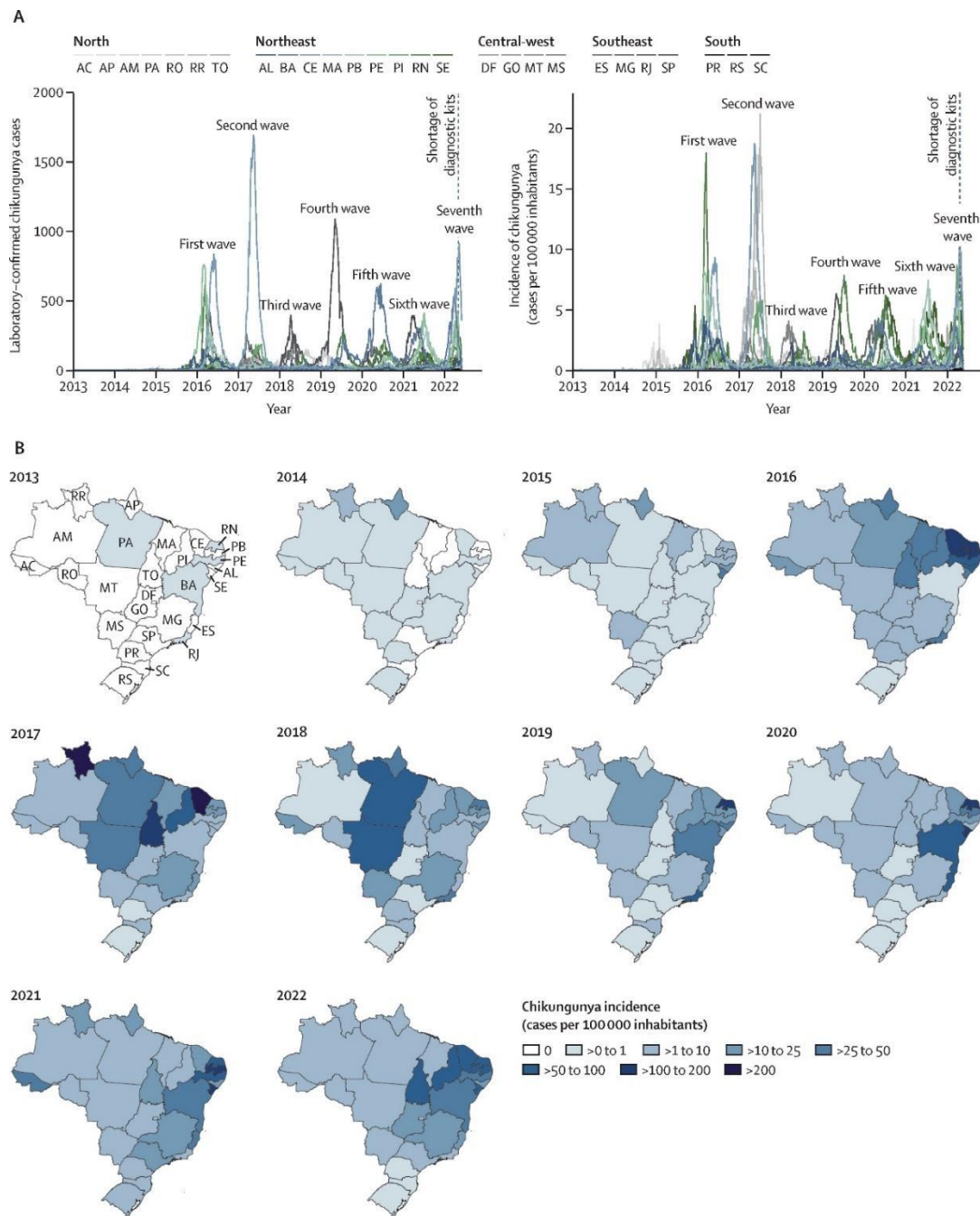


Figura 1. Dinâmica espaço-temporal da Febre Chikungunya entre 2013 e 2022 no Brasil (De Souza *et al.*, 2023).

Neste contexto, Marques e colaboradores (2017) apontaram que foram registrados 236.287 casos prováveis de infecção por CHIKV e apenas 116.523 casos confirmados sorologicamente em 2016. A região Nordeste apresentou o maior número de casos prováveis, sendo 76,5% em relação ao total das outras regiões do país, com prevalência de óbitos de 84,4% do total registrado no país neste mesmo ano (Brasil, 2017). Sabe-se que em uma quantidade significativa de casos, especialmente dentro dos serviços públicos de saúde, a confirmação do

diagnóstico molecular ou sorológico não é realizada, o que favorece uma relação alta de casos prováveis em relação aos casos confirmados.

A FC pode afetar pessoas de qualquer idade e sexo, contudo sua severidade é frequentemente maior em crianças, idosos e gestantes (Fajardo *et al.*, 2021; Foeller *et al.*, 2021; Matos *et al.*, 2020). Como principais fatores de risco para FC estão incluídos: sexo feminino, idade superior a 40 anos, presença de comorbidades como diabetes mellitus, doença articular prévia, como por exemplo a osteoartrite (Adams *et al.*, 2022; Dalvi *et al.*, 2023; PAHO, 2022; Rodríguez-Morales *et al.*, 2016). Os principais sintomas da FC são febre de início abrupto (maior que 39°C), astenia, mialgia, cefaleia, exantema maculopapulares (tronco, regiões palmar, plantar e facial), artralgia. Além disto, outras manifestações clínicas como cansaço, fraqueza e depressão foram descritas na FC (Suhriebier, 2019).

Embora raras, as complicações graves da FC incluem distúrbios vasculares periféricos, como a síndrome de Raynaud; manifestações neurológicas como encefalopatia, mielite, encefalite, mielopatia, encefalomielite disseminada de forma aguda, síndrome de Guillain-Barré, outras complicações neuro-oculares; manifestações cardiovasculares como miocardite, taquicardia, angina, fadiga, dispneia e estimulação vagal (Cavalcanti *et al.*, 2022; Mehta *et al.*, 2018; Milhim *et al.*, 2022; Pavon *et al.*, 2022). A ocorrência de óbitos decorrentes de FC são pouco frequentes, mas podem acometer mais comumente idosos com comorbidades e crianças (Cerbino-Neto *et al.*, 2020).

2.2. Febre Chikungunya (FC): aspectos reumatológicos

Achados reumatológicos são descritos em todas as fases da FC e podem persistir por longos períodos, o que está associado com lesões condrais e osteocondrais decorrente da inflamação articular crônica. Adicionalmente, a erosão de componentes articulares também apresenta grande importância clínica (Gomes; Amorim, 2021). Desta forma, indivíduos acometidos por quadros crônicos após FC podem ficar incapacitados devido à dor, fragilidade, edema e a rigidez, o que dificulta a realização de atividades diárias do seu cotidiano e, consequentemente, reduzindo sua qualidade de vida (Bragginton; Piddock, 2014; De Brito, 2017).

Considerando que cerca de metade dos casos de FC podem evoluir da fase aguda para um quadro de cronicidade, é importante a detecção de alterações moleculares no fluido sinovial em pacientes que apresentam uma série de sintomas reumáticos, incluindo poliartrite distal, exacerbação da dor em articulações e em ossos previamente sensíveis, tenossinovite

hipertrofica subaguda nos punhos e tornozelos, dor neuropática e síndrome do túnel do carpo (Amaral *et al.*, 2023; Goupil; Mores, 2019; Marques *et al.*, 2017). Além disso, podem ocorrer derrame articular, erosões e edemas ósseos, espessamento sinovial e destruição osteoarticular, levando a complicações graves como lesões condrais e osteocondrais (Bartholomeeusen *et al.*, 2023; Castro; Lima; Nascimento, 2016; Chaaithanya *et al.*, 2014; Suhrbier, 2019). Assim como na fase aguda, a artralgia crônica decorrente da FC envolve, principalmente, as articulações periféricas. A artropatia geralmente não é erosiva (Figura 2) (Suhrbier, 2019).

