

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RESPOSTA IMUNE INATA AO VÍRUS CHIKUNGUNYA:  
SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E FATORES ANTIVIRAIS

CAROLINE FERNANDES DOS SANTOS

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2019

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

CAROLINE FERNANDES DOS SANTOS

Resposta imune inata a infecção pelo vírus chikungunya: subpopulação de monócitos e fatores antivirais

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientadora: Dra. Elzinandes Leal de Azeredo**

**RIO DE JANEIRO**  
Dezembro de 2019

Santos, Caroline Fernandes dos.

Resposta imune inata ao vírus Chikungunya: subpopulações de monócitos e fatores antivirais / Caroline Fernandes dos Santos. - Rio de Janeiro, 2019.  
138 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Elzinandes Leal de Azeredo.

Bibliografia: f. 90-104

1. Imunidade Inata. 2. CHIKV. 3. Subpopulações de monócitos. 4. TLR. 5. Citocinas. I. Título.

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTORA: CAROLINE FERNANDES DOS SANTOS**

**RESPOSTA IMUNE INATA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS  
CHIKUNGUNYA: SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E FATORES  
ANTIVIRAIS**

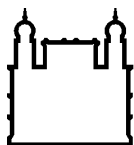
**ORIENTADORA: Dra. ELZINANDES LEAL DE AZEREDO**

**Aprovada em:**

**EXAMINADORAS:**

Dra. Patrícia Carvalho de Sequeira	- <b>Presidente</b> – IOC/FIOCRUZ
Dra. Analúcia Rampazzo Xavier	– UFF
Dra. Roberta Olmo Pinheiro	– IOC/FIOCRUZ
Dra. Natalia Fonseca do Rosário	– UFF
Dra. Fernanda de Bruycker Nogueira	– IOC/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2019.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

## DEDICATÓRIA

---

À minha família e amigos. Sem vocês eu não seria quem sou hoje.

“Acho que somos os seres mais poderosos do mundo, e a nós deveriam ser dadas todas as oportunidades. E é isso o que deveríamos ensinar a essas jovens meninas: a ocupar espaço. Nada é mais importante do que ocupar espaços na sociedade e se estabelecer nela”

Zozibini Tunzi, Miss Universo 2019.

## AGRADECIMENTOS

---

Esta é a última sessão a ser escrita. Olho para o trabalho feito e não posso deixar de me sentir feliz por tudo e todos que me trouxeram até aqui.

Começo agradecendo a Deus por todo amor que tem demonstrado comigo e com os que me são queridos. Obrigada meu Pai por nunca ter me deixado sozinha, sempre enviando seus anjos encarnados para me ajudar.

Agradeço as minhas avós e meus avôs, Oscarina, José, Benvindo e Rosa, por terem me dado o meu primeiro presente nesse mundo. Em especial gostaria de agradecer a minha vó Oscarina, que sempre esteve ao meu lado em todas as horas e em muitas noites. Eu te amo, Dona Vó.

Agradeço aos meus pais, Rudimar e Cláudia, por sempre acreditarem que eu poderia ir aonde eu nem imaginava. Agradeço todo o sustento físico e emocional que vocês me proporcionaram até aqui e que, com certeza, continuarão proporcionando. Vocês são meu exemplo de força, perseverança e amor. Mãe, você é meu exemplo de amor incondicional e imensurável. É a mulher maravilha da minha vida.

As irmãs, Larissa e Daniela, que me ensinaram o significado da palavra proteção. Obrigada pelo suporte, pelo carinho e por me proporcionarem as melhores risadas desde 1998. No meio do caos, vocês conseguem me trazer de volta para aquela sensação de infância que acalenta.

Agradeço a minha família que tem torcido e me dado forças para seguir meus sonhos. Agradeço a Tia Ana e ao Dindinho que acreditam que serei uma cientista que encontrará a cura de doenças desde que eu tinha 8 anos. Agradeço a Fernandinha e ao Édipo, meus irmãos. Também agradeço a Bruna e Maria Eduarda que vieram nos completar.

Agradeço as minhas orientadoras que acreditaram em mim, acreditaram no meu trabalho e no meu potencial, me ajudando a chegar até aqui. Obrigada Dra. Elzinandes Leal e Dra. Gladys Correa pela orientação e amizade. Pelos conselhos dentro e fora da pesquisa. Por me ensinarem o que é pesquisa e me mostrarem que a minha escolha de carreira não só tem futuro, como é o futuro.

Agradeço a todos do LIV, por mais que sejamos a releitura da Grande Família na forma de equipe de laboratório, nosso grupo é um dos melhores que já tive o prazer de trabalhar. Obrigada pelas conversas, almoços, cafés



e xixis coletivos. Em especial, agradeço a Dra. Luzia e Dra. Flávia pelos conselhos e conversas. A Débora e Raquel, por dividirem cada momento dos últimos dois anos em pé de irmandade. E a Carol Lind, ex LIV, mas sempre presente em cada citometria, em cada ELISA. Sempre vou lembrar da sua paciência e sua companhia na bancada. Obrigada por dividir sua experiência comigo.

Aos meus amigos de tanto tempo, obrigada por todos os momentos vividos até aqui. Vocês têm o nome escrito na minha história. Em especial, agradeço a Deus pela vida de Tauani, Marvin, Rodrigo, Maycon, Tairini, Luisa, Brenda, Beatriz e Lais.

Como professora que sou, também não posso esquecer de agradecer as minhas professoras que são exemplos a serem alcançados um dia. Agradeço a Dra. Carla Lacerda, Dra. Cláudia Uchoa, Dra. Analúcia Xavier pela inspiração de vida e acadêmica.

À Capes, FAPERJ e ao CNPq por manterem, da melhor maneira possível, o incentivo a pesquisa proporcionando a verba necessária para que esse trabalho se realizasse e fornecendo a minha bolsa.

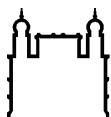
À FIOCRUZ e ao IOC pela oportunidade. Sabendo que a maior instituição de pesquisa em saúde do país não se faz sozinha, agradeço a Rita, Tia Maria, Cleide e tantos outros que realmente fazem essa instituição acontecer.

Agradeço a nova família que eu ganhei, Andrea, Carlos, Felipe, Victoria e Maria Luiza. Obrigada por toda a força, por sempre estarem presentes e por toda torcida para que este dia chegasse.

Quando a gente sai da família nuclear e vai construir a nossa própria, o que vamos encontrar é incerto. É o amor que impulsiona a tomada de decisão de viver a vida ao lado de alguém. E foi esse amor que transformou as incertezas em brincadeiras, moldou nosso caminho e nos mantém aquecidas hoje. Eu não poderia pedir a Deus e ao universo alguém como você porque eu nem sabia que essa felicidade existia. Sem você eu com certeza não estaria aqui hoje. Muito obrigada Nathalia Cristina Penaforte de Freitas, por transbordar os meus dias.

Por fim, quero agradecer a Marie Curie, Lise Meitner, Rosalind Franklin, Gertrude Elion, Katherine Johnson, Nettie Maria Stevens, Mae Carol

Jemison, Mary Prince, Mariele Franco e tantas outras mulheres que lutaram para ocupar espaços, permitindo que hoje eu estivesse aqui.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### RESPOSTA IMUNE INATA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA: SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E FATORES ANTIVIRAIS

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Caroline Fernandes Dos Santos

Células e moléculas sinalizadoras da resposta imune inata são as principais responsáveis pela defesa inicial dos organismos contra agentes invasores. Dentre os leucócitos responsáveis pela imunidade inata estão os monócitos - população relacionada a infecções bacterianas e virais. Existem três subclassificações de monócitos (clássicos, intermediários e não clássicos) que parecem responder de maneira heterogênea aos diferentes patógenos. É através de PRRs - reconhecendo PAMPs - que ocorre a ativação celular e transcrição de fatores que culminam na produção de citocinas e quimiocinas. Dentre os PRRs destaca-se a superfamília dos TLRs, onde o TLR7 e mais recentemente os TLR2 e TLR4, desempenham papel importante no curso das infecções virais levando a produção de IFNs, além das outras moléculas pró-inflamatórias responsáveis pela lise de células infectadas, recrutamento de outros subtipos celulares e *clearance* viral. O CHIKV é uma arbovirose transmitida principalmente pelo *A. aegypti* que teve sua chegada ao Brasil nos últimos anos, causando epidemias caracterizadas por mialgia, febre, manifestações cutâneas e dores articulares incapacitantes que podem se estender por meses ou anos. Ainda não está claro quais são os mecanismos para o aparecimento de sintomas tão intensos e estabelecimento de quadros crônicos. Também pouco se sabe sobre o estado imunológico de pacientes co-infectados com o vírus CHIKV e outros arbovirus em circulação no país tais como o ZIKV e DENV. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta imune antiviral através da caracterização de subpopulações de monócitos e seu padrão de ativação em pacientes infectados com CHIKV, nas diferentes fases da doença, e em pacientes co-infectados; além de avaliar a produção de mediadores antivirais e inflamatórios. Analisando as células de pacientes naturalmente infectados pelo CHIKV e apresentando co-infecções, observamos que há aumento na frequência de monócitos intermediários em pacientes mono e co-infectados com CHIKV em relação aos controles. Também demonstramos aumento da expressão de CD163 e HLA-DR nessa mesma subpopulação em todos os grupos de pacientes. As análises da expressão de TLR2 e TLR4 mostraram que esses TLRs estão aumentados em monócitos clássicos e intermediários em pacientes apresentando co-infecção com o CHIKV. No entanto, a subpopulação de monócitos não-clássicos apresentou baixa expressão de TLR2 e TLR7 na fase crônica da infecção. A quantificação da carga viral dos pacientes monoinfectados com CHIKV demonstrou que é possível detectar vírus circulante após três meses de doença. Comparamos fatores solúveis plasmáticos de controles sadios e pacientes infectados pelo CHIKV. Observamos baixas dosagens dos IFNs  $\alpha/\gamma$  assim como do TNF- $\alpha$  nos pacientes. Demonstramos elevadas dosagens plasmáticas das quimiocinas CCL2, CCL4, CXCL8 e CXCL10 durante a fase aguda da infecção, corroborando com os quadros inflamatórios vistos na clínica. Baixas dosagens de CCL5 e EGF foram encontradas na fase aguda. Interessantemente, elevadas dosagens de CCL5 foram encontradas nos casos crônicos. Juntos, os resultados demonstram que as subpopulações de monócitos se ativam de maneira diferente em resposta a infecção pelo CHIKV e que o vírus parece estar promovendo ativação celular e modulando a expressão de citocinas com papel antiviral efetivo.

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **IMMUNE INATE RESPONSE TO CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION: MONOCYTES SUBSETS AND ANTIVIRAL FACTORS**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DEGREE DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY**

**Caroline Fernandes dos Santos**

Cells and molecules that signal innate immune responses are primarily responsible for the initial defense of organisms against invading agents. Among the leukocytes responsible for innate immunity are monocytes - a population suffering from bacterial and viral infections. Monocytes are subclassified into 3 groups (classical, intermediate and non-classical) that appear to respond heterogeneously to different pathogens. It is through PRRs - recognizing PAMPs - that occurs with cellular activity and transcription of factors that culminate in the production of cytokines and chemokines. Among PRRs, the TLR superfamily can be highlighted, where TLR7 and more recently TLR2 and TLR4 play an important role in the course of viral infections. They lead to the production of IFNs in addition to the other proinflammatory molecules responsible for lysis of infected cells, recruitment of other cell subtypes, and viral release. CHIKV is a arbovirus transmitted by *A. aegypti* that has arrived in Brazil in recent years, causing myalgia, fever, skin manifestations and disabling joint pain that may extend for months or years. The mechanisms for the occurrence of such intense symptoms and establishment of chronic conditions are still unclear. Also, little is known about the immune status of patients who are co-infected with CHIKV virus and other arboviruses circulating in the country (ZIKV and DENV). Thus, the aim of this study was to evaluate the anti-virus immune response of monocyte subpopulations and their activation pattern in CHIKV-infected patients, at different stages of the disease, and in patients co-infected with viruses; besides that we aim to evaluate the production of inflammatory mediators. After, analyzing the cells from naturally CHIKV-infected and co-infected patients we observed that there is an increase in the frequency of intermediate monocytes in CHIKV mono and co-infected patients compared to controls. We also demonstrated an increase in CD163 and HLA-DR expression in this same subpopulation in all patient groups. Regarding the analysis of TLR2 and TLR4 expression, these TLRs are increased in classical monocytes (TLR2) and intermediates in patients with CHIKV co-infection. However, a subpopulation of non-classical monocytes showed a decrease in TLR2 in the chronic phase, and was the same also seen for TLR7. By analyzing the plasma-soluble factors in these patients, we quantified the viral load from CHIKV monoinfected patients and showed that circulating virus could be detected after three months of disease. In relation to cytokines, IFNs and TNF- $\alpha$  levels are decrease in CHIKV + patients, suggesting low antiviral activity. We have shown that pro-inflammatory chemokines are increased during virus infection, confirming the inflammatory conditions seen in patients. Together, the results demonstrated as monocyte subpopulations are activated differently in response to CHIKV infection and that viruses appear to be promoting cellular activity and modulating cytokine expression with effective antiviral role.

# SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT .....	XII
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O Sistema Imunológico .....	1
1.1.1. A Resposta Imune Inata .....	1
1.2. Vírus Chikungunya.....	13
1.2.1. Histórico Epidemiológico .....	13
1.2.2. Ciclo de transmissão.....	16
1.2.3. Características - agente etiológico e estrutura do genoma ....	17
1.2.4. Disseminação e replicação viral nas células hospedeiras .....	18
1.2.5. Manifestações clínicas da infecção pelo CHIKV .....	20
1.2.6. Diagnóstico e tratamento.....	23
1.2.7. Imunopatogênese da infecção: Resposta imune ao CHIKV ...	24
2. JUSTIFICATIVA .....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral .....	28
3.2. Objetivos específicos .....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1. População de estudo e critérios de inclusão e exclusão .....	29
4.2. Coleta de sangue.....	31
4.3. Diagnóstico laboratorial .....	31
4.4. Obtenção e congelamento das PBMCs.....	32
4.5. Produção de massa viral .....	33
4.6. Infecção de PBMCs com o CHIKV .....	33
4.7. Imunofenotipagem de monócitos dos experimentos <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> - marcação extracelular com posterior marcação intracelular .....	34
4.8. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento séricos por ELISA.....	36
4.9. Extração do RNA.....	37
4.10. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR para CHIKV) .....	38
4.11. Análises estatísticas.....	38
4.11.1. Citometria de Fluxo .....	38
4.11.2. Espectrofotometria.....	39
5. RESULTADOS .....	40
5.1. <i>Estudos ex vivo</i> .....	40

5.1.1.	Parâmetros hematológicos dos pacientes infectados pelo CHIKV	43
5.1.2.	Carga viral e dias de infecção .....	45
5.1.3.	Caracterização das subpopulações de monócitos.....	46
5.1.4.	Mediadores inflamatórios: citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento .....	57
5.2.	<i>Estudos In vitro</i> .....	67
6.	DISCUSSÃO .....	75
7.	PERSPECTIVAS .....	88
8.	CONCLUSÕES .....	89
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
10.	ANEXOS.....	105

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. VIAS DE SINALIZAÇÃO DE RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE PADRÃO (PRR).....	3
FIGURA 2. MONÓCITOS: COMPONENTES DA IMUNIDADE INATA. ....	10
FIGURA 3. MAPA ILUSTRATIVO DA DISSEMINAÇÃO HISTÓRICA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA BASEADO EM RECONSTRUÇÕES FILOGENÉTICAS. ....	15
FIGURA 4. ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO CHIKV E DINÂMICA DOS EVENTOS PÓS TRADUCIONAIS. 18	
FIGURA 5. CICLO DE REPLICAÇÃO DO CHIKV. ....	20
FIGURA 6. CLASSIFICAÇÃO DA INFECÇÃO PELO CHIKV. ....	21
FIGURA 7. UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DURANTE A INFECÇÃO PELO CHIKV. ....	23
FIGURA 8. ANÁLISE DE HEMATÓCRITO E PLAQUETAS EM PACIENTES INFECTADOS COM CHIKV EM COMPARAÇÃO COM PACIENTES COM ODF.....	44
FIGURA 9. ANÁLISE DO LEUCOGRAMA E PRINCIPAIS LEUCÓCITOS CIRCULANTES ASSOCIADOS A INFECÇÕES VIRAIS.....	45
FIGURA 10. ANÁLISE DA CARGA VIRAL POR QRT-PCR DE ACORDO COM OS DIAS DE INFECÇÃO. ....	46
FIGURA 11. ESTRATÉGIA DE GATE DAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS. ....	48
FIGURA 12. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NAS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	50
FIGURA 13. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD163 NAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DURANTE FASES (AGUDA E CRÔNICA) DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES.....	52
FIGURA 14. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HLA-DR NAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DURANTE FASES (AGUDA E CRÔNICA) DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	53
FIGURA 15. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TLR2 NAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DURANTE FASES (AGUDA E CRÔNICA) DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	55
FIGURA 16. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TLR4 NAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DURANTE AS FASES (AGUDA E CRÔNICA) DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES.....	56
FIGURA 17. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TLR7 NAS DIFERENTES SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DURANTE AS FASES (AGUDA E CRÔNICA) DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES.....	57
FIGURA 18. PERFIL DE PRODUÇÃO DE INTERFERONS DO TIPO I E DO TIPO II DURANTE AS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV, EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	59
FIGURA 19. PERFIL DE TNF- $\alpha$ SÉRICO DURANTE AS FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES.....	60
FIGURA 20. ANÁLISE DAS CITOCINAS SÉRICAS IL-6, IL-15 E IL-10 DURANTE AS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	61

FIGURA 21. ANÁLISE DAS QUIMIOCINAS CCL2, CCL4 E CCL5 DURANTE AS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	63
FIGURA 22. ANÁLISE DAS QUIMIOCINAS CXCL8 E CCL10 DURANTE AS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	65
FIGURA 23. ANÁLISE DE FATORES DE CRESCIMENTO SÉRICOS VEGF E PDGF-BB DURANTE AS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	66
FIGURA 24. ANÁLISE DO FATOR DE CRESCIMENTO EGF DURANTE AS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO PELO CHIKV E EM PACIENTES CO-INFECTADOS (CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV) E CONTROLES. ....	67
FIGURA 25. ESTRATÉGIA DE ANÁLISE DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS DOS EXPERIMENTOS IN VITRO. ....	69
FIGURA 26. FREQUÊNCIA DE MONÓCITOS INFECTADOS COM CHIKV IN VITRO. ....	70
FIGURA 27. FREQUÊNCIA DAS SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS NOS GRUPOS NI, MOCK E CHIKV. ....	71
FIGURA 28. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD163 EM MONÓCITOS CLÁSSICOS, INTERMEDIÁRIOS E NÃO - CLÁSSICOS SOB OS DIFERENTES ESTÍMULOS UTILIZADOS. ....	72
FIGURA 29. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HLA-DR EM MONÓCITOS CLÁSSICOS, INTERMEDIÁRIOS E NÃO - CLÁSSICOS SOB OS DIFERENTES ESTÍMULOS UTILIZADOS.. ....	73
FIGURA 30. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TLR7 EM MONÓCITOS CLÁSSICOS, INTERMEDIÁRIOS E NÃO - CLÁSSICOS SOB OS DIFERENTES ESTÍMULOS UTILIZADOS. ....	74



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. DIVISÃO DOS GRUPOS DE ANÁLISE .....	30
TABELA 2. ANTICORPOS MONOCLONAIS UTILIZADOS PARA OS ENSAIOS DE CIOMETRIA... ..	36
TABELA 3. RELAÇÃO DOS KITS DE ELISA UTILIZADOS.....	37
TABELA 4. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES INFECTADOS COM CHIKV E CO- INFECTADOS COM CHIKV-DENV OU CHIKV-ZIKV. ....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AINES	- anti-inflamatório não esteroide
AF	- AlexaFluor
APC	- Células apresentadoras de antígeno
AVE	- tampão <i>carrier</i>
AVL	- tampão de lise viral
BSA	- albumina de soro bovino
BV	- <i>Brilliant Violet</i>
CD	- Grupamento de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDC	- células dendríticas convencionais
CHIKV	- vírus chikungunya
CHIKV - DENV	- co-infecção com CHIKV e DENV
CHIKV-ZIKV	- co-infecção com CHIKV e ZIKV
CT	- <i>cycle threshold</i>
C-terminal	- carboxi-terminal
CTRL	- controle
CSF	- Fator estimulador de colônias
Da	- Dalton
DC	- células dendríticas
DENV	- Vírus Dengue
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	- dimetilsulfóxido
dL	- decilitro
DNA	- ácido desoxirribonucleico ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
ECSA	- linhagem Leste/Centro/Sul Africana
EGF	- Fator de Crescimento Epidermal
ELISA	- ensaio imunossorvente ligado a enzima ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
g	- gravidade
HBV	- vírus da hepatite B
HBsAg	- Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCV	- vírus da hepatite C
HIV	- vírus da imunodeficiência adquirida
HLA	- antígeno leucocitário humano
HRL	- Hospital Rio Laranjeiras
HRP	- horseradish peroxidase
HTLV	- vírus linfotrópico da célula T humana
HUCFF	- Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
IFN	- interferon
IFNAR	- Receptor de Interferon do tipo I
IFIT	- Proteínas induzidas por interferon com repetições de tetratricopeptídeo ( <i>Interferon Induced proteins with Tetratricopeptide repeats</i> )
IgM	- imunoglobulina M
IL	- interleucina
ILCs	- células linfoides inatas
IOC	- Instituto Oswaldo Cruz
IOL	- Linhagem do Oceano Índico

IP-10	- proteína induzida por interferon gama ( <i>Interferon gamma-induced protein</i> )
ISG	- genes estimulados por interferon ( <i>interferon-stimulated gene</i> )
K	- Potássio
k	- quilo
LPS	- lipopolissacarídeo
L	- litro
LIV	- Laboratório de Imunologia Viral
MAYV	- vírus mayaro
MFI	- média da intensidade de fluorescência
MHC	- complexo de histocompatibilidade maior
MIF	- fator inibidor de migração de macrófago
mg	- miligrama
mL	- mililitro
mM	- milimolar
MOI	- multiplicidade de infecção
MS	- Ministério da Saúde
MYD88	- molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 ( <i>Myeloid differentiation primary response 88</i> )
MX	- gene da proteína MX ( <i>Interferon-induced GTP-binding protein Mx gene</i> )
n	- número de amostras
NI	- não infectado
NF-kB	- fator nuclear kappa Beta
NK	- exterminadoras naturais ( <i>natural killer</i> )
NLR	- receptores do tipo NOD ( <i>NOD-like receptors</i> )
nm	- nanômetro
NO	- óxido nítrico
NS	- proteína não-estrutural ( <i>nonstructural protein</i> )
N-terminal	- amino-terminal
OAS	- gene 2'-5'-oligoadenilato sintetase ( <i>2'-5'-oligoadenylate synthetase gene</i> )
ODF	- outras doenças febris
ORF	- fases de leitura aberta ( <i>open reading frame</i> )
PAHO	- Organização de Saúde PanAmericana ( <i>Pan American Health Organization</i> )
PAMPs	- Padrões Moleculares Associados a Patógenos ( <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> )
PBMC	- células mononucleares do sangue periférico ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	- tampão salina fosfato
pDC	- célula dendríticas plasmocitoide
PDGF	- fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	- Ficoeritrina ( <i>Phycoerythrin</i> )
PECy7	- Ficoeritrina <i>Cyanine7</i>
PerCP	- Proteína piridina de clorofila ( <i>Peridinin chlorophyll</i> )
PFA	- paraformaldeído
pH	- potencial hidrogenionico
PRR	- Receptor de Reconhecimento de Padrão ( <i>pattern recognition receptors</i> )
Ra	- antagonista do receptor

RJ	- Rio de Janeiro
RLR	- Receptores do tipo RIG ( <i>RIG-like receptors</i> )
RNA	- ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
RNaseL	- ribonuclease L
ROS	- espécies reativas de oxigênio ( <i>reactive oxygen species</i> )
RPMI	- meio para cultivo de PBMCs ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
RRV	- Ross River Virus
RT-PCR	- reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase ( <i>transcription polymerase chain reaction</i> )
SFB	- soro fetal bovino
TLR	- receptores do tipo <i>Toll</i> ( <i>Toll Like Receptor</i> )
TMB	- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	- fator de necrose tumoral ( <i>tumoral necrose factor</i> )
UDP	- difosfato de uridina ( <i>uridine diphosphate</i> )
UFRJ	- Universidade Federal do Rio de Janeiro
uL	- microlitro
VDRL	- Teste <i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VEGF	- fator de crescimento do endotélio vascular
VERO	- linhagem celular de rim de macaco verde africano
vs	- <i>versus</i>
WHO/OMS	- Organização Mundial da Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
ZIKV	- vírus zika

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O sistema imunológico

O sistema imunológico consiste num grupo heterogêneo de moléculas, células e órgãos que estão comprometidos com a defesa dos organismos. As respostas são dirigidas a microrganismos, substâncias tóxicas ou alérgenos que possam interferir na homeostase dos indivíduos. Ao mesmo tempo que esse sistema combate e neutraliza microrganismos invasores, ele precisa apresentar certo grau de tolerância aos antígenos próprios e organismos comensais que vivem em simbiose com os animais. Outro papel importante realizado por esse sistema é a renovação e manutenção de tecidos, eliminação de células senescentes e defeituosas, além da recuperação de tecidos após lesão (Chaplin, 2010).

Didaticamente, o estudo do Sistema Imunológico pode ser dividido em duas abordagens: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. A imunidade inata é natural e constitutiva dos seres vivos. Nos mamíferos ela atuará nas primeiras horas após o contato com microrganismos invasores potencialmente virulentos. O estabelecimento da resposta imune inata possibilita a formação da memória imunológica através da resposta imune adaptativa (Mcdonald & Levy, 2018).

### 1.1.1. A resposta imune inata

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa dos organismos. Ela é constitutiva, de início rápido e não precisa de exposição prévia para ser iniciada. O sistema imune inato é composto por barreiras anatômicas (pele, mucosas), barreiras fisiológicas (lágrimas, suco gástrico), componentes celulares (leucócitos) e humorais (citocinas, quimiocinas, sistema complemento). A resposta se dá mediante a desafios de agentes químicos (ácidos, bases), agentes físicos (calor, radiação) e agentes biológicos (microrganismos) (Mcdonald & Levy, 2018).

Em relação aos agentes biológicos, o sistema imune inato responde a componentes conservados e invariáveis presentes nas estruturas microbianas, os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Esse

reconhecimento se dá através de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) que são potentes iniciadores da resposta inflamatória (Mcdonald & Levy, 2018).

Macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) são células que se destacam devido ao seu papel efetor. Em conjunto com os outros leucócitos, elas desempenham as funções de fagocitose; produção e liberação de mediadores inflamatórios, citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda; e ativação do complemento – principais mecanismos da imunidade inata (Crunivel *et al.*, 2010).

#### **1.1.1.1. Reconhecimento de patógenos: PAMPs e PRRs**

Os PAMPs presentes nos diversos grupos de microrganismos incluem lipopolissacarídeos (LPS), moléculas de DNA e RNA, por exemplo. Essas sequências são reconhecidas por PRRs pertencentes a várias famílias de receptores, dentre elas destacam-se principalmente: a superfamília dos Receptores do Tipo Toll (TLRs), a família dos Receptores do tipo RIG (RLRs) e a família dos Receptores do Tipo NOD (NLRs). Após ativação, os PRRs desencadeiam cascatas de sinalização que culminam na produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias e consequente recrutamento leucocitário (Figura 1) (Mcdonald & Levy, 2018; Hong, *et al.*, 2011).