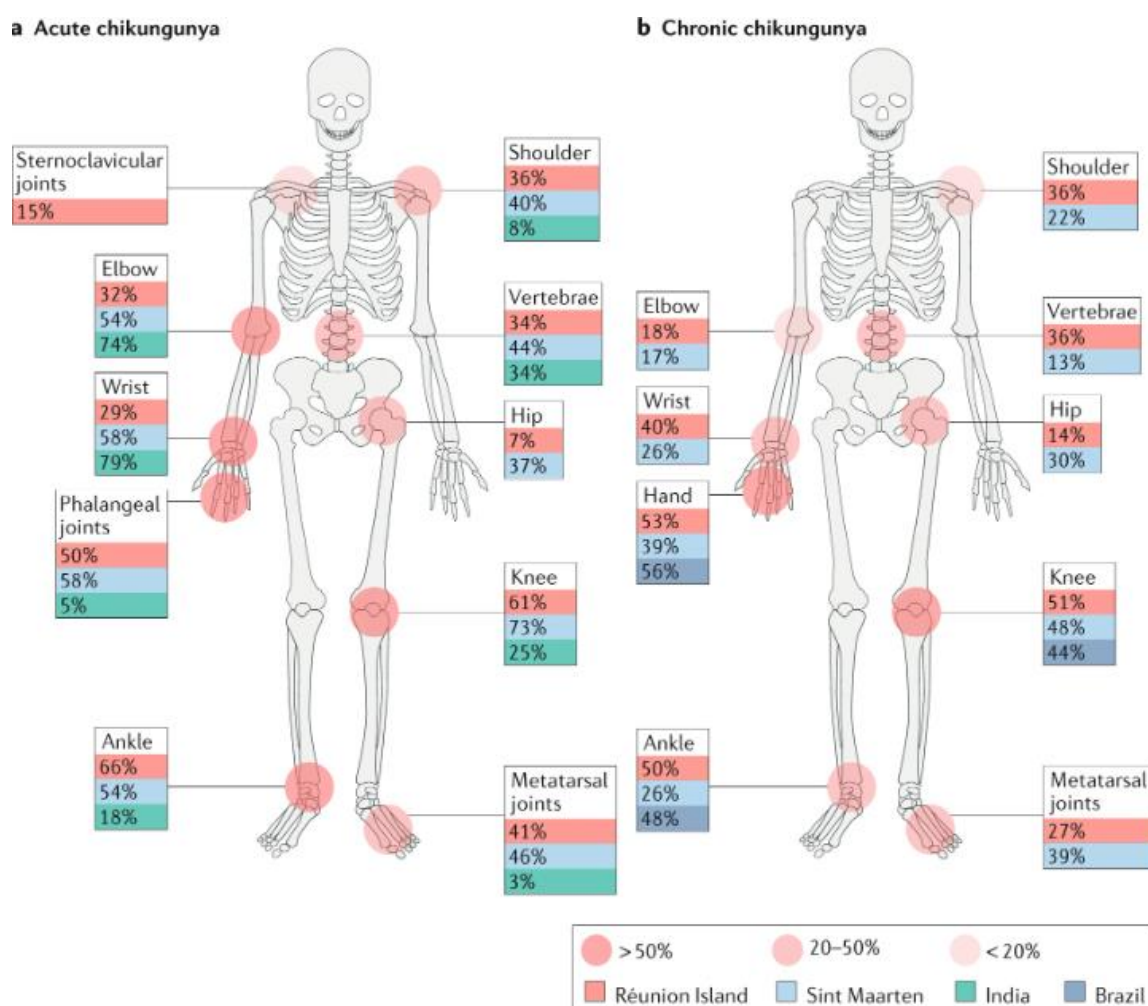


Figura 2. Articulações mais atingidas na artralgia crônica decorrente da FC (Suhrbier, 2019).

Em estudo realizado por Matthew *et al.* (2011), foi evidenciado que 57% dos pacientes infectados por CHIKV apresentaram sintomas crônicos, incluindo poliartrite crônica (22%) e tenossinovite crônica (19,5%), cerca de 15 meses após a infecção. Outro estudo relatou que

após 26 semanas de infecção, 53,7% dos pacientes apresentaram sintomas como rigidez (49,5%), inchaço (40,6%) e eritema (16,6%) nas articulações (Rodriguez-Morales *et al.*, 2016).

Os fatores de risco para desenvolvimento da doença crônica incluem idade acima de 45 anos e carga viral elevada durante a fase aguda (Suhriebier, 2019; Zaid *et al.*, 2018). Além disso, os fatores predisponentes para doença crônica compreendem comorbidades tais como osteoartrite e diabetes. Embora as variáveis como porcentagem, duração e avaliação da doença crônica variam amplamente entre os estudos, outros estudos demonstraram que a maior severidade da infecção por CHIKV na fase aguda indica um prognóstico de desenvolvimento de artrite crônica. As mensurações foram realizadas por meio de índices estabelecidos por órgãos internacionais e pelos níveis séricos de determinados marcadores clínicos de lesões (Paixão *et al.*, 2018; Sepúlveda-Delgado *et al.*, 2017).

Apesar da FC ser uma arbovirose associada a maior grau de manifestação reumatológica, ainda são escassas pesquisas relacionados a essa temática (Castro; Lima; Nascimento, 2016). Com a instalação da doença no Brasil, os casos graves e a ocorrência de óbitos vêm aumentando, refletindo uma maior demanda por serviços de saúde e crescente necessidade de recursos financeiros e humano, especialmente na área de reumatologia, no intuito de minimizar seus efeitos ao paciente e a sociedade (Gomes; Amorim, 2021). Diante disso, é fundamental que os profissionais de saúde fiquem atentos para o diagnóstico clínico, presença de lesões articulares associadas a infecção pelo CHIKV e terapêutica adequada da FC.

2.3. Diagnóstico da FC

Devido ao diagnóstico clínico da FC ser complexo e com potencial para ser confundido com o de outras arboviroses, o diagnóstico assertivo requer o uso de técnicas laboratoriais moleculares ou sorológicas, como descrito na Tabela 1 (Bartholomeeusen *et al.*, 2023). Durante a fase aguda da infecção, a técnica mais utilizada é a detecção do RNA viral por meio da RT-PCR em amostras de sangue ou outros fluidos corporais (Da Silva, 2019; Licínio; Ayres, 2021; Rêgo, 2017). Posteriormente ao pico da viremia, o diagnóstico da FC é realizado por meio de testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos contra o CHIKV (PAHO, 2022).

A técnica de RT-PCR tem a capacidade de amplificar, isolar e identificar sequências de RNA, cujo princípio é converter o RNA viral em sua sequência de DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa, seguido da síntese de uma segunda cadeia de DNA pela enzima DNA polimerase e, por fim, gerar uma molécula de cDNA de fita dupla que pode ser amplificada por PCR (Rashtchian, 1994). A RT-PCR é uma técnica altamente específica e

sensível, sendo especialmente adequada para detectar um pequeno número de cópias do RNA-alvo (Licínio; Ayres, 2021). Contudo, a utilização desta técnica demanda longo tempo para liberação de resultados e requer o uso de enzimas e reagentes de alta qualidade, o que acarreta alto custo para diagnósticos (Da Silva, 2019).

Para a pesquisa de anticorpos específicos, a principal técnica disponível é o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que parte do princípio básico de imunologia em que um antígeno se liga ao seu anticorpo específico, permitindo sua detecção em quantidades muito reduzidos inclusive em escala picomolar (Lequin, 2005). Os testes sorológicos permitem a identificação de anticorpos IgM específicos para CHIKV a partir do segundo dia após o início dos sintomas e a detecção da IgG que pode ser detectada a partir do sexto dia após início da sintomatologia (Lima *et al.*, 2021). No entanto, o desempenho dos ensaios sorológicos tem demonstrado alta variabilidade, com potencial para resultados falsos positivos devido a reatividade cruzada com anticorpos de outras arboviroses (Bartholomeeusen *et al.*, 2023).

Tabela 1. Testes diagnósticos para a detecção do Chikungunya vírus (CHIKV).

Teste	Alvo	Interpretação	Vantagens	Limitações
Análise molecular	RNA viral	Infecção aguda	Alta sensibilidade e especificidade, multiplex, rápido resultado (1-3h)	Alto custo de reagentes e equipamentos
Sorologia	Anticorpos IgM	Títulos de anticorpos	Disponíveis como ensaios laboratoriais ou testes rápidos usados fora de laboratórios	Reação cruzada com outros <i>Alphavirus</i>
	IgM/IgG	Evidência definitiva de infecção	Investigação retrospectiva	Requer segunda coleta após 7-14 dias de infecção

(Adaptado de Bartholomeeusen *et al.*, 2023)

Adicionalmente, achados laboratoriais anormais podem incluir trombocitopenia leve ($>100.000/\text{mm}^3$), leucopenia e testes de função hepática elevados, além de elevação da taxa de sedimentação de eritrócitos e proteína C (Brasil, 2017). As alterações histopatológicas sinoviais observadas em pacientes acometidos por FC são semelhantes às encontradas em pacientes com artrite reumatoide ou outras artropatias inflamatórias crônicas, hiperplasia sinovial, proliferação vascular e infiltração de macrófagos perivasculares (Amaral *et al.*, 2023; Marques *et al.*, 2017).

O diagnóstico de osteoartrite é realizado tomando como base quatro pontos principais: quadro clínico apresentado pelo paciente, exame físico, fatores predisponentes, e análise de exames de imagem (Abramoff; Caldera, 2020; Sinusas, 2012). Atualmente, o diagnóstico não-invasivo mais assertivo para avaliar articulações é a realização de ressonância magnética (Culvenor *et al.*, 2019). O aumento da acessibilidade aos exames de ressonância magnética resultou em rápido aumento na sua utilização para auxiliar o tratamento clínico de pacientes com sintomas relacionados a doenças reumatológicas (Braun; Gold, 2012; Espeland *et al.*, 2007).

Anualmente, são gastos mais de 14 bilhões de dólares nos Estados Unidos em exames de diagnóstico por imagem, embora o benefício clínico geral do uso da ressonância magnética ainda não esteja evidente (Culvenor *et al.*, 2019; Iglehart, 2009). Diante deste alto custo, faz-se necessária a busca por novos métodos de detecção e monitoramento para possíveis lesões condrais, osteocondrais e de osteoartrite decorrentes da FC.

2.4. Biomarcadores

Biomarcadores podem ser moléculas que podem ser mensuradas em tecidos ou biofluidos para indicar a ocorrência de doenças (WHO, 2001). O avanço nas pesquisas de biomarcadores utilizando diversos fluidos e tecidos biológicos tem sido associado com a evolução de novas ferramentas metodológicas que permitem a identificação, detecção e quantificação de moléculas associada a uma determinada doença. A capacidade de detecção em larga escala é uma vantagem importante destas ferramentas que têm sido associadas às análises espectroscópicas para uma variedade de doenças (Guo *et al.*, 2020; Scherf *et al.*, 2010; Strimbu; Tavel, 2010). A identificação dos biomarcadores é efetiva quando apresentam alta acurácia na detecção de doenças e, preferencialmente, devem ser detectados por ferramentas de fácil acesso, baixo custo e ter reprodutibilidade (CALIFF, 2018).

Em relação à FC, sabe-se que, na fase aguda da doença, várias citocinas são aumentadas, como a interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1) e proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1); enquanto na convalescença, níveis mais baixos dessas citocinas foram observados (CHIRATHAWORN *et al.*, 2013). No entanto, as pesquisas direcionadas para análise de citocinas inflamatórias ou outro tipo de biomarcadores rotineiramente utilizado para prever a evolução da FC em condições graves ou crônicas são escassas (FERREIRA *et al.*, 2021). Sendo assim, considerando o potencial de aumento da

prevalência da FC e seu potencial de evoluir para casos graves e cronicidade, a identificação de biomarcadores que possam prever o prognóstico é de grande importância. Destaca-se que a presença de marcadores baseados em citocinas inflamatórias não é o ideal, pois diferentes outras doenças, incluindo arboviroses, são capazes de alterar o perfil inflamatório nos indivíduos afetados. Citocinas e quimiocinas são secretadas por condrócitos, células sinoviais e outras células das articulações e pode ser detectado no fluido sinovial dos pacientes (Gao *et al.*, 2020), reiterando a importância do seu estudo no diagnóstico precoce de osteoartrite e consequente lesões condrais e osteocondrais de pacientes com FC.

2.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Biospectroscopia é o uso de técnicas espectroscópicas na análise de amostras biológicas (Baker *et al.*, 2014; Naseer; Ali; Qazi, 2021). A espectroscopia ATR-FTIR é uma técnica que utiliza um cristal (diamante) de tamanho reduzido com cerca de 250 µm em contato com a amostra analisada. Em seguida, um feixe de radiação infravermelha passa através do cristal, onde ocorre reflexão total interna, sem ocorrer refração. A reflexão gera uma onda evanescente que penetra a amostra a uma profundidade de alguns micrômetros de acordo com a característica de cada amostra. Dessa forma, a amostra absorve a radiação infravermelha, e essa absorção é detectável, gerando um espectro característico da amostra (Kazarian; Chan, 2006; Kelly *et al.*, 2011).

Os potenciais biomarcadores derivados de grupos funcionais presentes em proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos, apresentam modos vibracionais na faixa do infravermelho médio (Bunaciu; Hoang; Aboul-Enein, 2017). Portanto, o uso da espectroscopia oferece uma série de benefícios, como a possibilidade de desenvolver uma nova plataforma de detecção, permitindo uma subsequente estratégia terapêutica mais precoce que visa melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, tal ferramenta pode contribuir significativamente para a otimização dos recursos econômicos dos sistemas de saúde (Baker *et al.*, 2014). Como os modos vibracionais são considerados impressões bioquímicas, a utilização do fluido sinovial como fluido diagnóstico pode relacionar a presença ou ausência de lesões condrais e osteocondrais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar alterações em grupos funcionais dos componentes do fluido sinovial usando a plataforma ATR-FTIR suportada por algoritmos de inteligência artificial para detectar potenciais lesões condrais e osteocondrais em modelo *in vivo* de infecção por CHIKV.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar o perfil espectral de infravermelho para detectar componentes biológicos de infecção pelo CHIKV no fluido sinovial;
- Comparar os componentes do fluido sinovial por espectroscopia de infravermelho em modelos *in vivo* para identificar potenciais biomarcadores para diagnóstico ou triagem de lesões condrais e osteocondrais decorrentes da infecção pelo CHIKV.

4. ARTIGO

Reagent-free ATR-FTIR spectroscopy to detect changes in synovial fluid in an animal model of Chikungunya virus infection

Hugo Moreira¹, Marco Guevara-Vega¹, Rafael Borges Rosa², Douglas Carvalho Caixeta¹, Rayany Souza¹, Mariana Araújo Costa¹, Murillo Guimarães Carneiro³, Robinson Sabino-Silva^{1*}

- ^{1.} Innovation Center in Salivary Diagnostic and Nanobiotechnology, Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.
- ^{2.} Rodents Animal Facilities Complex, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil & Department of Virology, Aggeu Magalhães Institute (IAM), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil.
- ^{3.} Faculty of Computing, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

***Corresponding Author:**

Robinson Sabino-Silva; Federal University of Uberlandia (UFU), Institute of Biomedical Sciences (ICBIM), ARFIS, Av. Pará, 1720, Campus Umuarama, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract

Chikungunya virus infection frequently exhibits symmetric arthralgia in peripheral joints, tenosynovitis, and inflammation in joint ligaments, which impact quality of life. The detection of changes in synovial fluid typically involves high-cost imaging tests. This study aimed to identify changes in functional groups of synovial fluid components using the ATR-FTIR platform to detect chondral and osteochondral injuries in an *in vivo* model of Chikungunya virus infection. Thus, male interferon-gamma gene knockout C57/BL6 mice were inoculated in the left rear footpad with 20 μ L, 1×10^5 FFU with chikungunya virus (CHIKV), and vehicle mice received a placebo (20 μ L). Synovial fluid was collected 7 days after CHIKV infection, and the infrared spectra of synovial fluid supported with the Artificial Neural Networks algorithm classification showed a sensitivity of 66%, specificity of 100%, and accuracy of 83% to detect changes in the CHIKV infection model.

Keywords: Chikungunya, synovial fluid, ATR-FTIR, biomarkers

1. Introduction

The Chikungunya virus (CHIKV) is a member of the *Alphavirus* genus and *Togaviridae* family responsible for causing Chikungunya Fever¹. In 1950, CHIKV was first recorded in Africa, and this virus is usually transmitted to humans by bites of CHIKV-infected *Aedes* spp. mosquitos. *A. aegypti* and *A. albopictus* are vectors of CHIKV in both tropical and subtropical areas²⁻⁴. CHIKV presents a single-stranded positive RNA genome with 11.8 kb, responsible for encoding capsid proteins and phospholipid cellular membrane⁵. CHIKV infection occurs in all age groups for both genders. Most CHIKV outbreaks were reported in Africa, the Americas, and Asia^{6,7}.

Infected-CHIKV subjects frequently exhibit a sudden-onset febrile condition associated with arthralgia, muscle pain, headache, asthenia, and a skin rash. Subsequently, impairment in mobility is accompanied by symmetric arthralgia in peripheral joints, tenosynovitis, inflammation in ligaments and tendons, periarticular swelling, and acute arthritis in interphalangeal joints, ankles, and wrists, which impact quality of life⁸. In this context, CHIKV-animal models provide pathogenesis similar to human CHIKV infection. The subcutaneous footpad inoculation of CHIKV in adult wild-type immunocompetent C57BL/6 mice with pathogenic strains of CHIKV results in acute foot swelling, myositis, tenosynovitis, and arthritis^{9,10}.

Although there are studies evaluating changes in components of biofluids, including serum, plasma, and saliva, the molecular profile of synovial fluid during CHIKV infection remains not fully elucidated. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) is a sustainable, label-free, non-destructive, rapid, cost-effective, and reproducible bioanalytical approach capable of providing molecular component analysis without cell disruption¹¹. The infrared fingerprint profile of synovial fluid during CHIKV infection can provide potential identification of phenotypic changes in the course of CHIKV infection. This biophotonic platform based on ATR-FTIR spectroscopy detects vibrational modes derived from cytokines, collagen, carbohydrates, proteins, lipids, and nucleic acids¹¹. Unique molecules used as biomarkers occur directly by the presence of pathogens or by secondary immunological responses¹². In addition, identifying novel infrared markers detected by portable ATR-FTIR devices can reduce public healthcare costs in disease detection.

In this context, we hypothesize that a specific infrared profile of synovial fluid can detect chondral and osteochondral changes promoted by Chikungunya virus infection. This study aimed to identify changes in functional groups of synovial fluid components using the ATR-

FTIR platform to detect chondral and osteochondral changes in an *in vivo* model of Chikungunya virus infection.

Material and methods

Animal experiment

All experiments were performed following the guidelines provided by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL) in their manual for the care and utilization of laboratory animals. The ethical committee for animal research at the Federal University of Uberlandia (UFU) approved the experimental procedures regarding the handling, usage, and euthanasia (License #CEUA-UFU No. 023/2021), following the ethical principles established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

The experimental producers were conducted using male interferon-gamma gene knockout C57/BL6 mice (31,6g) divided into vehicle (n = 6) and CHIKV (n = 6). CHIKV mice was inoculated in the left rear footpad with 1×10^5 FFU (20 μ L), and vehicle mice received physiological saline [sodium chloride 0.9%] sterile solution (20 μ L). The animals were allowed free access to standard diet and water at the Center for Bioterism and Experimentation (REBIR) at the Federal University of Uberlandia (UFU).

Synovial fluid collection

On Day 7, both vehicle and CHIKV animals were anesthetized with 12 mg/kg of xylazine and 80mg/kg of ketamine. For each animal, within approximately 15 minutes after that, synovial fluid was collected in each joint cavity by washing with PBS.