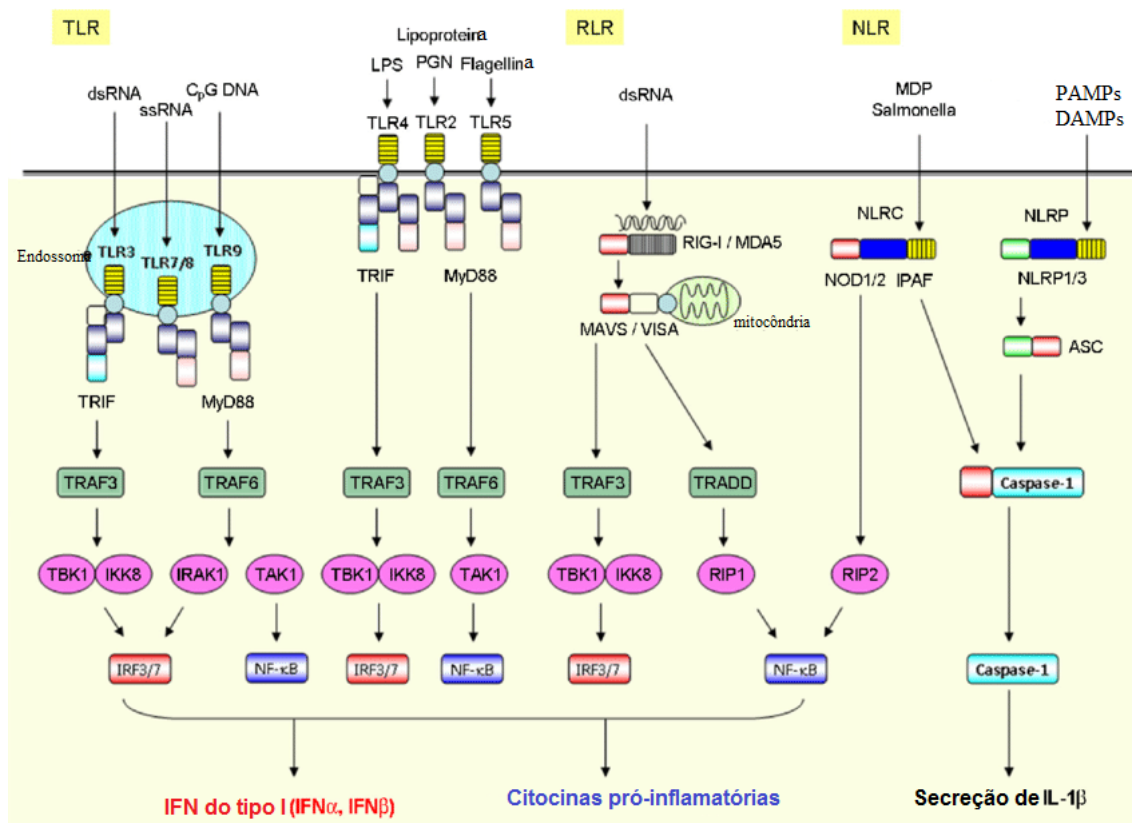


Figura 1. Vias de sinalização de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR). Em resumo, as três superfamílias principais de PRRs atuam reconhecendo PAMPs e/ou DAMPs, assim desencadeando cascatas de sinalização que culminam na ativação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B e IRFs, e, por conseguinte, produção de mediadores inflamatórios. Adaptado de Hong et al. *Journal of Bacteriology and Virology*, 2011.

Os NLRs constituem uma superfamília de PRRs transmembranasres similares aos TLRs. Atualmente foram caracterizados 22 membros dessa família que reconhecem PAMPs e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) no hospedeiro. De maneira geral, a ativação desses receptores leva a formação de inflamassomos – estruturas especializadas em magnificar as respostas imunes celulares, potencializando o processo inflamatório (Kim, 2016).

Os RLRs são receptores citoplasmáticos pertencentes à família de genes das helicases. Eles atuam como sensores citoplasmáticos para RNA viral, principalmente. A ativação desses receptores resulta na produção de interferons (IFN) do tipo I, uma das principais responsáveis pela eliminação das infecções virais (Loo & Gale, 2011).

Finalmente, os TLRs constituem uma superfamília de receptores transmembranasres podendo se localizar na superfície celular ou no interior de endossomos. Na superfície celular, o reconhecimento é voltado a proteínas, moléculas solúveis e PAMPs localizados na superfície celular de patógenos -

como é o caso do reconhecimento de LPS pela molécula de CD14 via TLR4. Os TLR da membrana plasmática reconhecem peptidoglicanas, lipoproteínas, LPS e flagelina. Já foi vista a ativação dos TLR2 e TLR4 durante infecções virais, reconhecendo proteínas não-estruturais solúveis no plasma (Lester & Li, 2014).

A frequência desses receptores difere entre as células do sistema imune inato. No interior dos endossomas celulares podem ser encontrados os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Eles são os principais responsáveis pela resposta a infecções virais. Esses receptores reconhecem ácidos nucleicos provenientes de partículas virais que adentraram as células via endocitose. O TLR3 reconhece RNA de dupla fita, TLR7/8 reconhecem RNA de fita simples e TLR9 reconhece DNA CpG. O reconhecimento pelos TLRs intracelulares desencadeiam a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e antivirais, como os IFNs do tipo I (Lester & Li, 2014).

O reconhecimento pode ocorrer de duas formas distintas: via proteínas adaptadora MYD88 ou via independente de MYD88. Os IFNs do tipo I agem limitando a replicação e disseminação do vírus, através da transcrição de diversos genes estimulados por interferons (ISGs). São comumente chamados de fatores de restrição viral, por exemplo: RNaseL, Mx, OAS, genes da família IFIT e da família IFITM. Alguns desses genes são estritamente regulados por via dos receptores de interferon (IFNAR), outros podem ser estimulados diretamente pela ativação dos PRRs (Kawai and Adachi, 1999).

#### **1.1.1.2. Mensageiros solúveis: diferentes papéis durante as infecções**

Os sistemas biológicos utilizam moléculas de sinalização afim de promover a manutenção da homeostase e atuar nos sistemas de defesa, nesse contexto as citocinas ganham destaque. Citocinas são proteínas de sinalização de baixo peso molecular (normalmente menos de 80 kDa) que atuam na regulação das mais diversas funções biológicas como imunidade, hematopoese, proliferação, diferenciação, maturação celular, inflamação e reparo tecidual (Chung, 2009).

Elas podem ser secretadas por diversos tipos celulares como leucócitos, células epiteliais e fibroblastos e agem nas interações celulares. As sinalizações via citocinas podem ser de caráter autócrino, parácrino ou sistêmico,



dependendo da quantidade de citocinas secretadas e do papel que cada uma desempenha. As primeiras citocinas descritas foram as de papel direto no sistema imunológico, nomeadas como linfocinas (citocinas secretadas por linfócitos) (Chung, 2009). Historicamente, os interferons foram os primeiros a serem descobertos e estudados desempenhando papel na imunidade a partir da sua liberação por linfócitos ativados em coelhos infectados com herpes simplex (Ferreira *et al.*, 2016).

Esses mediadores inflamatórios são considerados de difícil classificação, devido a redundância encontrada entre eles. Não é raro que uma mesma citocina sinalize para diferentes tipos celulares com perfis de respostas diversos. De mesma maneira, seus receptores celulares também demonstram grande promiscuidade em relação a seus ligantes. Desta maneira, elas são agrupadas de acordo com o papel principal que desempenham. Neste trabalho, se destacam as citocinas pró e anti-inflamatórias, quimiocinas (citocinas com propriedades quimioatraentes) e os fatores de crescimento (envolvidos no remodelamento e reparo tecidual) (Chung, 2009).

TNFs (Fator de Necrose Tumoral) são citocinas inflamatórias reconhecidas por sua citotoxicidade em células tumorais. Essa família, composta pelo TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , também interagem com células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de adesão celular afim de facilitar a migração de leucócitos para os sítios de infecção. Sua ação no endotélio vascular também pode levar a extravasamento plasmático (Commins *et al.*, 2010).

As interleucinas (IL) são uma família de citocinas cujos membros podem desempenhar papéis pró ou anti-inflamatórios. A IL-6, por exemplo, tem papel importante na ativação e diferenciação de linfócitos T e B e, conseqüentemente, na produção de anticorpos. Também possuem efeitos sistêmicos como febre e produção de proteínas de fase aguda. A IL-15 também está envolvida na ativação e maturação celular, ela é uma das responsáveis pela ativação de células NK e pela sobrevivência dos linfócitos T CD8+ de memória (Commins *et al.*, 2010).

Ao contrário das outras citocinas vistas anteriormente que desempenham papel direto ou indireto no estabelecimento da resposta pró-inflamatória, a IL-10 é uma citocina com efeito imunorregulatório. Ela tem como alvo diferentes tipos celulares e, de maneira geral, irá inibir a secreção de moléculas inflamatórias,

reduzir a ativação celular, inibir a apresentação de antígeno pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II. Além do caráter regulador, essa molécula também exerce papel constitutivo e fisiológico induzindo tolerância a potenciais alérgenos no trato respiratório. Sua principal fonte são as células T regulatórias (Treg), mas também podem ser secretadas por monócitos e linfócitos B (Commins *et al.*, 2010).

Em relação às quimiocinas, elas são classificadas de acordo com o grupo de receptores que se ligam. Em contrapartida, os receptores são classificados de acordo com o número de aminoácidos e resíduos de cisteína em sua porção N-terminal. Dessa forma, os receptores são classificados em quatro subfamílias: CXC, CC, CX3C e C; onde C é a posição da cisteína e X o número de aminoácidos entre as duas cisteínas terminais. Então, nesse sistema de classificação, a quimiocina recebe um ligante (L) e um número (relativo a ordem de descoberta) e os receptores também recebem um receptor (R) e um número. Como exemplo podemos citar a CCL5 e um de seus receptores o CCR5 (Guerreiro *et al.*, 2011). As quimiocinas da subfamília CC são normalmente associadas a fase aguda de infecções. Seus receptores são acoplados a proteína G e quando ativados levam a uma cascata de sinalização resultando na quimiotaxia, degranulação e remodelamento do citoesqueleto para fagocitose, por exemplo (Maurer & Von Stebut, 2004). No entanto já foi visto que elas atuam em diversas doenças crônicas como alergias e asma. CCL2, CCL3 e CCL5 já foram associadas a artrite reumatoide, onde sua presença nas articulações coincidem com aumento do número de monócitos e células T no líquido sinovial (Turner *et al.*, 2014).

CCL2, CCL4 e CCL5 são proteínas de fase aguda de caráter inflamatório. São responsáveis pelo recrutamento de monócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos e células NK. Podem desencadear a expressão de outras citocinas por essas células e a produção de moléculas como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Palomino & Marti, 2015; Maurer & Von Stebut, 2004; Turner *et al.*, 2014).

Outra quimiocina detectada durante a fase aguda de infecções é a CXCL8. Ela possui ação parecida com as citadas anteriormente no que diz respeito a migração e estimulação da degranulação. Essa quimiocina também

está associada a doenças inflamatórias crônicas, como psoríase e artrite reumatoide, onde se observa altos níveis circulantes (Palomino & Marti, 2015).

Os fatores de crescimento são moléculas de natureza proteica responsáveis pela comunicação, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Alguns estão diretamente associados aos processos inflamatórios, promovendo o reestabelecimento da homeostase, dentre eles destacam-se o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) (Chung, 2009). O VEGF é o nome dado a uma família de glicoproteínas encodadas por um único gene que produz diferentes isoformas via *splicing* alternativo. Sua principal ação é na promoção da angiogênese, estimulando o crescimento de células endoteliais. Um estudo demonstrou que a deleção de apenas um alelo do gene em camundongos é letal durante o desenvolvimento intrauterino (Fátima & Papa, 2010).

EGF e PDGF são famílias de receptores envolvidos nos processos inflamatórios. EGF é produzido por queratinócitos e macrófagos ativados e atuam no processo de re-epitelização. Tem seu receptor nos próprios queratinócitos e promove os processos de proliferação e migração dessas células com conseqüente remodelamento epitelial. Dados da literatura demonstraram associação de baixas concentrações dessa molécula a doenças crônicas, como é o caso da insuficiência venosa crônica (Brem *et al.*, 2007). Já o PDGF é produzido por plaquetas e seu principal alvo são leucócitos, macrófagos e fibroblastos. Também estão envolvidos no processo de re-epitelização além de desempenharem papel direto na inflamação, deposição de colágeno e remodelamento tecidual (Behm *et al.*, 2012).

Por fim, os IFN são moléculas de ação antiviral divididas em três diferentes classes: IFN do tipo I ( $\alpha/\beta/\omega$ ), IFN do tipo II ( $\gamma$ ) e IFN do tipo III ( $\lambda$ ). Os IFN I têm habilidade de inibir a replicação viral. São produzidos por diferentes tipos celulares, das quais se destaca a produção pelas células dendríticas plasmocitoides (pDCs) via ativação por TLR7/8. Eles também induzem um estado antiviral em células não infectadas e a atividade citotóxica de células efetoras. O IFN- $\gamma$  também possui atividade antiviral - embora mais discreta -, estimula a apresentação antigênica por moléculas do MHC, estimula fagocitose e migração celular. Além disso, é principalmente secretado por células NK e

promove, nessas mesmas células, seu papel efetor. Os IFN III, assim como os IFN I inibem a replicação viral, tem atividade antiproliferativas e antitumorais (Commins *et al.*, 2010).

### **1.1.1.3. As células do sistema imune inato**

O conjunto de leucócitos que formam os componentes celulares da resposta imune inata, compreendem vários tipos celulares que podem ser classificados quanto a sua origem, morfologia ou expressão de moléculas em sua superfície (*cluster of differentiation – CD*) (Chaplin, 2010).

Em relação a sua formação, os leucócitos têm origem na medula óssea podendo se comprometer com linhagens linfoides ou mieloides. As células da linhagem linfóide, após diferenciação e amadurecimento, poderão originar linfócitos B e T (imunidade adaptativa) e as células linfoides inatas (ILCs), das quais as células NK fazem parte (Chaplin, 2010; Malarkannan, 2018). O comprometimento com a origem mielóide leva a diferenciação e maturação de neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e monócitos. Os monócitos poderão se diferenciar e especializar ainda mais gerando macrófagos e células dendríticas convencionais (cDCs) (Chaplin, 2010).

As células NK são originadas na medula óssea e tecidos linfoides secundários, classificadas como linfócitos e representam de 5-20% deste tipo celular. São células citotóxicas que, ao contrário de linfócitos T, não requerem prévia apresentação antigênica (Langers *et al.*, 2012). Dependendo do microambiente imunológico, essas células podem ser ativadas - aumentando a expressão de moléculas do Antígeno Linfocitário Humano – DR (HLA-DR), por exemplo - e se diferenciam via IL-2 e/ou IL-15, levando a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas líticas (Smyth *et al.*, 2005).

Monócitos e células dendríticas podem atuar na mediação de proliferação de células NK através da produção destas citocinas. Ao desempenhar seu papel, essas células podem agir de duas formas: (a) diretamente causar a lise de células malignas ou infectadas através do receptor de morte ou (b) degranulação de perforinas e granzimas; deixando-as no centro do papel de *clearance* de patógenos e células disfuncionais. Além disso, podem produzir uma variedade de citocinas e quimiocinas (CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL8, por exemplo) que são

essenciais na mediação e recrutamento de outros tipos celulares ([Malarkannan, 2018](#)).

Os macrófagos e as células dendríticas são células derivadas de monócitos que se localizam nos tecidos. Assim como os monócitos, essas células são capazes de fagocitar, processar e apresentar antígenos através das moléculas de MHC de classe II. Essas moléculas estão presentes somente nas células classificadas como células apresentadoras de antígenos (APC) e são encodadas por um conjunto de genes polimórficos, os HLA. Quando ativadas, essas células respondem produzindo citocinas e quimiocinas inflamatórias ([Cruvinel et. al, 2010](#)).

As moléculas de MHC II são imprescindíveis para a formação da resposta imune adaptativa, pois elas constituem um dos sinais necessários para ativação dos linfócitos T. Em relação ao papel enquanto APC, as células dendríticas ganham destaque especial. Essas células possuem longas extensões de membrana, o que permite grande capacidade de fagocitose ([Mcdonald & Levy, 2018](#)). Quando entram em contato com antígenos elas são rapidamente ativadas, secretando grandes quantidades de citocinas e quimiocinas inflamatórias, e migram para linfonodos onde poderão realizar a apresentação antigênica aos linfócitos. As células dendríticas podem ser classificadas como cDC ou pDC, essas últimas são conhecidas como produtoras profissionais de IFN do tipo I em resposta a infecções virais ([Collin & Bigley, 2018](#)).