ATR-FTIR Spectroscopy, spectra data processing

The spectra were processed using Orange 3.3.5 software (Bioinformatics Lab at the University of Ljubljana, Slovenia). The average was obtained with normalized spectra derived from raw spectra, and the baseline was corrected by the Rubberband method to avoid errors during sample preparation and spectra analysis. Subsequently, the spectral data were truncated with the lipidic region (3050 - 2800 cm^{-1}) associated with the fingerprint region (1800 - 900 cm^{-1}) as input data for the Hierarchical Clustering analysis (HCA) and multivariate analysis using principal component analysis (PCA). PCA was applied to the initial exploratory analysis

of the spectral data. The PC was assembled in this analysis with scores (deviation in sample orientation) and loadings (variance in the wavenumber direction).

Predictive Analysis Method

The infrared spectral data analysis was divided into pre-processing and classification. Pre-processing consisted of aggregation, attribute selection, and data transformation. The spectral readings of each sample were performed in aggregation. The spectral data were truncated with the lipidic region ($3050 - 2800 \text{ cm}^{-1}$) associated with the fingerprint region ($1800 - 900 \text{ cm}^{-1}$). They were pre-processed considering an attribute selection method as Raw data, Gaussian smoothing + PCA denoising + Vector normalization, Gaussian smoothing + PCA denoising + Min-Max normalization, and PCA denoising + Min-Max normalization. Finally, artificial intelligence tools were applied, most notably machine learning with AdaBoost, Artificial Neural Networks, Logistic Regression, Naïve Bayes, Random Forest, and Support Vector Machine algorithms.

2. Results

Figure 1 depicts a representative infrared average spectrum of synovial fluid of control and CHIKV mice. The infrared spectra of synovial fluid indicate the presence of several vibrational modes of lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids. The synovial fluid spectra also revealed a distinct profile between control and CHIKV samples, connecting the lipidic region ($3050\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$) with the fingerprint region ($1800\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$) in both control and CHIKV mice.

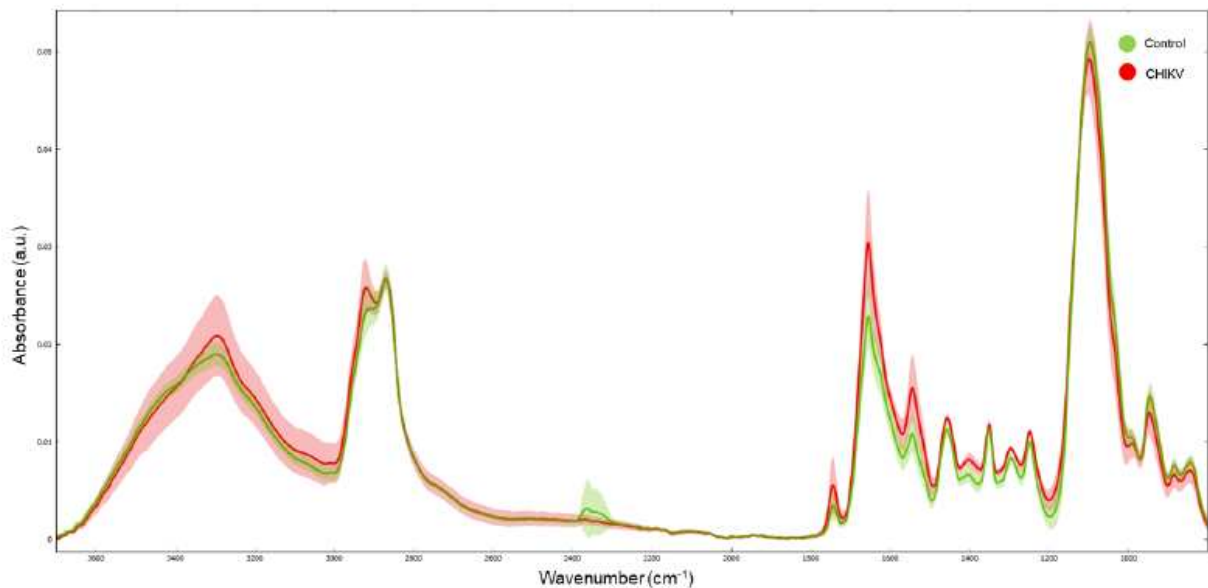


Figure 1. Representative average ATR-FTIR spectra (3700–800 cm^{-1}) in synovial fluid of control and CHIKV mice.

Changes in the infrared spectral range were determined using hierarchical clustering analysis (HCA). The HCA dendrogram indicates moderate discrimination in synovial fluid samples.

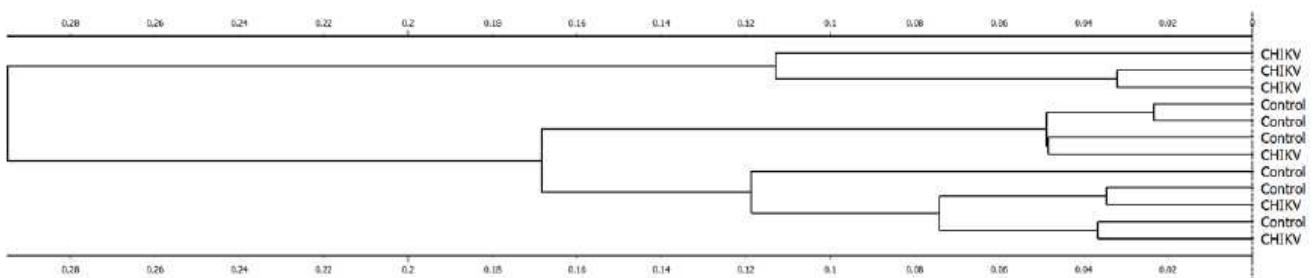


Figure 2. Hierarchical Cluster Analysis (HCA) for infrared spectra in synovial fluid of control and CHIKV mice.

Subsequently, another exploratory analysis was performed to identify changes in the infrared spectra of synovial fluid from control and CHIKV mice. The differentiation of the synovial fluid spectra of control and CHIKV mice was indicated by the Principal Component Analysis (PCA). Three principal components (PC) named PC1, PC2, and PC3 explained 96% of cumulative variance. Both PC1 (72.5% of explained variance) and PC2 (19.2% of explained variance) are represented in the scores plot (91.7% of the data matrix variance in Figure 3A).

The PCA loadings to PC1, PC2, and PC3 are represented in Figure 3B. The most distinguished absolute coefficients were: 1655 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} , and 1060 cm^{-1} in PC1; 2923 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} , 1144 cm^{-1} , and 1060 cm^{-1} in PC2; and 2923 cm^{-1} , 2882 cm^{-1} , 1744 cm^{-1} , 1110 cm^{-1} , and 1024 cm^{-1} in PC3. The coefficient scores evaluated in PC1 could be responsible for discrimination by the best algorithm to discriminate CHIKV mice. As an outcome, the main vibrational modes were 1655 cm^{-1} (C=O stretching, C-N stretching, and N-H bending of Amide I), 1543 cm^{-1} (C-N stretching and CHN bending vibrations of Amide II), and 1060 cm^{-1} (C-C and COC stretching of sugar moieties).

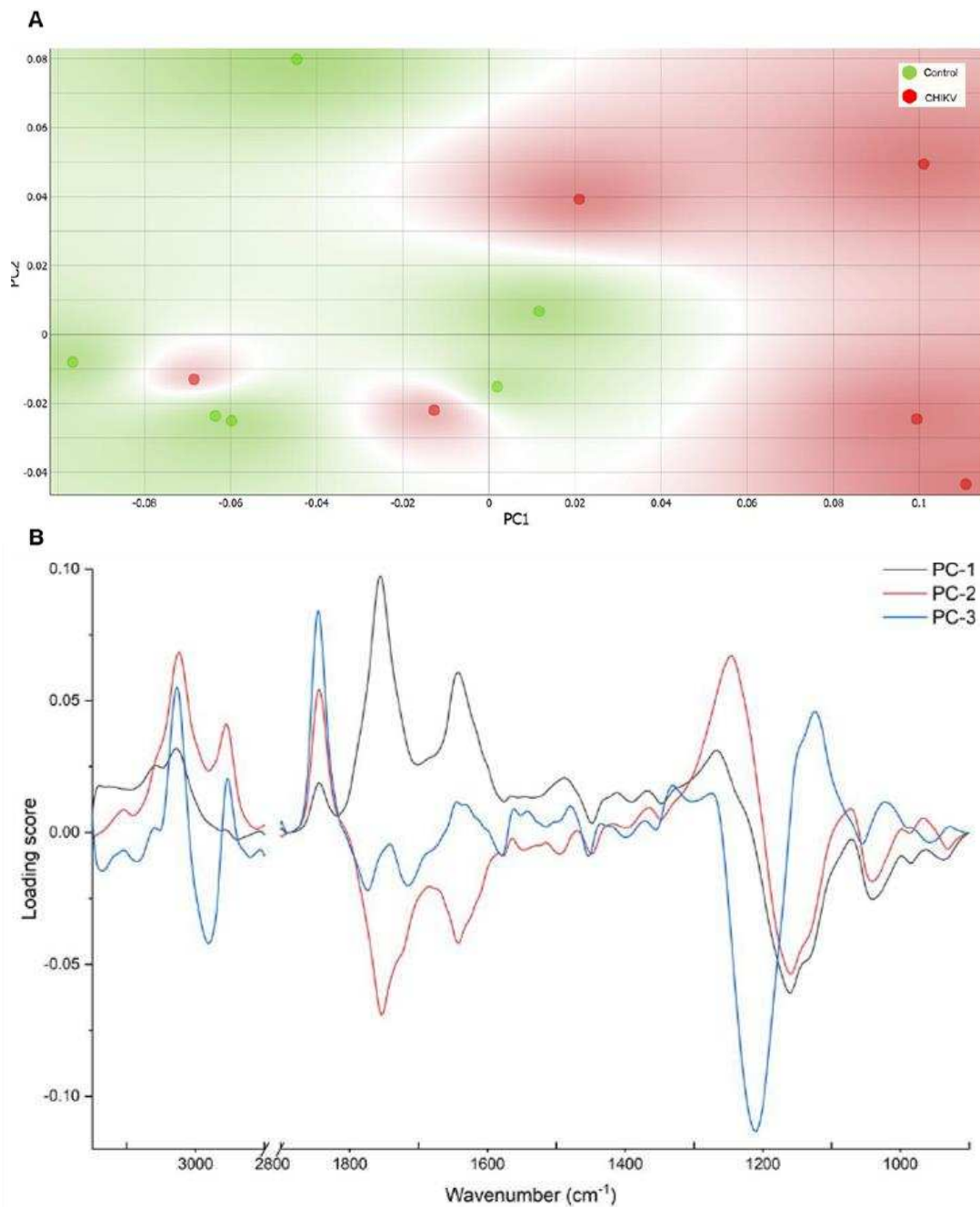


Figure 3. Principal Component Analysis score plot to PC1 vs. PC2 (A) and PCA loadings to PC1, PC2, and PC3 (B).

The classification of synovial fluid using infrared spectra supported by machine learning is described in Table 1. The results obtained in these analyses indicate that the best discrimination was the Artificial Neural Networks algorithm for control compared to CHIKV. The pre-processing was the Gaussian smoothing, PCA denoising, followed by Vector normalization. This result was obtained using the 3050–2800 cm⁻¹ and 1800–800 cm⁻¹. The

Artificial Neural Networks algorithm classification of synovial fluid infrared spectra showed a sensitivity of 66%, specificity of 100%, and accuracy of 83% (Table 1).

Table 1. Machine learning algorithms applied in synovial fluid spectra to discriminate control and CHIKV mice.

Pre-processing (band)	Algorithm Model	Accuracy	Sensitivity	Specificity
Raw data (3050-2800 cm⁻¹; 1800-900 cm⁻¹)	AdaBoost	0.25	0.33	0.16
	Artificial Neural Networks	0.58	0.5	0.66
	Random Forest	0.25	0.16	0.33
	Support Vector Machine	0.08	0.16	0
	Logistic Regression	0.33	0.33	0.33
	Naïve Bayes	0.33	0.16	0.5
Gaussian smoothing + PCA denoising + Vector normalization (3050-2800 cm⁻¹; 1800-900 cm⁻¹)	AdaBoost	0.58	0.5	0.66
	Artificial Neural Networks	0.83	0.66	1
	Random Forest	0.66	0.5	0.83
	Support Vector Machine	0.75	0.5	1
	Logistic Regression	0	0	0
	Naïve Bayes	0.75	0.5	1
PCA denoising + Rubberband + Min- Max normalization (3050-2800 cm⁻¹; 1800-900 cm⁻¹)	AdaBoost	0.5	0.66	0.33
	Artificial Neural Networks	0.5	0.5	0.5
	Random Forest	0.66	0.5	0.83
	Support Vector Machine	0.75	0.5	1
	Logistic Regression	0.58	0.5	0.66
	Naïve Bayes	0.75	0.5	1
PCA denoising + Min-Max normalization (3050- 2800 cm⁻¹; 1800-900 cm⁻¹)	AdaBoost	0.41	0.5	0.33
	Artificial Neural Networks	0.75	0.66	0.83
	Random Forest	0.66	0.5	0.83
	Support Vector Machine	0.75	0.5	1
	Logistic Regression	0.58	0.5	0.66
	Naïve Bayes	0.58	0.5	0.66

Based on SHAP, the band assignment value to discriminate control and CHIKV mice is described in Table 2. The main biomolecular components were genetic material, lipids, carbohydrates, and protein.

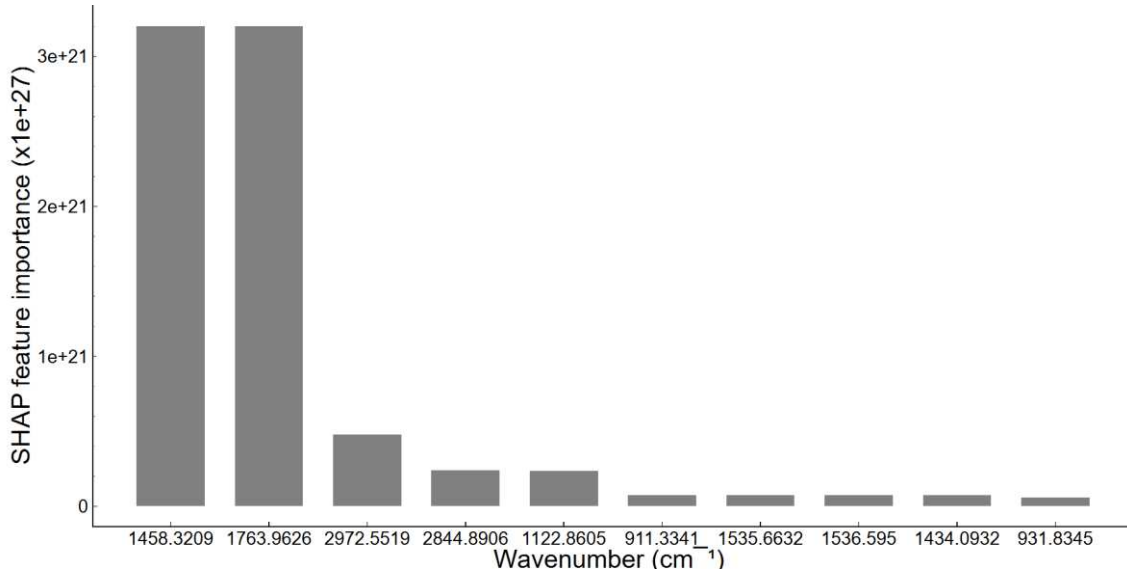


Figure 4. Score SHAP to explain the model in synovial fluid spectra to discriminate control and CHIKV mice.

Table 2. Band assignment of SHAP value of each feature to discriminate control and CHIKV mice and the molecular assignments.

Wavenumber	Band Assignment	Biomolecular components
1458	CH ₂ scissors	Lipids
1763	Stretching vibration of C-O	Lipids
2972	Fatty acids	Lipids
2844	Cholesterol	Lipids
1122	ν C-O	Carbohydrates
911	Phosphodiester region	Genetic material
1534 - 1535	Amide II	Protein
1434	Polysaccharides	Carbohydrates
931	DNA	Genetic material
1536	NH ₂ deformation (Amide II)	Protein
1347	Amide II	Protein

3. Discussion

Due to the immune response or an active viral reservoir in joints^{13,15}, CHIKV infection can develop chronic symptoms^{13,14}, including arthritis/arthritis. The prevalence of chronic arthritis varies, ranging between 25% and 52% among CHIKV-infected patients who may develop persistent arthritis^{16,17}. The higher prevalence of chronic arthritis after CHIKV infection reinforces the potential of ATR-FTIR spectroscopy to detect changes in synovial fluid.

The changes in the infrared spectra of synovial fluid from CHIKV mice suggest that chondral and osteochondral lesions are performed after CHIKV infection. ATR-FTIR spectroscopy has several advantages, such as a simple and fast procedure for the operator and reduced costs for analysis. This green technology also eliminates the need for hazardous reagents frequently used in traditional molecular and serological approaches¹⁸. To the best of our knowledge, this is pioneer data about infrared spectra in synovial fluid comparing control and CHIKV mice. The fingerprint region between 1800–900 cm^{-1} can suggest detecting several organic components based on specific vibrational modes¹⁹. Here, it was possible to confirm the detection of lipids, proteins, carbohydrates, and nucleic acids in the synovial fluid of CHIKV-infected mice.

HCA and PCA are effective chemometric analyses for discriminating samples based on their unique spectra²⁰. In the present study, cluster analyses showed the potential to discriminate CHIKV with around 50% accuracy once three CHIKV samples were more similar to the control group. In the PCA analysis, PC1, PC2, and PC3 explained 96% of cumulative variance by comparing infrared spectra of synovial fluid from control and CHIKV mice, suggesting a potential to reduce the dimensionality of large data sets related to the infrared spectrum.

Synovial fluid was previously applied in ATR-FTIR spectroscopy to investigate joint lesions in horses, rats, dogs, and humans^{21–25}. It was suggested that the vibrational mode at 1155 cm^{-1} corresponding to hyaluronic acid (C-O, C-C) was detected in specimens of synovial fluid²⁶. However, we do not detect specific changes in this vibrational mode comparing CHIKV-infected and control mice. Following previous studies, the vibrational modes related to the Amide I, Amide II, and sugar moieties were detected here^{22,26,27}. Hence, we propose employing algorithms to discriminate the primary synovial fluid, enhancing its predictive power in the infrared analysis. In this context, after advances in the machine learning algorithms and additional studies in human cohorts, the combination of synovial fluid ATR-FTIR spectroscopy with machine learning classification could offer a novel alternative for biomedical screening or monitoring orthopedic damages based on changes in the synovial fluid predicting chronic arthritis resulting from CHIKV infection.