#### *1.1.1.4. Classificação e função dos monócitos*

Os monócitos são células hematopoiéticas de origem na medula óssea, agranulares, mononucleares e constituem cerca de 10% do total de leucócitos circulantes no sangue periférico. Essa população celular vem ganhando destaque nos últimos anos, se afastando cada vez mais da ideia de células imaturas. Antigamente achava-se que os monócitos eram apenas uma forma intermediária entre o progenitor da medula óssea e os macrófagos e DCs nos tecidos. Hoje sabe-se que essas três populações celulares desempenham importante papel fagocitário e estão envolvidos na resposta direta contra agentes invasores ([Guilliams et al., 2018](#)).

Recentemente os monócitos sofreram reclassificação. Com o advento das técnicas de citometria de fluxo e a análise minuciosa da expressão dos marcadores de superfície, foram então classificados em três subpopulações de acordo com a expressão das moléculas de CD14 e CD16 (Figura 2). Os monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>) constituem de 80%-90% do total de monócitos circulantes, enquanto os monócitos intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos não-clássicos (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>++</sup>) constituem os outros 10%-20% dessas células (Figura 2.A) (Zawada et al. 2018; Mobley et al. 2007; Kapellos et al. 2019b).

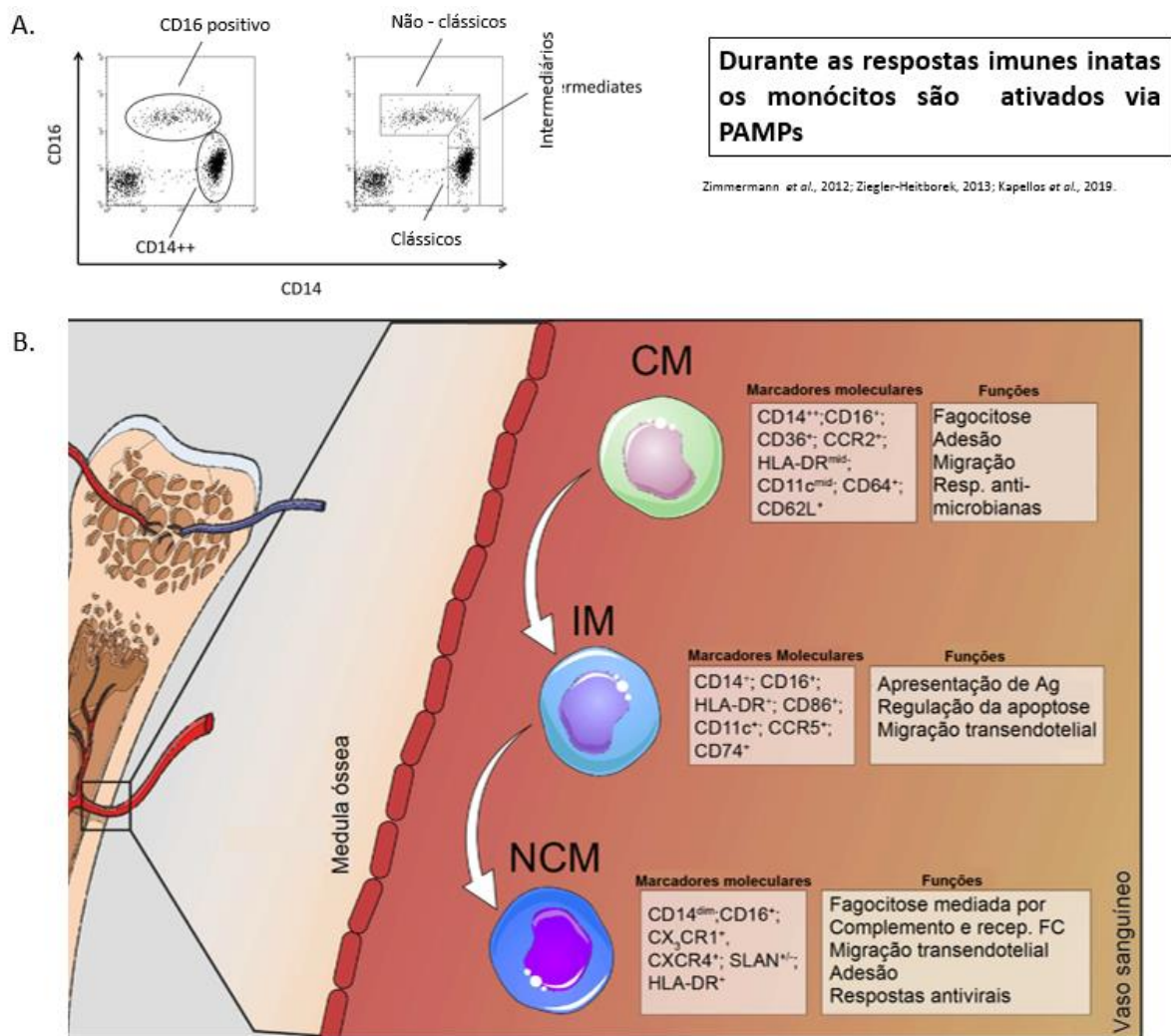


Figura 2. Monócitos: componentes da imunidade inata. (A) Imunofenotipagem das subpopulações de monócitos por citometria de fluxo. (B) Marcadores moleculares e função de cada subpopulação. Os monócitos são liberados da medula óssea como monócitos clássicos (CM) e se diferenciam na corrente sanguínea a monócitos intermediários (IM) e finalmente a monócitos não – clássicos (NCM). Adaptado de Zimmermann et al., 2012; Ziegler-Heitborek, 2013; Kapellos et al., 2019.

Os monócitos possuem capacidade de migração rápida e robusta para sítios de inflamação em todo o corpo, quando ativados produzem grandes quantidades de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias – atuando no recrutamento e ativação de outros tipos celulares. Também produzem moléculas antimicrobianas como ROS, NO e interferons (Guilliams *et al.*, 2018; Cros *et al.*, 2010).

Monócitos clássicos (Figura 2.B) são células com alta capacidade fagocítica, capacidade de diferenciação em células dendríticas, principalmente, e que após estimulação por LPS respondem produzindo preferencialmente IL-10, G-CSF, CCL2, CCL5, IL-6, CXCL8, TNF- $\alpha$ . Já os monócitos intermediários (Figura 2.B) são apresentadores de antígeno eficientes, produzem ROS, tem papel importante na resposta inflamatória e angiogênese. Após estimulação por LPS essa subpopulação responde produzindo IL-6, CXCL8, TNF- $\alpha$ . O papel de monócitos não-clássicos (Figura 2.B) abrange desde secreção de citocinas pró-inflamatórias frente a infecções, quanto o patrulhamento do endotélio vascular em busca de lesões. Eles podem se diferenciar em macrófagos e liberam, mediante ativação celular, TNF- $\alpha$ , IL-1b, IL-6, IL-8, CCL3 (principalmente em resposta a infecções virais) (Sampath *et al.*, 2018; Kapellos *et al.*, 2019b).

#### **1.1.1.5. Monócitos e as infecções virais**

Cada vez mais tem sido estudado o papel que as subpopulações de monócitos desempenham durante infecções. Estudos realizados com monócitos humanos e provenientes de modelos murinos têm mostrado que as subpopulações respondem prioritariamente a uma classe de patógenos. Os monócitos clássicos parecem estar mais envolvidos nas respostas a infecções bacterianas, enquanto os monócitos CD16+ são responsáveis pela resposta a infecções virais. Já foi visto que monócitos não-clássicos produzem um repertório de citocinas pró-inflamatórias mediante ativação via TLR7/8 e MYD88 (Cros *et al.*, 2010).

Estudos realizados pela nossa equipe mostraram que as subpopulações de monócitos humanos CD16+ encontram-se expandidas em pacientes infectados pelo vírus dengue. A expressão de TLR2 e TLR4 e maior frequência de monócitos intermediários CD14++CD16+ foram associados com bom

prognóstico da doença (Azeredo *et al.*, 2010). Altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1Ra nos sobrenadantes de culturas de monócitos CD16+ infectados e no plasma de pacientes sugerem que essa subpopulação exerça um importante papel nas respostas inflamatórias durante a infecção pelo mesmo vírus (Pinto *et al.*, 1999).

Camundongos infectados com os Alphavirus, vírus chikungunya (CHIKV) e *Ross River vírus* (RRV), que tiveram monócitos inflamatórios depletados, apresentaram doença mais grave e elevada carga viral. No mesmo estudo foi visto que os arbovírus induzem a produção de quantidades importantes de IFN por essas células, o que contribui diretamente para a resolução da infecção (Haist *et al.*, 2017).



## 1.2. Vírus Chikungunya

O vírus chikungunya pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. Seu genoma viral é composto por uma fita simples de RNA com polaridade positiva de aproximadamente 12 kb. O genoma consiste de duas fases abertas de leitura (do inglês - *open reading frame* - ORF) que codifica nove proteínas: 5 proteínas estruturais (capsídeo- C, membrana-6K e envelope – E1, E2, E3) e 4 proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) (Suhriebier *et al.*, 2012).

### 1.2.1. Histórico Epidemiológico

O CHIKV foi primeiramente reportado como causador de uma doença febril parecida com a dengue, em surtos ocorridos na Tanzânia em 1952. Após pesquisas realizadas no local, Lumsden e colaboradores descobriram que a doença já havia sido batizada como Chikungunya, no dialeto Makonde, que significa “aquele que se dobra” ou “aquele que se contorce” – uma referência às manifestações clínicas da doença (Lumsden, 1955).

Após a descoberta do CHIKV, foram registrados vários surtos, não apenas na Tanzânia, como também em outros países do continente africano. No fim dos anos 50 e início dos anos 60, ocorreram vários surtos da doença no Sudeste Asiático até finalmente chegar a Índia. Epidemias importantes, durante essa época ocorreram em Bangkok, Chennai e Barsi (Petersen & Powers, 2016). Os surtos anuais sucessivos observados desde a descoberta do vírus permitiram o isolamento, sequenciamento e identificação das três diferentes linhagens que circulam atualmente. Os nomes dados a elas são relativos ao local onde foram isoladas, são elas: linhagem Leste/Centro/Sul Africana (ECSA), linhagem Asiático e a linhagem do Oceano Índico (IOL) (Weaver & Forrester, 2015).

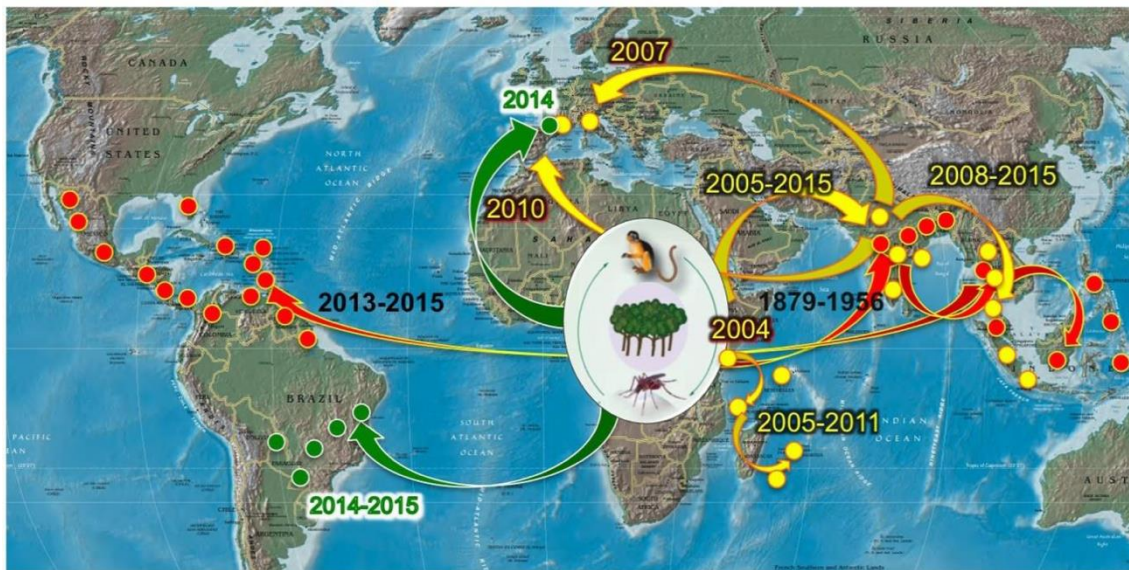
Em 2004 o vírus reemergiu no Kenya e, em 2005, se espalhou pelas ilhas do Oceano Índico com as maiores taxas de ataque vistas até então. Na ilha *La Réunion*, foram cerca de 300 mil pessoas infectadas entre 2005 e 2006 atingindo cerca de 38% da população. Para além dos impactos sociais e na saúde dos pacientes infectados, foi reportado um importante impacto econômico. Os gastos diretos e indiretos em saúde, no tratamento dos pacientes ou na ausência do

trabalho devido as dores causadas pelo CHIKV, somaram mais de 40 milhões de euros (Soumahoro *et al.*, 2011).

Visando entender melhor as diferenças observadas nas epidemias após a reemergência do vírus, o genoma do CHIKV foi novamente isolado e sequenciado. Foi observado por Schuffenecker e colaboradores em 2006, a ocorrência de uma modificação na sequência de aminoácidos da proteína do envelope viral E1. Na posição 226 houve a transição de Alanina para Valina (A226V). Em estudos iniciais especulou-se que essa substituição teria potencializado a capacidade de transmissão por mosquitos *Aedes albopictus* (Tigre Asiático), um dos vetores do vírus (Schuffenecker *et al.*, 2006), o que não foi visto para *Aedes aegypti* – até então descrito como o principal vetor responsável pela transmissão urbana (Tsetsarkin & Weaver, 2011; Tsetsarkin *et al.*, 2014). Foi a partir dessa substituição A226V e sua subsequente epidemia que surgiu a Linhagem do Oceano Índico – identificada como originária do genótipo ECSA (Konstantin *et al.*, 2011). Nesse período, ocorreram milhares de casos de CHIKV importados para outras regiões do globo devido à migração de viajantes infectados pelo vírus (Rezza *et al.*, 2007; Grandadam *et al.*, 2011).

Nas Américas, a chegada do vírus foi primeiro reportada em dezembro de 2013, na Ilha de Saint Martin. Na época, devido a epidemia de dengue que ocorria no local, os primeiros casos da febre chikungunya foram retratados como “uma doença parecida com a dengue”, posteriormente, sendo identificado como CHIKV. (Halstead, 2015; Cassadou *et al.*, 2014). Entre 2013 e 2014 o vírus se espalhou pelo continente americano, sendo detectado em quase todos os países. Ao final do ano de 2014, foram registrados mais de 1 milhão de casos suspeitos de transmissão autóctone, com 194 mortes confirmadas (Rica & Lucia, 2015). Até o ano de 2017 a Organização PanAmericana de Saúde (PAHO) registrou mais de 2,5 milhões de casos suspeitos e 631 mortes por chikungunya (PAHO, 2017).

Estudos retrospectivos de análise filogenética demonstram a dinâmica de transmissão mundial do vírus e suas diferentes linhagens, correlacionando com os respectivos anos de introdução de cada linhagem, conforme ilustrado na Figura 3 (Weaver & Forrester, 2015).



Linhagem ECSA, Linhagem Asiática, Linhagem Oceano Índico

Figura 3. Mapa ilustrativo da disseminação histórica do vírus chikungunya baseado em reconstruções filogenéticas. Pontos verdes, setas e anos indicam a linhagem Leste/Centro/Sul da África (ECSA), pontos vermelhos, setas e anos indicam estirpe asiática e pontos amarelos, setas e anos indicam a linhagem do Oceano Índico (IOL). Adaptado de Weaver & Forrester, 2015.

O CHIKV alcançou o Brasil por duas vias independentes e simultâneas no ano de 2014 – ano de importância epidemiológica em todo o continente americano. Dia 13 de setembro de 2014 o vírus foi primeiro identificado em Oiapoque – Amapá, região Norte do país, e uma semana depois em Feira de Santana – Bahia, região Nordeste. As linhagens identificadas foram a Linhagem Asiática em Oiapoque e a Linhagem ECSA em Feira de Santana (Nunes *et al.*, 2015). A partir das introduções houve um espalhamento do vírus atingindo todas as regiões do país. Segundo o Ministério da Saúde, entre 2014 – 2018 foram registrados mais de 700 mil casos suspeitos da doença, dos quais cerca de 50 mil no estado do Rio de Janeiro (RJ), região Sudeste do país (Okumoto *et al.*, 2018; Ministério da Saúde, 2015). Até o mês de setembro do ano de 2019 foram notificados mais de 110 mil casos suspeitos da doença, sendo o RJ o estado detentor da maioria dos registros com 76.776 notificações (Ministério da Saúde, 2019).

O RJ tem sido ponto de acesso para introdução dos diversos sorotipos do vírus dengue (DENV) desde os anos 80. Devido a sua importância econômica e turística, o RJ é um dos principais indicadores para prever epidemias nacionais (Vigilância Epidemiológica, 2018). Devido a introdução do vírus zika (ZIKV) no país e as constantes epidemias de dengue, estudos epidemiológicos realizados

mostram co-circulação dos três vírus (DENV, ZIKV e CHIKV), inclusive com pacientes apresentando co-infecções (de Souza *et al.*, 2018).

Esse cenário de tríplice epidemia vivido no Brasil, em especial no Rio de Janeiro, pode ser explicado pela ampla disseminação do inseto vetor competente e suscetibilidade da população (de Souza *et al.*, 2018).

### **1.2.2. Ciclo de transmissão**

O vírus chikungunya apresenta dois ciclos de transmissão: o ciclo silvestre e o ciclo urbano. No início da vigilância, as epidemias envolviam pequenas comunidades africanas, que viviam em áreas rurais. Essas pequenas epidemias eram mantidas pela transmissão silvestre entre primatas não-humanos (PNH) e mosquitos selvagens do gênero *Aedes* (*Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes africanus*, e *Aedes neoafricanus*) e acabaram por infectar humanos que entravam nesse *habitat* (Diallo *et al.*, 1999).

Neste primeiro cenário de infecção, o CHIKV dispunha de dois tipos de reservatório: os humanos - em períodos de epidemias (normalmente associado a estação chuvosa e maior densidade vetorial) acabavam servindo como reservatório para o vírus e auxiliando na sua disseminação – e mamíferos silvestres – entre os episódios de epidemia (em períodos de seca, quando diminui-se a densidade dos vetores silvestres) - são os principais reservatórios encontrados (McCrae *et al.*, 1971).

O estabelecimento de ciclos urbanos ocorreu com a chegada do vírus no continente asiático, onde os vetores silvestres africanos não estão presentes. Nas epidemias ocorridas na Ásia, o primeiro e mais importante vetor encontrado foi o *Aedes aegypti* e, posteriormente, o *Aedes albopictus* (Coffey *et al.*, 2014). Essas duas espécies estão presentes em quase todas as regiões do globo. O *Ae. aegypti* é uma espécie conhecidamente urbana, doméstica e disseminada em regiões tropicais e subtropicais em todos os continentes. Enquanto o *Ae. albopictus*, além dividir as mesmas características, ainda tem maior resistência a baixas temperaturas, cobrindo áreas onde o *Ae. aegypti* não alcança (Her *et al.*, 2009).

Além dos ciclos citados, que são responsáveis pela manutenção do vírus nos ambientes urbanos e silvestres, há a possibilidade da transmissão vertical

do vírus. Essa transmissão ocorre quando a mãe infectada transmite o CHIKV ao feto, podendo causar morte fetal, aborto e doenças congênitas. Manifestações neurológicas (encefalopatias) são comuns nesse tipo de transmissão ([Weaver et al., 2016](#)).

### **1.2.3. Características - agente etiológico e estrutura do genoma**

O CHIKV pertence a família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*. A família *Togaviridae* é composta por dois gêneros distintos: os *Rubivirus* – cujo único representante é o vírus da rubéola – e os *Alphavirus*. O gênero *Alphavirus* é composto, em sua maioria, por arbovírus (vírus transmitidos por insetos, principalmente mosquitos) que causam doenças tanto em humanos quanto em animais. Esse gênero possui a capacidade de se replicar tanto em hospedeiros vertebrados quanto em hospedeiros invertebrados. Como característica, seus representantes possuem capsídeo icosaédrico, são envelopados e possuem como genoma viral, uma molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva que atua tanto como RNA genômico quanto como RNA mensageiro ([Outline et al., 2017](#)).

O vírus chikungunya tem cerca de 70nm de diâmetro, seu RNA é composto por uma sequência de 11.8kB, o qual é limitado e poliadenilado na extremidade 3' ([Her et al. 2009](#)). O genoma codifica duas fases de leitura aberta (Figura 4). A ORF da extremidade 5' codifica as quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) que participam diretamente de processos necessários a replicação viral, tais como a replicação do genoma em si e clivagem de poliproteínas. Ela pode ser expressa como uma poliproteína nsP1-3 ou nsP1-4, sendo clivada posteriormente pela protease encodada por nsP2. A segunda ORF contém as proteínas estruturais do vírus (C-E3-E2-6K-E1) que será traduzida em forma de uma poliproteína única e posteriormente clivada em proteínas do capsídeo e proteínas do envelope viral ([Thiberville et al., 2013](#)).

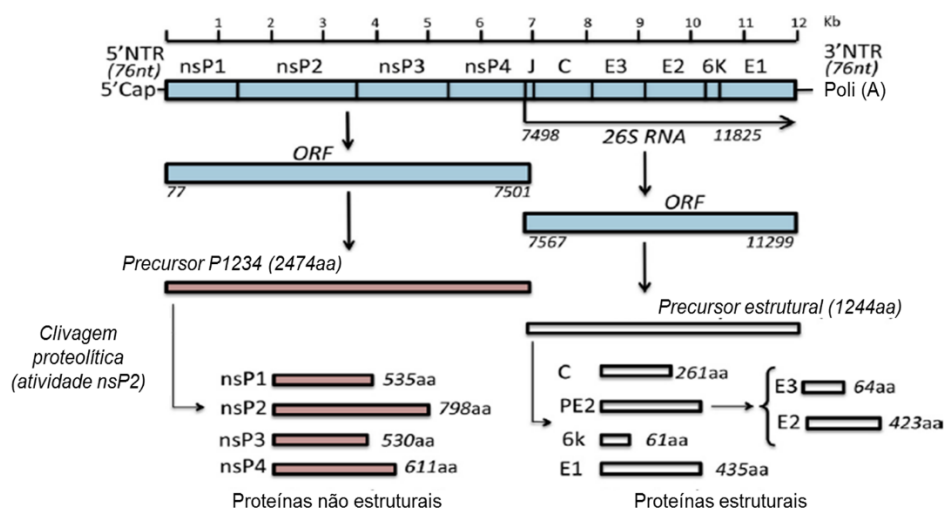


Figura 4. Organização do genoma do CHIKV e dinâmica dos eventos pós traducionais. Adaptado de Thiberville et al., 2013.

As glicoproteínas E2/E1 se organizam em heterodímeros, formando uma espécie de espículas presentes na superfície do vírion (partícula viral infecciosa). Essas espículas têm papel importante na infecção das células hospedeiras, se inserindo na membrana plasmática e levando a internalização da partícula viral através de mecanismos de endocitose (Weaver et al., 2016).

#### 1.2.4. Disseminação e replicação viral nas células hospedeiras

Após o repasto sanguíneo feito pelo mosquito fêmea hematófaga infectada, o CHIKV começa sua replicação nas células presentes no sítio de infecção. O vírus tem a capacidade de infectar diferentes tipos celulares. Inicialmente, na derme, ele infecta células epiteliais e fibroblastos presentes no epitélio. Em seguida, invade macrófagos, disseminando para os linfonodos proximais e posteriormente alcança fígado e articulações (Lum & Ng, 2015).

Nas células-alvo, as espículas formadas por E1/E2 se organizam em forma trimérica e atuam na ancoragem e internalização do vírion através de endocitose mediada por receptores. A proteína E2 já foi caracterizada como sendo a primeira a desempenhar esse papel de ancoragem nas células suscetíveis. Após entrar nas células hospedeiras e ser encaminhado para o endossoma primário, ocorrem mudanças conformacionais no envelope viral, devido à diminuição do pH dessa organela. Com essas mudanças a proteína E1 é exposta, o que permite sua interação com a membrana endossomal e posterior

fusão do envelope, resultando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma (Thiberville *et al.*, 2013).

O RNA da partícula viral é liberado e imediatamente traduzido na poliproteína contendo as nsP1-4. As proteínas não estruturais associadas formam um complexo de replicação viral responsável pela geração de fitas de RNA de polaridade negativa. Essas fitas são formadas para que haja a propagação do genoma e produção em grande escala das novas partículas virais. As proteínas não estruturais nsP2 e nsP4 desempenham o papel de helicase e de polimerase, respectivamente, enzimas diretamente envolvidas nesse processo de replicação do genoma viral (Lum & Ng, 2015).

As proteínas estruturais são formadas a partir da ORF localizada na extremidade 3'. O RNAm precursor é traduzido em um polipeptídeo único que será posteriormente clivado em C, E3, E2, 6K e E1. As proteínas do capsídeo formam um nucleocapsídeo fenestrado, onde o genoma viral irá se inserir durante a montagem dos novos vírions. Já foi relatado em outros *Alphavirus* que a proteína 6K desempenha a função de canal seletivo de cátion – alterando a permeabilidade da membrana e facilitando os processos de disseminação (Lum & Ng, 2015). A proteína E3 desempenha importante papel direcionando as proteínas estruturais para o retículo endoplasmático rugoso, possibilitando a montagem do capsídeo. Os heterodímeros triméricos de E1/E2 se formam antes da montagem da partícula viral, já sendo incorporados na forma de espículas. Um vírus maduro e infectante apresenta 80 espículas em sua superfície (Voss *et al.*, 2010).

O esquema a seguir (Figura 5) sucinta todos os processos ocorridos desde a entrada do vírus através de endocitose, até seu brotamento a partir da membrana plasmática das células infectadas (Lum & Ng, 2015).

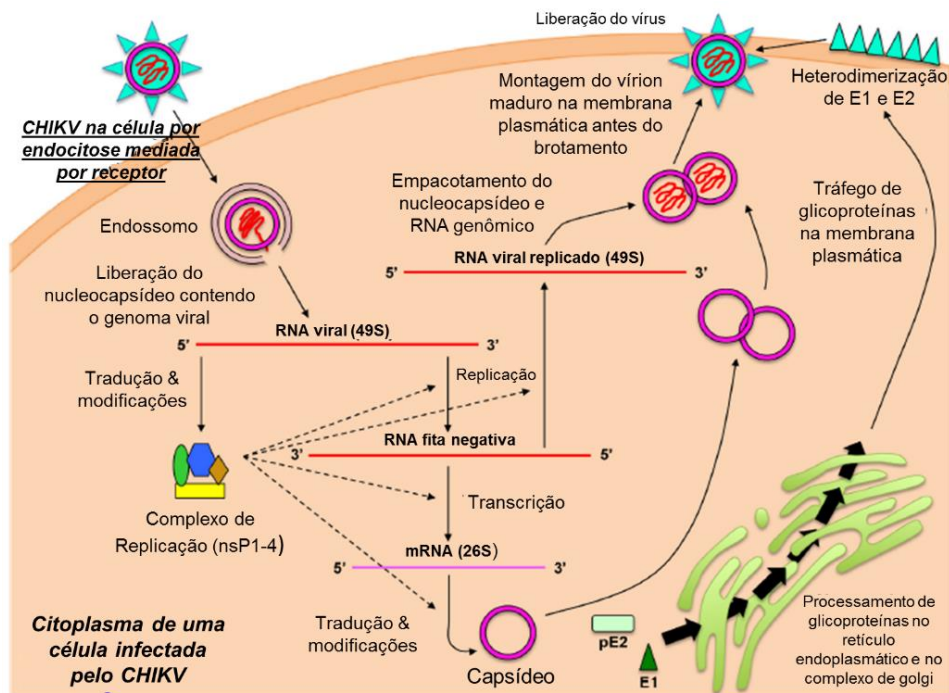


Figura 5. Ciclo de replicação do CHIKV. O vírus entra em células suscetíveis através de endocitose mediada por receptor, desencadeando todo o processo de replicação, montagem e brotamento das novas partículas virais. Adaptado de Lum & Ng, 2015.

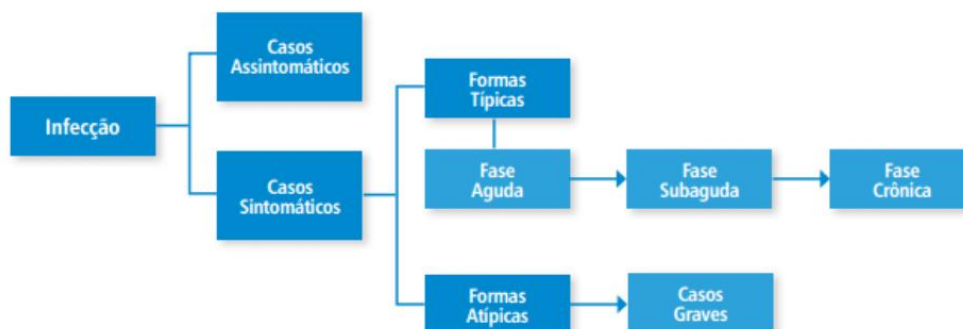
Após replicação no sítio de inoculação, o vírus pode se disseminar através da corrente sanguínea e vasos linfáticos, chegando a fígado, músculos, articulações, baço, linfonodos e sistema nervoso. Na primeira semana de sintomas é possível detectar altas taxas de viremia, chegando a  $10^9$  cópias/mL de sangue (Lum and Ng, 2015; Panning *et al.*, 2008).