4. Conclusion

This proof-of-concept study demonstrated the potential of this biophotonic platform to perform a step forward in applying ATR-FTIR spectroscopy within orthopedic settings. To the best of our knowledge, this study pioneered obtaining infrared spectra of synovial fluid. Identifying unique vibrational modes at 1655 cm^{-1} , 1543 cm^{-1} , and 1060 cm^{-1} can discriminate synovial liquid from CHIKV-infected mice than controls. The best classification models using the Artificial Neural Networks algorithm achieved a remarkable specificity of 100%, a sensitivity of 66%, and an accuracy of 83%. Our findings underscore the potential of ATR-FTIR platforms supported by machine learning as a sustainable, reagent-free, non-invasive, and highly sensitive tool for detecting changes induced by CHIKV infection in synovial liquid.

5. References

1. Battini, L., Fidalgo, D. M., Álvarez, D. E. & Bollini, M. Discovery of a Potent and Selective Chikungunya Virus Envelope Protein Inhibitor through Computer-Aided Drug Design. *ACS Infect Dis* **7**, 1503-1518 (2021). <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00915>
2. Chen, R. et al. ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology* **99**, 761-762 (2018). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001072>
3. Weaver, S. C., Chen, R. & Diallo, M. Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from enzootic cycles. *Annual Review of Entomology* **65**, 313-332 (2020). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025207>
4. Näslund, J. et al. Emerging Mosquito-Borne Viruses Linked to *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Global Status and Preventive Strategies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **21**, 731-746 (2021). <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2762>
5. Saechue, B. et al. Development of a portable reverse transcription loop-mediated isothermal amplification system to detect the E1 region of Chikungunya virus in a cost-effective manner. *Genes to Cells* **25**, 615-625 (2020). <https://doi.org/10.1111/gtc.12797>
6. Silva, L. A. & Dermody, T. S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *Journal of Clinical Investigation* **127**, 737-749 Preprint at <https://doi.org/10.1172/JCI84417> (2017). <https://doi.org/10.1172/JCI84417>
7. Chinedu Eneh, S. et al. Chikungunya outbreak in Africa: a review of the literature. *Annals of Medicine & Surgery* **85**, 3545-3552 (2023). <https://doi.org/10.1097/MS9.0000000000000979>
8. da Silva Duarte, G. et al. Multicenter study of the natural history and therapeutic responses of patients with chikungunya, focusing on acute and chronic musculoskeletal manifestations - a study protocol from the clinical and applied research in Chikungunya (REPLICK network). *BMC Infect Dis* **23**, 499 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08292-y>

9. Gardner, J. et al. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *J Virol* **84**, 8021-8032 (2010). <https://doi.org/10.1128/JVI.02603-09>
10. Morrison, T. E. et al. A Mouse Model of Chikungunya Virus-Induced Musculoskeletal Inflammatory Disease. *Am J Pathol* **178**, 32-40 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.018>
11. Caixeta, D. C. et al. Monitoring glucose levels in urine using FTIR spectroscopy combined with univariate and multivariate statistical methods. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **290**, 122259 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122259>
12. Veettil, T. C. P. et al. Disposable Coverslip for Rapid Throughput Screening of Malaria Using Attenuated Total Reflection Spectroscopy. *Appl Spectrosc* **76**, 451-461 (2022). <https://doi.org/10.1177/00037028211012722>
13. Amaral, J. K. et al. Pathogenesis of chronic chikungunya arthritis: Resemblances and links with rheumatoid arthritis. *Travel Med Infect Dis* **52**, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102534>
14. Sutaria, R. B., Amaral, J. K. & Schoen, R. T. Emergence and treatment of chikungunya arthritis. *Curr Opin Rheumatol* **30**, 256-263 (2018). <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000486>
15. Goupil, B. A. & Mores, C. N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *Open Rheumatol J* **10**, 129-140 (2019). <https://doi.org/10.2174/1874312901610010129>
16. Edington, F., Varjão, D. & Melo, P. Incidence of articular pain and arthritis after chikungunya fever in the Americas: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Joint Bone Spine* **85**, 669-678 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.03.019>
17. Rodríguez-Morales, A. J., Cardona-Ospina, J. A., Fernanda Urbano-Garzón, S. & Sebastian Hurtado-Zapata, J. Prevalence of Post-Chikungunya Infection Chronic Inflammatory Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* **68**, 1849-1858 (2016). <https://doi.org/10.1002/acr.22900>
18. Kazarian, S. G. & Chan, K. L. A. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1758**, 858-867 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2006.02.011>
19. Santos, M. C. D., Morais, C. L. M. & Lima, K. M. G. ATR-FTIR spectroscopy for virus identification: A powerful alternative. *Biomed Spectrosc Imaging* **9**, 103-118 (2020). <https://doi.org/10.3233/BSI-200203>
20. Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L. & Maggio, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends Food Sci Technol* **72**, 83-90 (2018). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>
21. Eysel, H. H. et al. A Novel Diagnostic Test for Arthritis: Multivariate Analysis of Infrared Spectra of Synovial Fluid. *Biospectroscopy* **3**, 161-167 (1997). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6343\(1997\)3:2<161::AID-BSPY9>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6343(1997)3:2<161::AID-BSPY9>3.0.CO;2-A)
22. Paraskevaïdi, M. et al. Attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy to diagnose osteoarthritis in equine serum. *Equine Vet J* **52**, 46-51 (2020). <https://doi.org/10.1111/evj.13115>
23. Vijarnsorn, M. et al. Use of infrared spectroscopy for diagnosis of traumatic arthritis in horses. *Am J Vet Res* **67**, 1286-1292 (2006). <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.8.1286>
24. Malek, S. et al. Infrared spectroscopy of synovial fluid as a potential screening approach for the diagnosis of naturally occurring canine osteoarthritis associated with cranial

- cruciate ligament rupture. *Osteoarthr Cartil Open* **2**, 100120 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2020.100120>
25. De Souza, R. A. et al. Raman spectroscopy detection of molecular changes associated with two experimental models of osteoarthritis in rats. *Lasers Med Sci* **29**, 797-804 (2014).
<https://doi.org/10.1007/s10103-013-1423-1>
26. Timchenko, P. E. et al. Analysis of Synovial Fluid for Study of Diseases of Joints Using the Method of Raman Spectroscopy. *KnE Energy* **3**, 493 (2018).
<https://doi.org/10.18502/ken.v3i2.1856>
27. Esmonde-White, K. A. et al. Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis. *J Biomed Opt* **14**, 034013 (2009).
<https://doi.org/10.1117/1.3130338>

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOFF, B.; CALDERA, F. E. Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. **Medical Clinics of North America**, v. 104, n. 2, p. 293-311, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.10.007>

ADAMS, L. E.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; RODRIGUEZ, D. M.; RYFF, K.; MAJOR, C.; LORENZI, O.; DELOREY, M.; MEDINA, F. A.; MUÑOZJORDÁN, J. L.; BROWN, G.; ORTIZ, M.; WATERMAN, S. H.; RIVERAAMILL, V.; PAZ-BAILEY, G. Risk factors for infection with chikungunya and Zika viruses in southern Puerto Rico: A community-based cross-sectional seroprevalence survey. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 6, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010416>

BAKER, M. J.; TREVISAN, J.; BASSAN, P.; BHARGAVA, R.; BUTLER, H. J.; DORLING, K. M.; FIELDEN, P. R.; FOGARTY, S. W.; FULLWOOD, N. J.; HEYS, K. A.; HUGHES, C.; LASCH, P.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; OBINAJU, B.; SOCKALINGUM, G. D.; SULÉ-SUSO, J.; STRONG, R. J.; WALSH, M. J.; WOOD, B. R.; GARDNER, P.; MARTIN, F. L. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, v. 9, n. 8, p. 1771-1791, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>

BARTHOLOMEEUSEN, K.; DANIEL, M.; LABEAUD, D. A.; GASQUE, P.; PEELING, R. W.; STEPHENSON, K. E.; NG, L. F. P.; ARIËN, K. K. Chikungunya fever. **Nature reviews. Disease primers**, v. 9, n. 1, p. 17, 2023.

<https://doi.org/10.1038/s41572-023-00429-2>

BRAGGINTON, E. C.; PIDDOCK, L. J. V. UK and European Union public and charitable funding from 2008 to 2013 for bacteriology and antibiotic research in the UK: An observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 9, p. 857-868, 2014. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70825-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70825-4)

BRASIL. **Chikungunya: manejo clínico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico.pdf>

BRAUN, H. J.; GOLD, G. E. Diagnosis of osteoarthritis: Imaging. **Bone**, v. 51, n. 2, p. 278-288, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.11.019>

BUNACIU, A. A.; HOANG, V. D.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Vibrational Micro-Spectroscopy of Human Tissues Analysis: Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12214-0>

BUTLER, H. J.; BRENNAN, P. M.; CAMERON, J. M.; FINLAYSON, D.; HEGARTY, M. G.; JENKINSON, M. D.; PALMER, D. S.; SMITH, B. R.; BAKER, M. J. Development of high-throughput ATR-FTIR technology for rapid triage of brain cancer.