### 1.2.5. Manifestações clínicas da infecção pelo CHIKV

As manifestações clínicas observadas em decorrência da infecção pelo CHIKV, podem se apresentar em amplo espectro clínico. As mais comuns são febre alta, mialgia, artralgia bilateral e *rash*. Entretanto, alguns pacientes podem apresentar sintomas mais graves como encefalopatias e neuropatias, problemas oculares e problemas cardíacos. A infecção é autolimitada e de resolução espontânea em cerca de duas semanas, embora não seja raro a persistência dos sintomas durante meses ou até anos (Her *et al.*, 2009; Kam *et al.*, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde em seu manual “*Chikungunya: Manejo Clínico*” classifica a infecção pelo vírus da seguinte maneira (figura 6) (Santelli *et al.*, 2017):





Fonte: SVS/MS.

Figura 6. Classificação da infecção pelo CHIKV. Fonte: Santelli et al., 2017.

### 1.2.5.1. Casos assintomáticos

A infecção pelo CHIKV pode ser de caráter assintomático. Ainda não está bem estabelecido qual a porcentagem média de indivíduos que não manifestam sintomas. A exemplo da variabilidade dos dados disponíveis, dois estudos que analisam a taxa de soroconversão da população pós-epidemia, em comunidades rurais da Índia e nas Filipinas, mostram 12.8% a 82% de assintomáticos nas duas localidades, respectivamente (Kumar et al., 2011; Yoon et al., 2015).

### 1.2.5.2. Casos sintomáticos

Quando sintomática, a infecção pode se manifestar de forma típica ou atípica:

#### 1.2.5.2.1. Formas típicas

As manifestações típicas podem compreender três fases: fase aguda, fase subaguda e fase crônica (Santelli et al., 2017).

Após o período de incubação (2-7 dias), inicia-se a fase aguda com duração de até 21 dias. Esta fase é caracterizada pela febre alta, mialgia, poliartralgia bilateral intensa - frequentemente descrita como debilitante. A rigidez articular em mãos, tornozelos e joelhos também é um sintoma comum relatado pelos pacientes, principalmente ao acordar (Borgherini et al., 2007). Manifestações cutâneas como exantemas, eritemas, prurido e lesões de mucosa também estão presentes na maioria dos casos. Dentre os sintomas sistêmicos

que podem ser manifestados durante essa fase estão as adenopatias, diarreia, náuseas e vômito. Em pacientes com doenças crônicas de base, já foram descritas descompensações cardiovasculares, respiratórias, renais e agravamento de doenças autoimunes (da Cunha & Trinta, 2017).

Se os sintomas persistirem por mais de 21 dias, considera-se que o paciente entrou na fase subaguda (ou pós-aguda) da doença. A fase subaguda pode estender-se até 3 meses de manifestações clínicas. A estimativa varia em relação a porcentagem de pacientes a evoluir para esta fase, acredita-se que pelo menos 50% dos acometidos ainda apresentarão dores após as primeiras três semanas de doença. Há persistência das inflamações articulares e peri articulares cujos episódios de dor podem ser contínuos ou recorrentes, frequentemente acompanhados de edemas e compressões nervosas. Nessa fase também podem ocorrer descompensações metabólicas, endócrinas (como a de diabetes pré-existente, por exemplo), queda de cabelo, depressão e ansiedade (Simon *et al.*, 2015).

A fase crônica se inicia após 90 dias de sintomas com duração que pode se estender por meses ou anos. A artralgia acompanhada de edema e rigidez matinal são os sintomas mais comuns nessa fase. É comum que pacientes relatem variações na intensidade e duração dos períodos de dor. Estima-se que pelo menos 40% dos indivíduos infectados apresentem quadros dolorosos após três meses do início dos sintomas (da Cunha & Trinta, 2017).

#### 1.2.5.2.2. Formas atípicas

Manifestações atípicas e graves são relatadas durante a ocorrência de epidemias. Dentre elas estão distúrbios gastrointestinais (como estomatites), distúrbios no sistema nervoso (como encefalopatias, anormalidades sensoriais, Síndrome de Guillain-Barré e neuropatias), distúrbios óticos (como hemorragias, retinites e uveites), além de miocardites, pericardites, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hepatite fulminante (Silva & Dermody, 2017).

Em recém-natos - cujas mães foram infectadas poucos dias antes do parto -, podem aparecer hemorragias, coagulação intravascular disseminada, complicações cardíacas e neurológicas. Sintomas menos graves nesses casos

incluem febre, *rash*, irritabilidade e dermatite bolhosa (González-Sánchez & Arroyo, 2018).

### 1.2.6. Diagnóstico e tratamento

Durante os períodos de surto e epidemia a maioria dos casos notificados no Brasil são de diagnóstico clínico epidemiológico, a partir das manifestações clínicas observadas nos pacientes. Os diagnósticos laboratoriais utilizados para a confirmação do CHIKV podem ser de detecção direta do vírus ou de maneira indireta através da pesquisa de anticorpos específicos (Santelli *et al.*, 2017).

Exames laboratoriais podem apresentar leucopenia, linfopenia e trombocitopenia. Os exames de detecção do vírus mais utilizados são o RT-PCR (*reverse-transcriptase–polymerase-chain-reaction*) (Lanciotti *et al.* 2007) ou isolamento viral em cultura de células (padrão ouro), a partir de amostras sanguíneas dos pacientes. A pesquisa de anticorpos específicos no soro de pacientes com suspeita de CHIKV se dá pela técnica de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), porém em regiões onde há circulação do vírus mayaro (MAYV) há risco de cruzamento (Santelli *et al.*, 2017). A dinâmica de utilização de cada teste, segue a evolução da doença no que tange o período de viremia e aparecimento de anticorpos específicos, conforme mostra a figura abaixo (Figura 7) (Tanabe *et al.* 2018).

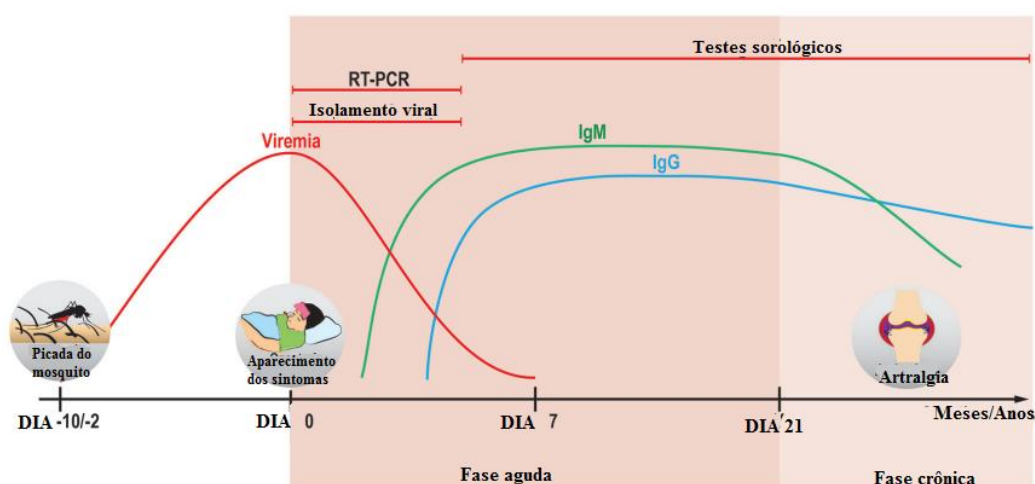


Figura 7. Utilização de diferentes métodos de diagnóstico durante a infecção pelo CHIKV. Adaptado de Tanabe *et al.*, 2018.

O Ministério da Saúde preconiza que o diagnóstico diferencial deve ser empregado afim de diferenciar a infecção pelo CHIKV de outros vírus circulantes, principalmente DENV, ZIKV e MAYV. Outras doenças também devem ser excluídas como malária, leptospirose, febre reumática e artrite séptica (Santelli *et al.*, 2017).

O tratamento utilizado para a Febre Chikungunya é voltado a amenizar os sintomas, tendo em vista que não há medicação específica para o vírus. Dependendo do grau de dor relatado e da fase em que o paciente se encontra, serão prescritas diferentes classes de medicamentos (da Cunha & Trinta, 2017).

Segundo Brito e colaboradores, em “*Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline*”, a administração de analgésicos como dipirona, paracetamol e até opióides em casos de dores muito intensas, deve ser realizada durante a fase aguda. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são desaconselhados nessa fase devido ao risco de complicações. Pacientes apresentando dor neuropática devem ser tratados com formulações adequadas de anticonvulsivantes e antidepressivos, pois não respondem aos analgésicos convencionais. Ao entrar na fase subaguda, o paciente que permanece com as manifestações dolorosas pode ser tratado com AINES e corticosteroides em dosagens anti-inflamatórias. Já na fase crônica, poderá ser prescrita a hidroxicloroquina, sulfassalazina e metrotexato, sempre sob acompanhamento médico constante e avaliação da evolução do paciente (de Brito *et al.*, 2016).

### **1.2.7. Imunopatogênese da infecção: Resposta imune ao CHIKV**

Os alvos preferenciais do CHIKV são tecidos linfoides, fígado, baço, sistema nervoso central, articulações e músculos. As células epiteliais, endoteliais, macrófagos, monócitos, fibroblastos, células de Langerhans e células dendríticas já foram descritas como suscetíveis ao mesmo (Kasarskis *et al.*, 2018; Teng *et al.*, 2015). A evolução da disseminação viral que ocorre durante a fase aguda é marcada por intenso infiltrado de leucócitos mononucleares nas articulações e músculos – associado ao quadro de dor característico da doença (Rivas-Estilla *et al.*, 2015).

A resposta inflamatória intensa é marcante na infecção pelo CHIKV. Durante a fase aguda há elevação na produção de citocinas pró-inflamatórias como CCL2, CXCL10, CCL4, MIF, IL-6, CXCL8 e CCL5. Essas moléculas atuam recrutando glóbulos brancos para os sítios de replicação e orquestrando a resposta inflamatória ([Rivas-Estilla et al., 2015](#)).

A resposta imune inata do hospedeiro é crucial no controle da infecção pelo CHIKV e a persistência dos sintomas parece ser consequência de características dessa resposta inicial. Neste sentido, foi visto que os altos níveis circulantes de IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-12, GM-CSF, CXCL10 e CCL2 estão associados com a elevada carga viral, e maiores níveis plasmáticos de IL-6 são encontrados nos pacientes com artralgia persistente ([Gasque et al., 2015](#)).

Alguns autores discutem se a proporção e a persistência dos sintomas estão relacionadas a um desbalanço excessivo de citocinas pró-inflamatórias nos primeiros estágios da infecção. A exacerbação na produção de mediadores pró-inflamatórios, migração e ativação das células efetoras do sistema imune celular em geral, culminam com lesões teciduais e persistência da inflamação articular ([Petitdemange et al., 2015](#)).

Já foi visto persistência de antígeno e RNA viral em pacientes na fase crônica, com mais de um ano de sintomas. Esses achados foram associados a citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\alpha$ , CCL2, IL-8 e IL-6) que também foram detectadas no líquido sinovial durante a mesma fase. Ademais, discute-se se células do sistema imunológico estariam sendo infectadas e promovendo a persistência viral local ([Hoarau et al., 2010](#)).

## 2. Justificativa

O Brasil vem sofrendo com epidemias causadas por arbovírus por mais de 30 anos. Até 2013, o DENV liderava em número de casos e número de óbitos a cada boletim epidemiológico. Entre os anos de 2013 e 2014 ocorreram importantes mudanças nesse cenário epidemiológico com a introdução do vírus ZIKV e CHIKV caracterizando a tríplice epidemia no país (Lowe *et al.*, 2018; de Souza *et al.*, 2018).

A febre chikungunya tem se espalhado gradativamente pelo Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, e o número de casos registrado no primeiro semestre no estado do Rio de Janeiro foi quase o dobro do mesmo período no ano passado. Foram registrados 110.627 casos prováveis de Febre chikungunya com 57 óbitos confirmados laboratorialmente no país, em 2019 (Ministério da Saúde, 2019).

As manifestações clínicas da infecção pelo CHIKV são similares aquelas observadas para o DENV e ZIKV, no entanto, se destaca destes devido ao grande número de pacientes que evoluem para a cronicidade. Até o momento, não há tratamento ou vacinas para o Chikungunya. As ações preventivas são focadas no combate a proliferação vetorial, enquanto os pacientes são amparados com medicações de ajuda e suporte, como a administração de analgésicos e anti-inflamatórios. Além do impacto direto na saúde pública decorrente das epidemias nacionais, há também o impacto direto na economia. Soumahoro e colaboradores, em 2011, mostraram que na epidemia de 2005-2006, ocorrida em *La Reunion Islands*, onde um terço da população foi infectada, a estimativa de custos gerais com o agravo para o governo foi de 44 milhões de euros - entre gastos com o sistema de saúde no tratamento direto com o paciente e *deficit* econômico devido aos pacientes incapacitados de trabalhar (Soumahoro *et al.*, 2011).

O impacto da tríplice epidemia na recuperação de indivíduos infectados, desfecho clínico, co-infecções, infecções subsequentes e/ou susceptibilidade ao desenvolvimento de casos crônicos são perguntas ainda sem resposta. O aprofundamento no estudo do curso das infecções e interações desses arbovírus entre si e com seus hospedeiros, bem como a resposta imunológica desencadeada pela infecção natural contribuirá para o desenvolvimento de

vacinas, tratamentos e caracterização de prognósticos; norteando a atenção e abordagem clínica dos pacientes.