Nature Communications, v. 10, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12527-5>

CAIXETA, D. C.; CARNEIRO, M. G.; RODRIGUES, R.; ALVES, D. C. T.; GOULART, L. R.; CUNHA, T. M.; ESPINDOLA, F. S.; VITORINO, R.; SABINO-SILVA, R. Salivary ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Support Vector Machine Classification for Screening of Type 2 Diabetes Mellitus. **Diagnostics**, v. 13, n. 8, 2023. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13081396>

CALIFF, R. M. Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, v. 243, n. 3, p. 213-221, 2018. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>

CARDONA-OSPINA, J. A.; DIAZ-QUIJANO, F. A.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. Burden of chikungunya in Latin American countries: Estimates of disability-adjusted life-years (DALY) lost in the 2014 epidemic. **International Journal of Infectious Diseases**, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.07.015>

CASTRO, A. P. C. R. de; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. dos S. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p. 299-302, 2016. <https://doi.org/10.5935/1806-0013.20160093>

CAVALCANTI, T. Y. V. de L.; PEREIRA, M. R.; DE PAULA, S. O.; FRANCA, R. F. de O. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, v. 14, n. 5, 2022. <https://doi.org/10.3390/v14050969>

CERBINO-NETO, J.; MESQUITA, E. C.; AMANCIO, R. T.; DO BRASIL, P. E. A. A. Events preceding death among chikungunya virus infected patients: A systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2020. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0431-2019>

CHAAITHANYA, I. K.; MURUGANANDAM, N.; SUGUNAN, P.; RAJESH, R.; ANWESH, M.; RAI, S. K.; VIJAYACHARI, P. Chronic inflammatory arthritis with persisting bony erosions in patients following chikungunya infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 140, n. 1, p. 142-145, 2014.

CHIRATHAWORN, C.; POOVORAWAN, Y.; LERTMAHARIT, S.; WUTTIRATTANAKOWIT, N. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 8, p. 631-634, 2013. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60108-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60108-X)

CULVENOR, A. G.; ØIESTAD, B. E.; HART, H. F.; STEFANIK, J. J.; GUERMAZI, A.; CROSSLEY, K. M. Prevalence of knee osteoarthritis features on magnetic resonance imaging in asymptomatic uninjured adults: a systematic review and meta-analysis. **British journal of sports medicine**, v. 53, n. 20, p. 1268-1278, 2019. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2018-099257>

DA SILVA, V. L. O. **Desenvolvimento de RT-PCR em tempo real para diagnóstico diferencial de chikungunya, dengue e Zika**. 2019. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

DALVI, A. P. R.; GIBSON, G.; RAMOS, A. N.; BLOCH, K. V.; SOUSA, G. dos S. de; SILVA, T. L. N. da; BRAGA, J. U.; CASTRO, M. C.; WERNECK, G. L.
Sociodemographic and environmental factors associated with dengue, Zika, and chikungunya among adolescents from two Brazilian capitals. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. e0011197, 2023.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011197>

DE BRITO, C. A. A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 585-589, 2017. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0479-2016>

DE SOUZA, W. M.; DE LIMA, S. T. S.; SIMÕES MELLO, L. M.; CANDIDO, D. S.; BUSS, L.; WHITTAKER, C.; CLARO, I. M.; CHANDRADEVA, N.; GRANJA, F.; DE JESUS, R.; LEMOS, P. S.; TOLEDO-TEIXEIRA, D. A.; BARBOSA, P. P.; FIRMINO, A. C. L.; AMORIM, M. R.; DUARTE, L. M. F.; PESSOA, I. B.; FORATO, J.; VASCONCELOS, I. L.; MAXIMO, A. C. B. M.; ARAÚJO, E. L. L.; PERDIGÃO MELLO, L.; SABINO, E. C.; PROENÇA-MÓDENA, J. L.; FARIA, N. R.; WEAVER, S. C. Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 5, p. e319-e329, 2023.
[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00033-2](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00033-2)

ESPELAND, A.; NATVIG, N. L.; LØGE, I.; ENGBRETSSEN, L.; ELLINGSEN, J.
Magnetic resonance imaging of the knee in Norway 2002-2004 (national survey): Rapid increase, older patients, large geographic differences. **BMC Health Services Research**, v. 7, 2007. <https://doi.org/10.1186/1472-6963-7-115>

FAJARDO, T. C. G.; GAZETA, R. E.; CATALAN, D. T.; MELLO, A. S.; SILVA, A. C. B. da; BERTOZZI, A. P. A. P.; SANTOS, G. R. Dos; PINTO, C. A. L.; MONTEIRO, C. O.; MACHADO, R. R. G.; OLIVEIRA, D. B. L.; DURIGON, E. L.; PASSOS, S. D.
Neonatal consequences of maternal exposure to the chikungunya virus: Case reports. **Medicine**, v. 100, n. 17, p. e25695, 2021.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025695>

FERREIRA, A. S.; BALDONI, N. R.; CARDOSO, C. S.; OLIVEIRA, C. D. L.
Biomarkers of severity and chronification in chikungunya fever: A systematic review and meta-analysis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 63, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946202163016>

FISCHER, C.; BOZZA, F.; JEANLENY, X.; MERINO, M.; PEDROSO, C.; DE OLIVEIRA FILHO, E. F.; MOREIRA-SOTO, A.; SCHWALB, A.; DE LAMBALLERIE, X.; NETTO, E. M.; BOZZA, P. T.; SARNO, M.; BRITES, C.; GOTUZZO, E.; TALLEDO, M.; DREXLER, J. F. Robustness of Serologic

Investigations for Chikungunya and Mayaro Viruses following Coemergence. **mSphere.**, v. 5, n. 1, p. e00915-19, 2020. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00915-19>

FOELLER, M. E.; NOSRAT, C.; KRYSTOSIK, A.; NOEL, T.; GÉRARDIN, P.; CUDJOE, N.; MAPP-ALEXANDER, V.; MITCHELL, G.; MACPHERSON, C.; WAECHTER, R.; LABEAUD, A. D. Chikungunya infection in pregnancy - reassuring maternal and perinatal outcomes: a retrospective observational study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 128, n. 6, p. 1077-1086, 2021. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16562>

GAO, K.; ZHU, W.; LI, H.; MA, D.; LIU, W.; YU, W.; WANG, L.; CAO, Y.; JIANG, Y. Association between cytokines and exosomes in synovial fluid of individuals with knee osteoarthritis. **Modern Rheumatology**, v. 30, n. 4, p. 758-764, 2020. <https://doi.org/10.1080/14397595.2019.1651445>

GOMES, M. V. dos S.; AMORIM, P. B. Assistência fisioterapêutica nas queixas osteoarticulares apresentadas em pacientes portadores de Chikungunya em Nanuque-MG. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar**, v. 2, n. 9, p. e29711, 2021. <https://doi.org/10.47820/recima21.v2i9.711>

GOULD, E.; PETTERSSON, J.; HIGGS, S.; CHARREL, R.; DE LAMBALLERIE, X. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>

GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. **The Open Rheumatology Journal**, v. 10, n. 1, p. 129-140, 2019. <https://doi.org/10.2174/1874312901610010129>

GUALBERTO CAVALCANTI, N.; MELOVILAR, K.; BRANCO PINTO DUARTE, A. L.; JESUS BARRETO DE MELO RÊGO, M.; CRISTINY PEREIRA, M.; DA ROCHA PITTA, I.; DINIZ LOPES MARQUES, C.; GALDINO DA ROCHA PITTA, M. IL-27 in patients with Chikungunya fever: A possible chronicity biomarker? **Acta Tropica**, v. 196, p. 48-51, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.005>

GUO, Z.; HUANG, S.; WANG, J.; FENG, Y. L. Recent advances in non-targeted screening analysis using liquid chromatography - high resolution mass spectrometry to explore new biomarkers for human exposure. **Talanta**, v. 219, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121339>

HAKIM, M. S.; ANNISA, L.; GAZALI, F. M.; AMAN, A. T. The origin and continuing adaptive evolution of chikungunya virus. **Archives of Virology**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05570-z>

IGLEHART, J. K. Health Insurers and Medical-Imaging Policy-A Work in Progress. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 10, p. 1030-1037, 2009. <https://doi.org/10.1056/NEJMhpr0808703>

KAZARIAN, S. G.; CHAN, K. L. A. Applications of ATR-FTIR spectroscopic imaging to biomedical samples. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1758, n. 7, p. 858-867, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.011>

KELLY, J. G.; TREVISAN, J.; SCOTT, A. D.; CARMICHAEL, P. L.; POLLOCK, H. M.; MARTIN-HIRSCH, P. L.; MARTIN, F. L. Biospectroscopy to metabolically profile biomolecular structure: A multistage approach linking computational analysis with biomarkers. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1437-1448, 2011. <https://doi.org/10.1021/pr101067u>

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415-2418, 2005. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>

LICÍNIO, C. O. L.; AYRES, F. M. The use of real time PCR for arboviruses diagnostics: Integrative review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, 2021. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20210048>

LIMA, M. da R. Q.; DE LIMA, R. C.; DE AZEREDO, E. L.; DOS SANTOS, F. B. Analysis of a routinely used commercial anti-chikungunya igm elisa reveals cross-reactivities with dengue in brazil: A new challenge for differential diagnosis? **Diagnostics**, v. 11, n. 5, 2021. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11050819>

MARAL, J. K.; BINGHAM, C. O.; TAYLOR, P. C.; VILÁ, L. M.; WEINBLATT, M. E.; SCHOEN, R. T. Pathogenesis of chronic chikungunya arthritis: Resemblances and links with rheumatoid arthritis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2022.102534>

MARIMOUTOU, C.; FERRARO, J.; JAVELLE, E.; DEPARIS, X.; SIMON, F. Chikungunya infection: Self-reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 7, p. 688-693, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.024>

MARQUES, C. D. L.; DUARTE, A. L. B. P.; RANZOLIN, A.; DANTAS, A. T.; CAVALCANTI, N. G.; GONÇALVES, R. S. G.; ROCHA JUNIOR, L. F. da; VALADARES, L. D. de A.; MELO, A. K. G. de; FREIRE, E. A. M.; TEIXEIRA, R.; BEZERRA NETO, F. A.; MEDEIROS, M. M. das C.; CARVALHO, J. F. de; SANTOS, M. S. F.; OCÉA, R. A. de L. C.; LEVY, R. A.; ANDRADE, C. A. F. de; PINHEIRO, G. da R. C.; ABREU, M. M.; VERZTMAN, J. F.; MERENLENDER, S.; RIBEIRO, S. L. E.; COSTA, I. P. da; PILEGGI, G.; TREVISANI, V. F. M.; LOPES, M. I. B.; BRITO, C.; FIGUEIREDO, E.; QUEIROGA, F.; FEITOSA, T.; TENÓRIO, A. da S.; SIQUEIRA, G. R. de; PAIVA, R.; VASCONCELOS, J. T. S.; CHRISTOPOULOS, G. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 - Diagnóstico e situações especiais. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, p. 421-437, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2017.05.004>

MATHEW, A. J.; GOYAL, V.; GEORGE, E.; THEKKEMURIYIL, D. V.; JAYAKUMAR, B.; CHOPRA, A. Rheumatic-musculoskeletal pain and disorders in a naïve group of individuals 15 months following a Chikungunya viral epidemic in south India: a population based observational study. **International Journal of Clinical Practice**, v. 65, n. 12, p. 1306-1312, dez. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2011.02792.x>

MATOS, L. J. de; FERNANDES, C. da S.; ARAÚJO, T. M. de; GALINDO NETO, N. M.; BARROS, L. M.; FROTA, N. M. Impacto da febre Chikungunya nas atividades de vida diária de pessoas idosas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e234985746, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5746>

MEHTA, R.; GERARDIN, P.; DE BRITO, C. A. A.; SOARES, C. N.; FERREIRA, M. L. B.; SOLOMON, T. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. **Reviews in Medical Virology**, v. 28, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.1002/rmv.1978>

MILHIM, B. H. G. A.; DA ROCHA, L. C.; TERZIAN, A. C. B.; MAZARO, C. C. P.; AUGUSTO, M. T.; LUCHS, A.; ZINI, N.; SACCHETTO, L.; DOS SANTOS, B. F.; GARCIA, P. H. C.; ROCHA, R. S.; LISO, E.; BRIENZE, V. M. S.; DA SILVA, G. C. D.; VASILAKIS, N.; ESTOFOLETE, C. F.; NOGUEIRA, M. L. Arboviral Infections in Neurological Disorders in Hospitalized Patients in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **Viruses**, v. 14, n. 7, 2022. <https://doi.org/10.3390/v14071488>

MOREIRA, J.; BRASIL, P.; DITTRICH, S.; SIQUEIRA, A. M. Mapping the global landscape of chikungunya rapid diagnostic tests: A scoping review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 7, 2022. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010067>

NASEER, K.; ALI, S.; QAZI, J. ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using bio-fluids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 56, n. 2, p. 85-97, 2021. <https://doi.org/10.1080/05704928.2020.1738453>

NUNES, M. R. T.; FARIA, N. R.; DE VASCONCELOS, J. M.; GOLDING, N.; KRAEMER, M. U. G.; DE OLIVEIRA, L. F.; DA SILVA AZEVEDO, R. do S.; DA SILVA, D. E. A.; DA SILVA, E. V. P.; DA SILVA, S. P.; CARVALHO, V. L.; COELHO, G. E.; CRUZ, A. C. R.; RODRIGUES, S. G.; DA SILVA GONÇALVES VIANEZ, J. L.; NUNES, B. T. D.; CARDOSO, J. F.; TESH, R. B.; HAY, S. I.; PYBUS, O. G.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, n. 1, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>

PAIXÃO, E. S.; RODRIGUES, L. C.; COSTA, M. da C. N.; ITAPARICA, M.; BARRETO, F.; GÉRARDIN, P.; TEIXEIRA, M. G. Chikungunya chronic disease: A systematic review and meta-analysis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 112, n. 7, p. 301-316, 2018. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try063>

PAHO, PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Clinical Diagnosis and Treatment of Dengue, Chikungunya, and Zika**. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, 2022. < <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55867>>

PAVON, J. A. R.; NEVES, N. A. da S.; SILVA, L. C. F.; AZEVEDO, F. K. de; JUNIOR, F.; NUNES, M. R. T.; SLHESSARENKO, R. D. Neurological infection by chikungunya and a triple Arbovirus co-infection in Mato Grosso, Central Western Brazil during 2019. **Journal of Clinical Virology**, v. 146, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2021.105056>

RASHTCHIAN, A. Amplification of RNA. **Genome Research**, v. 4, n. 2, p. S83-S91, 1994. <https://doi.org/10.1101/gr.4.2.S83>

RÊGO, T. M. **Avaliação e desenvolvimento da RT-PCR em tempo real para a detecção do vírus Chikungunya**. 2017. Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RITZ, N.; HUFNAGEL, M.; GÉRARDIN, P. Chikungunya in children. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 7, p. 789-791, 2015. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000716>

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 49, n. 1, p. 1952-53, 1955. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8)

RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; CARDONA-OSPINA, J. A.; FERNANDA URBANO-GARZÓN, S.; SEBASTIAN HURTADO-ZAPATA, J. Prevalence of Post-Chikungunya Infection Chronic Inflammatory Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Arthritis Care and Research**, v. 68, n. 12, p. 1849-1858, 2016. <https://doi.org/10.1002/acr.22900>

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; GIL-RESTREPO, A. F.; RAMÍREZ-JARAMILLO, V.; MONTOYA-ARIAS, C. P.; ACEVEDO-MENDOZA, W. F.; BEDOYA-ARIAS, J. E.; CHICA-QUINTERO, L. A.; MURILLO-GARCÍA, D. R.; GARCÍA-ROBLEDO, J. E.; CASTRILLÓN-SPITIA, J. D.; LONDOÑO, J. J.; BEDOYA-RENDÓN, H. D.; CÁRDENAS-PÉREZ, J. de J.; CARDONA-OSPINA, J. A.; LAGOS-GRISALES, G. J. Post-chikungunya chronic inflammatory rheumatism: results from a retrospective follow-up study of 283 adult and child cases in La Virginia, Risaralda, Colombia. **F1000Research**, v. 5, p. 360, 2016. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8235.1>

RUDOLPH, K. E.; LESSLER, J.; MOLONEY, R. M.; KMUSH, B.; CUMMINGS, D. A. T. Review article: Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 882-891, 2014. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0403>

SCHERF, U.; BECKER, R.; CHAN, M.; HOJVAT, S. Approval of novel biomarkers: FDA's perspective and major requests. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 70, n. SUPPL. 242, p. 96-102, 2010. <https://doi.org/10.3109/00365513.2010.493415>

SEPÚLVEDA-DELGADO, J.; VERA-LASTRA, O. L.; TRUJILLO-MURILLO, K.; CANSECO-ÁVILA, L. M.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, R. A.; GÓMEZ-CRUZ, O.; LUGO-TRAMPE, A.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; DANIS-LOZANO, R.; CONTRERAS-CONTRERAS, A.; MENDOZA-TORRES, A.; DOMÍNGUEZ-ARREVILLAGA, S.; MENA-VELA, B. A.; OCAÑA-SIBILLA, M.; RAMÍREZ-VALDESPINO, J. C.; JARA, L. J. Inflammatory biomarkers, disease activity index, and self-reported disability may be predictors of chronic arthritis after chikungunya infection: brief report. **Clinical Rheumatology**, v. 36, n. 3, p. 695-699, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3419-2>

SINUSAS, K. Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment. **American family physician**, v. 85, n. 1, p. 49-56, 2012.

SRIVASTAVA, P.; KUMAR, A.; HASAN, A.; MEHTA, D.; KUMAR, R.; SHARMA, C.; SUNIL, S. Disease Resolution in Chikungunya-What Decides the Outcome? **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00695>

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463-466, 2010. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e32833ed177>

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 597-611, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0276-9>

WEAVER, S. C.; CHEN, R.; DIALLO, M. Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. **Annual Review of Entomology**, v. 65, p. 313-332, 2020. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-025207>

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION; INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation**. [s.l.] World Health Organization, 2001. <https://iris.who.int/handle/10665/42363>

ZAID, A.; GÉRARDIN, P.; TAYLOR, A.; MOSTAFAVI, H.; MALVY, D.; MAHALINGAM, S. Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n. 4, p. 484-495, 2018. <https://doi.org/10.1002/art.40403>

ZELLER, H.; VAN BORTEL, W.; SUDRE, B. Chikungunya: Its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, p. S436-S440, 2016. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw391>