Já foi visto que os monócitos são infectados pelo CHIKV *in vitro*, mas há carência de estudos correlacionando a infecção natural pelo CHIKV com as diferentes subpopulações de monócitos, ativação celular, expressão de PRRs e perfil de liberação de citocinas em associação com quadros agudos, crônicos e co-infecções (Kasarskis *et al.*, 2018). Também já foi descrito que macrófagos são os principais reservatórios do vírus Chikungunya *in vivo* em estágios tardios (Hoarau *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012; Labadie *et al.*, 2010), o que ratifica a importância do presente trabalho.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar subpopulações de monócitos na resposta imune antiviral em pacientes naturalmente infectados pelos vírus chikungunya e em modelos *in vitro* de interação com este vírus.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Analisar parâmetros clínicos e laboratoriais em pacientes infectados pelo CHIKV;
2. Avaliar a frequência das subpopulações de monócitos (clássicos - CD14<sup>++</sup>CD16, intermediários - CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> e não-clássicos - CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>++</sup>) em pacientes infectados pelo CHIKV;
3. Avaliar a expressão de marcadores de ativação (CD163, HLA-DR) e receptores da imunidade inata (TLR2, TLR4 e TLR7) nas subpopulações de monócitos;
4. Quantificar fatores solúveis associados à resposta antiviral e inflamatória tais como citocinas (IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-15), quimionas (CCL2, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL10) e fatores de crescimento (EGF, VEGF, PDGF-BB) no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV;
5. Determinar a frequência de subpopulações de monócitos humanos durante infecção *in vitro* de culturas de PBMCs de doadores saudáveis;
6. Determinar a capacidade do CHIKV em ativar subpopulações de monócitos humanos durante infecção *in vitro* de culturas de PBMCs de doadores saudáveis.



## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. População de estudo e critérios de inclusão e exclusão

Amostras e fichas de anamnese contendo todas as manifestações clínicas, comorbidades e dados de contato dos pacientes suspeitos de infecção por DENV, ZIKV e CHIKV foram coletadas a partir de trabalho de campo nas unidades de saúde (1) Hospital Rio Laranjeiras (Rio de Janeiro/RJ), (2) Hospital dos Plantadores de Cana (Campos dos Goytacazes/RJ) e (3) Hospital Professora Esterina Corsini (Campo Grande/MS). Esse trabalho foi possível graças a parcerias estabelecidas entre o Laboratório de Imunologia Viral e os respectivos representantes dos centros de saúde, (1) Dr. Paulo Vieira Damasco, (2) Dr. Luiz José de Souza e (3) Dr. Rivaldo da Cunha Venâncio. O diagnóstico diferencial para DENV, ZIKV e CHIKV foi realizado nas próprias unidades de saúde e confirmados posteriormente pelo Laboratório de Imunologia Viral (LIV – IOC/FIOCRUZ). Dados laboratoriais e para levantamento demográfico foram obtidos através da ficha dos pacientes.

No total foram coletadas cerca de 350 amostras de pacientes que procuraram as referidas unidades de saúde, durante as epidemias ocorridas nos anos de 2016 e 2018 – anos em que houve grande incidência da doença nesses dois estados. Dados epidemiológico e laboratoriais referentes a epidemia de 2016 já estão publicados ([Azeredo et al., 2018](#); [Souza et al., 2017](#)).

Foram considerados casos suspeitos de infecção pelo CHIKV todo os pacientes com febre de início súbito maior que 38,5°C, que apresentaram artralgia ou artrite intensa de início agudo (não explicado por outras condições), sendo residentes - ou tendo visitado - áreas de epidêmicas até duas semanas antes do início dos sintomas ou que tenha vínculo epidemiológico com caso confirmado ([Brasil, 2015](#)).

Como critério de inclusão nesse estudo, o paciente precisou apresentar resultado positivo para o teste sorológico e/ou molecular para CHIKV. Nos casos de monoinfecções, as amostras precisaram apresentar diagnóstico molecular positivo para CHIKV e negativo para molecular de ZIKV e DENV, além de IgM e NS1 negativos para DENV.

Foram consideradas “co-infecções” as amostras positivas para CHIKV-DENV e CHIKV-ZIKV através do diagnóstico molecular. Após confirmação do

diagnóstico, as amostras provenientes de pacientes e doadores saudáveis foram classificadas em quatro grupos, conforme a tabela a seguir (Tabela 1):

**Tabela 1. Divisão dos grupos de análise**

Grupo	n utilizado	Classificação
1	67	Agudos
2	8	Subagudos
3	14	Crônicos
4	17*	Co-infectados
5	30	Sadios

\*CHIKV-DENV n=3 e CHIKV-ZIKV n=14

A classificação dos pacientes nos diversos grupos obedeceu às diretrizes do Ministério da Saúde ([Santelli et al., 2017](#)).

A maioria dos casos foi de pacientes na fase aguda (n = 67). A cronificação da doença foi avaliada por acompanhamento dos pacientes que prosseguiram por mais de 3 meses (contato através de meios eletrônicos e visitas ao laboratório para que novas amostras fossem coletadas), a fim de se verificar o desfecho clínico.

Além dessas, foram utilizadas 19 amostras de pacientes apresentando outras doenças febris (ODF), cujos resultados do diagnóstico foram negativos para DENV, ZIKV e CHIKV. Esse grupo serviu somente para comparação de parâmetros hematológicos entre pacientes infectados com CHIKV e o padrão encontrado em ODF.

Para controles desse estudo, foram utilizadas amostras de voluntários sadios que se apresentaram ao LIV e *Buffy Coats* de doadores de sangue provenientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (UFRJ). Nas amostras de doadores foram realizados testes sorológicos para Sífilis - VDRL, Chagas – Hemaglutinação – ELISA, Hepatites – HBsAg – anti-HCV, ALT-anti-HIV-1 e 2 – ELISA, anti-HTLV-1 e 2 - ELISA confirmando sorologia negativa, no próprio banco de sangue.

Para a inclusão no projeto os pacientes assinaram o Termo de Consentimento aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa: CAAE-57221416.0.1001.5248, Plataforma Brasil - Dengue, Zika e Chikungunya: uma

abordagem multidisciplinar em apoio a investigação destas arboviroses no Brasil, 2017 (Anexo).

Os experimentos *in vitro* também foram realizados a partir de *BuffyCoats* de doadores sadios também provenientes do HUCFF.

#### **4.2. Coleta de sangue**

Amostras de sangue dos pacientes foram coletadas para obtenção de sangue total, de células e plasma. Foram utilizados tubos contendo anticoagulante ACD (BD Vacutainer®) para coleta de um volume aproximado de 10 mL de sangue. Para a obtenção do soro, foi feita a coleta de aproximadamente 5 mL de sangue em tubo seco (BD Vacutainer®).

O congelamento do plasma foi feito em criotubos de 500 µL de amostra e imediatamente congelados a -80°C. Os tubos com o soro dos pacientes foram centrifugados a 1600 x g por 5 minutos. Após centrifugação foram feitas alíquotas de 500 uL e congeladas a -80°C.

#### **4.3. Diagnóstico laboratorial**

Para o diagnóstico específico e diferencial entre DENV, ZIKV e CHIKV foram feitos testes sorológicos e moleculares.

Os testes sorológicos para DENV e CHIKV foram utilizados em todas as amostras coletadas. Para o DENV foram utilizados: Kit Panbio Dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália), Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California EUA) e ELISA Platelina™ Dengue NS1 Ag – ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA). Para o CHIKV foi utilizado o Kit Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha). Todos os testes foram realizados de acordo com as especificações dos fabricantes. Não foi utilizado diagnóstico sorológico para ZIKV devido à falta de um teste satisfatório no mercado que não apresente altos índices de reatividade cruzada com outros flavivírus (Zaidi *et al.*, 2019).

Os testes moleculares para detecção do genoma viral dos 3 vírus foram realizados em todas as amostras. Para o DENV foram utilizados protocolos para detecção do vírus e tipagem dos sorotipos circulantes por RT-PCR convencional

e RT-PCR em tempo real, de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti e colaboradores (Lanciotti *et al.*, 1992) e Johnson e colaboradores (Johnson *et al.* 2005). Para a detecção do genoma do ZIKV e CHIKV foram utilizados protocolos de RT-PCR em tempo real descritos por Lanciotti e colaboradores (Lanciotti *et al.*, 2008; 2007).

Foram considerados positivos para CHIKV as amostras com resultados positivos na sorologia e/ou na RT-PCR. Foram considerados casos de co-infecção as amostras positivas para CHIKV enquadradas nos critérios acima e positivas para RT-PCR de ZIKV ou DENV e/ou positivas para o antígeno NS1 de dengue.

#### **4.4. Obtenção e congelamento das PBMCs**

Após a coleta, o plasma e as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram adquiridos por gradiente de Ficoll – Histopaque™ (Sigma Aldrich). Os 10mL de sangue foram cuidadosamente vertidos em tubos contendo 6 mL de Ficoll e centrifugado por 30 minutos a 400 x g, 0 (zero) desaceleração. Após centrifugação, formou-se o gradiente de concentração (sedimento>Ficoll>PBMC>plasma) de onde o anel de PBMC foi retirado e lavado duas vezes com meio RPMI suplementado [L-glutamina 2 mM (Gibco, Thermo Fisher Scientific), aminoácidos não-essenciais 0,5% (Gibco, Thermo Fisher Scientific), antibiótico penicilina-estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, Thermo Fisher Scientific), fungizona 100 mg/mL (Gibco, Thermo Fisher Scientific) e bicarbonato de sódio (até atingir o pH 7,4)]. Após lavagem, as células foram ressuspensas em 5 mL e foram, então, retirados 20 uL da suspensão celular para contagem das células viáveis.

Na suspensão celular separada para contagem das células viáveis foram adicionados 20 uL de Azul de Trypan (LGC Biotecnologia). A contagem se deu em câmara de Neubauer ou no contador automático (BIO-RAD modelo TC20).

O congelamento das PBMCs foi feito em criotubos de 1 mL contendo  $10^6$ - $10^7$  células. As células, após centrifugação a 400 x g por 7 minutos, foram ressuspensas em soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen Co.) e aliqüotadas em solução de congelamento na proporção de 90% de SFB + 10% de DMSO (Sigma Aldrich). Ao colocar as células na solução de congelamento, elas foram

rapidamente transferidas para a câmara de congelamento lento e acondicionadas a -80°C, por 24 horas, e posteriormente transferidas para os balões contendo nitrogênio líquido.

#### **4.5. Produção de massa viral**

Para realização dos ensaios de infecção *in vitro*, foi utilizado o vírus CHIKV doado pela Dra. Ana Bispo, do Laboratório de Flavivírus – IOC/FIOCRUZ, isolado de paciente com Febre Chikungunya.

Para a produção e crescimento da massa viral de CHIKV, foram utilizadas células VERO (*African green monkey kidney vero cell line*) cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, Thermo Fisher Scientific), suplementado com: 10% SFB (Gibco, Thermo Fisher Scientific), TPO<sub>4</sub> 10% (Sigma Aldrich), bicarbonato de sódio 0,75 g/L (Sigma Aldrich), L-glutamina 2 mM (Gibco, Thermo Fisher Scientific), aminoácidos não-essenciais 0,5% (Gibco, Thermo Fisher Scientific), antibiótico penicilina-estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, Thermo Fisher Scientific), fungizona 100 mg/mL (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Foi utilizada uma garrafa grande (150cm<sup>2</sup> - 50 mL) para a produção da massa de CHIKV. Após verificar que a monocamada estava confluenta, foi adicionado o inóculo viral [multiplicidade de infecção (MOI) 0,1] e acompanhamento do efeito citopático por 48h. Após esse período, as células foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos o sobrenadante contendo o vírus foi separado, alíquotado e armazenado a -80°C. Para a confirmação da infecção foi realizado RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) nas alíquotas de CHIKV.

#### **4.6. Infecção de PBMCs com o CHIKV**

Para realização dos experimentos de infecção *in vitro* com o CHIKV foram utilizadas PBMCs provenientes de doadores sadios do HUCFF (UFRJ). Para realização do ensaio, as células foram descongeladas em 5 mL de SFB puro, contadas e avaliada a viabilidade celular. Foram utilizadas somente as células que apresentaram viabilidade maior do que 75%. O volume celular foi ajustado para 1x10<sup>6</sup> células/poço e em seguida essas células foram plaqueadas (placas de fundo em U) (Costar®, Sigma Aldrich) em RPMI suplementado e incubadas por 2 horas em estufa úmida (37°C com 5% CO<sub>2</sub>). Após o período de

acondicionamento, as placas foram centrifugadas a 400 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células então foram ressuspensas em RPMI suplementado e nos poços de interesse foi adicionado 20uM de peptídeo bloqueador da MYD88 (MyD88 Inhibitor Peptide Set – Novus Biologicals, cat.: NBP2-29328) com subsequente incubação por 2 horas na estufa. Após esse período a placa foi novamente centrifugada, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado nos poços de interesse 1 µg/mL do agonista do TLR7/8 (R848 – InvivoGen, cat.: tlrl-r848). As células passaram por novo período de incubação por 2 horas na estufa (Dreschers *et al.*, 2016).

Após a primeira etapa de bloqueio (MYD88i) e estimulação celular (R848), as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e foi adicionado 200µl de PRMI contendo o inóculo viral (MOI 0,1) nos poços designados, com período de adsorção de uma hora na estufa, sem agitação. Seguindo a adsorção, o inóculo foi retirado e as células permaneceram na estufa para o estabelecimento da infecção por 20 horas.

No segundo dia, os sobrenadantes foram separados e guardados a -80°C para posteriores análises de quantificação da carga viral. Já as células foram imunomarcadas para análise através de citometria de fluxo. Para essa leitura foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-CD14, anti-CD16, anti-CD163, anti-CD3, anti-CD56, anti-HLADR, anti-TLR7 e anti-CHIKV.

#### **4.7. Imunofenotipagem de monócitos dos experimentos *ex vivo* e *in vitro* - marcação extracelular com posterior marcação intracelular**

Para as imunomarcações nas PBMCs proveniente dos pacientes (*ex vivo*), foram utilizados os anticorpos: anti-CD14, anti-CD16, anti-CD163, anti-HLA-DR, anti-TLR2, anti-TLR4, anti-TLR7 e anti-CD3.

As células dos pacientes foram descongeladas em 5 mL de SFB puro e centrifugadas a 715 x g por 5 minutos. Após centrifugação as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado e contadas utilizando o contador de células automático, conforme descrito anteriormente. Foi ajustada a concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço.

Após nova centrifugação, as células foram marcadas com *Live/Dead*<sup>TM</sup> (Molecular Probes, cat.: L34955), segundo especificações do fabricante.

Brevemente, foi diluído 1uL do composto em 1mL de PBS, adicionou-se 200uL da solução por poço prosseguindo com incubação por 30 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A partir deste momento, todos os procedimentos foram feitos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz direta.

Dando prosseguimento ao protocolo de citometria, inicialmente foi realizada a marcação extracelular. Para isso, as células foram incubadas por 20 minutos com solução de bloqueio (PBS, BSA 1%, plasma humano inativado 5%), posteriormente lavadas com PBS/BSA e incubadas com o mix de anticorpos monoclonais de superfície celular durante 30 minutos. Após incubação, essas células foram novamente lavadas com PBS/BSA e fixadas para que pudessem ser feitas as marcações intracelulares. A fixação se deu pela adição de solução de PBS/paraformaldeído (PFA) 4% e incubação de 10 minutos a 4°C.

Após fixação foi iniciada a marcação intracelular, onde as células foram lavadas e permeabilizadas durante 7 minutos com solução de permeabilização (PBS, BSA 1%, saponina 0.15%). Então, foram novamente bloqueadas com solução de permeabilização + 5% plasma humano inativado (56°C por 1 hora) durante 20 minutos. As células foram lavadas e marcadas com o mix de anticorpos monoclonais intracelulares por 30 minutos e sofreram nova fixação com PFA. As amostras foram acondicionadas em 200µL de PBS e transferidas para tubos de citometria para posterior leitura.

Para os ensaios *in vitro* foi utilizado o mesmo protocolo de marcação descrito anteriormente, a exceção do mix de anticorpos utilizados. Para esse ensaio foram utilizados os anticorpos: anti-CD14, anti-CD16, anti-CD163, anti-CD3, anti-CD56, anti-HLA-DR, anti-TLR7 e anti-CHIKV.

Devido à pouca disponibilidade de anticorpos para o vírus CHIKV no mercado, foi utilizado o anticorpo monoclonal (abcam) conjugado ao fluorocromo AF647 através do Alexa Fluor® 647 Antibody Labeling Kit (Molecular Probes, cat.: A20186). O protocolo foi realizado segundo especificações do fabricante, onde o anticorpo a ser conjugado é incubado com o anticorpo fluorescente e, após incubação, passa por uma coluna onde os fluorocromos não marcados ficam presos sobrando apenas o anticorpo conjugado com o fluorocromo.

O quadro a seguir engloba todas as informações dos os anticorpos utilizados tanto nos ensaios *ex vivo* quanto nos ensaios *in vitro*.

**Quadro 1. Anticorpos monoclonais utilizados para os ensaios de citometria.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Fabricante</b>
Anti - CD14	V500	M5E2	561391	BD
Anti - CD16	PECy7	3G8	302016	BioLegend
Anti – CD163	BV650	GHI/61	563888	BD
Anti - HLADR	PerCP	L203	FAB4869C	R&D
Anti - TLR2	AF647	TL2.1	309714	BioLegend
Anti - TLR4	AF488	HTA125	53-9917-42	eBioscience
Anti - TLR7	PE	533707	IC5875P	R&D
Anti – CD3	AF700	UCHT1	557943	BD
Anti – CD56	PE - TxRed®	MEM-188	MHCD5617	Invitrogen
Anti - CHIKV	AF647	3585	ab155841	abcam

As leituras de todos os experimentos foram realizadas por citometria de fluxo multiparamétrica (BD FACSAria II - BD Biosciences, US) – Plataforma de Citometria/FIOCRUZ.

#### **4.8. Quantificação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento séricos por ELISA**

Foram feitas dosagens, pela técnica de ELISA, para as seguintes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento:

**Quadro 2. Relação dos kits de ELISA utilizados.**

<b>Kit</b>	<b>Catálogo</b>	<b>Fabricante</b>
Human VEGF Standard TMB EDK	900-T10	PEPROTECH
Human MIP-1 $\beta$ (CCL4) Standard TMB EDK	900-T36	PEPROTECH
Human PDGF-BB Mini ABTS EDK	900-M04	PEPROTECH
Human RANTES (CCL5) Standard ABTS EDK	900-K33	PEPROTECH
Human EGF Mini ABTS EDK	900-M05	PEPROTECH
Human TNF- $\alpha$ Standard ABTS EDK	900-K25	PEPROTECH
Human IFN- $\gamma$ Standard ABTS EDK	900-K27	PEPROTECH
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	DY208	R&D
Human IL-10 DuoSet ELISA	DY217B	R&D
Human IL-6 DuoSet ELISA	DY206	R&D
Human IL-15 DuoSet ELISA	DY247	R&D
Human Anti-IFN alpha ELISA Kit	BMS217	Invitrogen
Human IP-10 (CXCL10) Standard ABTS EDK	900-K39	PEPROTECH
Human MCP-1 (CCL2) Standard ABTS EDK	900-K31	PEPROTECH



Os protocolos foram realizados de acordo com as especificações dos fabricantes. Brevemente, as amostras e os kits foram descongelados até alcançarem a temperatura ambiente. Para sensibilização foi adicionado 100  $\mu$ L de anticorpo de captura por poço, nas devidas concentrações de uso e incubadas *overnight* em temperatura ambiente (única exceção foi o kit para IFN- $\alpha$  cuja placa já veio sensibilizada e soluções prontas para diluir em água destilada). No segundo dia, as placas foram lavadas de três a quatro vezes com PBS/*Tween* 20 0,05%, bloqueadas com PBS/BSA 1% por 1h em temperatura ambiente. Após nova etapa de lavagem as amostras e padrões da curva foram plaqueados (100  $\mu$ L/poço) e incubados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, após lavagem com PBS/*Tween* 20 0,05%, foram adicionados 100  $\mu$ L de anticorpo de detecção por poço, seguido por 2 h de incubação. Foi realizada nova etapa de lavagem e então foram adicionados 100  $\mu$ L de conjugado Avidin-HRP ou *Streptavidin-HRP*, seguido de incubação por 30 minutos. Após nova lavagem, foi adicionado 100  $\mu$ L de ABTS ou TMB (Reagente colorimétrico substrato para peroxidase – HRP) em cada poço, por 30 minutos. Por fim, para parar a reação colorimétrica dos testes que utilizam TMB, foram adicionados 50  $\mu$ L de *Stop Solution* (1M de HCl). A leitura foi imediata, por espectrofotometria, comprimento de onda 450nm com correção de 620nm para os testes que utilizam TMB e comprimento de onda 405nm com correção de 650nm para os testes que utilizam ABTS (SpectraMax Paradigm – Molecular Devices. Software: Soft MaxPro).

#### **4.9. Extração do RNA**

Os plasmas provenientes dos pacientes infectados e sobrenadantes das culturas de monócitos infectadas tiveram seu RNA total extraído através do kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, em eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 560  $\mu$ L de *Viral Lysis Buffer* (AVL) e 5,6  $\mu$ L de *Carrier RNA* (AVE) e então 140  $\mu$ L de amostras. A solução formada foi homogeneizada por 15 segundos em vórtex e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Após período de incubação, foram adicionados 560  $\mu$ L de etanol absoluto. Após nova homogeneização cuidadosa, a solução foi adicionada à coluna fornecida pelo kit e centrifugada a 12000 x g por 1 minuto. O RNA retido na coluna sofreu

duas lavagens consecutivas de AW1 e AW2 (500µL cada) e nova centrifugação foi feita a 12000 x g por 1 minuto e 3 minutos, respectivamente. Na última etapa, o RNA foi eluído com 60 uL de solução de eluição por 5 minutos e novamente centrifugado por 1 minuto. O RNA eluído extraído de cada amostra foi acondicionado a -80°C até o momento de utilização no ensaio de qRT-PCR.

#### **4.10. Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR para CHIKV) em tempo real**

Para detecção e quantificação do genoma viral foi empregada a técnica de RT-PCR em tempo real já bem estabelecida em nosso laboratório, preconizada pelo Ministério da Saúde e utilizada na literatura ([Santelli et al., 2017](#); [Souza et al. 2017](#)). O protocolo seguido foi estabelecido por Lanciotti e colaboradores, em 2007 ([Lanciotti et al., 2007](#)). Para quantificação do genoma viral foi utilizada uma curva padrão de título viral conhecido. O aparelho utilizado foi o Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA).

#### **4.11. Análises estatísticas**

Todos os dados obtidos foram tabulados em banco de dados no programa Microsoft EXCEL. As diferenças de médias e/ou medianas foram feitas utilizando-se teste não paramétrico Mann-Whitney, onde  $p < 0.05$  é considerado significativo estatisticamente. Também foram realizadas análises para comparação de três ou mais grupos pelo teste ANOVA ONEWAY - *Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação *Dunn's*. As análises de correlação foram feitas através do teste de Spearman. Para essas análises foi utilizado o Prism 8.0 (GraphPad Software, US).

##### **4.11.1. Citometria de Fluxo**

O *software* utilizado para interpretação e análise dos dados obtidos por citometria foi o FlowJo (TreeStar Inc.).

#### **4.11.2. Espectrofotometria**

A aquisição dos dados se deu por intermédio do *software* Soft MaxPro (Molecular Divices).

## 5. Resultados

### 5.1. Amostragem *ex vivo*

Durante as epidemias ocorridas em 2016 e 2018, 350 amostras provenientes de casos suspeitos de infecção por arbovírus foram coletados durante trabalho de campo realizado no Hospital Rio Laranjeiras, Rio de Janeiro – RJ e no Hospital dos Plantadores de Cana, em Campos dos Goytacazes – RJ. Todas as amostras foram submetidas a diagnóstico diferencial por ensaios sorológicos e moleculares para a confirmação ou exclusão de infecção pelo CHIKV. Os dados epidemiológicos, principais manifestações clínicas e características encontradas na coorte de pacientes da epidemia ocorrida em 2016 já foram publicados ([de Souza et al., 2018](#)).

A partir da coleta e confirmação dos diagnósticos, foram selecionados pacientes provenientes de ambas as epidemias para o presente estudo. Oriundos da epidemia de 2016, foram selecionadas 60 pacientes e, oriundos da epidemia de 2018 foram selecionados 33 pacientes. Esses pacientes foram agrupados em quatro classificações diferentes, são elas:

- (1) pacientes mono-infectados com CHIKV durante a fase aguda (n= 67);
- (2) pacientes mono-infectados com CHIKV durante a fase subaguda (n = 8);
- (3) pacientes que tiveram amostras coletadas durante a fase aguda, com diagnóstico confirmado para CHIKV, e que apresentaram persistência dos sintomas por mais de 90 dias, caracterizando a fase crônica (n = 14);
- (4) pacientes co-infectados com CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV (n=17).

As classificações foram realizadas de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde, 2017 ([Santelli et al., 2017](#)).

Os dados demográficos mostram que a faixa etária mais atingida foi, predominantemente, pessoas com mais de 40 anos. Menos da metade (43%, 40/92) do total de pacientes apresentou comorbidades prévias e nenhum deles relatou sofrer de artrite ou artrose antes do estabelecimento da infecção pelo chikungunya. Vale destacar que a frequência de pacientes crônicos que

apresentaram comorbidades prévias foi de 57% (8/14), um pouco maior do que a frequência vista no total de pacientes (Tabela 2).

Em acordo com a literatura, febre e artralgia foram os sintomas mais frequentemente encontrados, estando presente em cerca de 90% dos casos, seguidos de cefaleia (cerca de 75%), mialgia (73%) e lombalgia (63.6%), respectivamente (Tabela 2) (de Brito *et al.*, 2016). É interessante destacar que anorexia, prostração e náuseas também apareceram em alta frequência entre os pacientes. Não foram observados casos atípicos ou graves neste grupo de estudo. Na tabela a seguir é possível observar um resumo dos achados clínicos e demográficos dos pacientes usados nesse estudo.

**Tabela 2. Dados demográficos e clínicos dos pacientes infectados com CHIKV e co-infectados com CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV.**

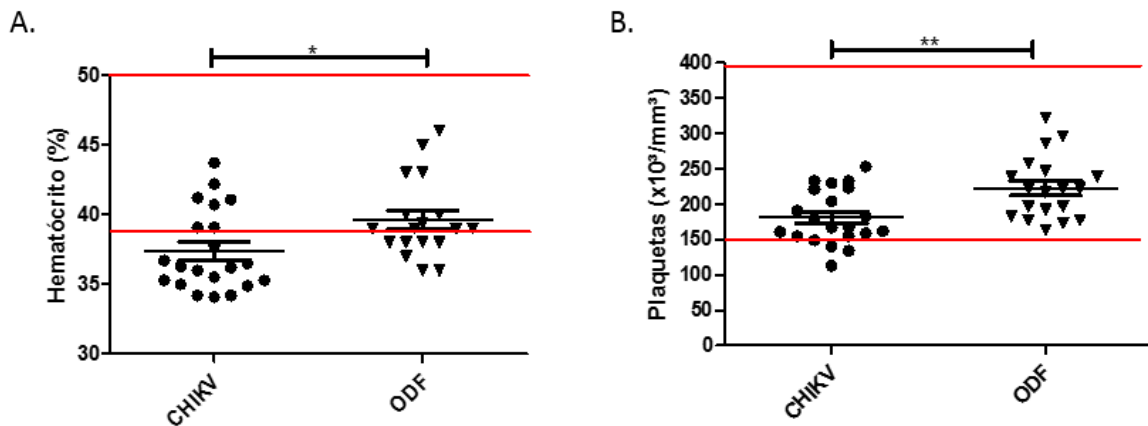
Características	CHIKV			CO-INFECÇÃO (n = 17)
	AGUDOS (n = 67)	SUBAGUDOS (n = 8)	CRÔNICOS (n = 14)	
Idade	43 ± 15	55 ± 13	54.8 ± 14.2	44.5 ± 17.7
sexo (F:M)	37:30	4:4	7:7	12:5
Dias de doença	5 ± 4	36 ± 15	107 ± 8	5 ± 5
Hospitalização	1/67 (1%)	0/8, (0%)	0/14, (0%)	0/17, (0%)
<b>Comorbidades prévias (total):</b>	32/67, (48%)	4/8, (50%)	8/14, (57%)	4/17, (24%)
Artrite/Artrose	0/68, (0%)	0/8, (0%)	0/14, (0%)	0/17, (0%)
Hipertensão arterial	16/67, (24%)	3/8, (38%)	4/14, (29%)	4/17, (24%)
Diabetes	4/67, (6)	2/8, (25%)	1/14, (7%)	1/17, (6%)
Outras comorbidades	15/67, (22%)	2/8, (25%)	5/14, (35%)	3/17, (18%)
<b>Manifestações clínicas:</b>				
Febre	63/67, (94%)	7/8, (88%)	14/14, (100%)	17/17, (100%)
Cefaléia	47/67, (70%)	7/8, (88%)	11/14, (79%)	14/17, (82%)
Hiperemia conjuntival	23/67, (34%)	7/8, (88%)	3/14, (21%)	6/17, (35%)
Dor retro-orbital	29/67, (43%)	3/8, (38%)	5/14, (35%)	5/17, (29%)
Dor de garganta	6/67, (9%)	0/8, (0%)	1/14, (7%)	4/17, (24%)
Mialgia	58/67, (87%)	4/8, (50%)	11/14, (79%)	15/17, (88%)
Lombalgia	43/67, (64%)	4/8, (50%)	10/14, (71%)	13/17, (76%)
Artralgia	65/67, (97%)	8/8, (100%)	14/14, (100%)	17/17, (100%)
Anorexia	40/67, (60%)	3/8, (38%)	10/14, (71%)	15/17, (88%)
Prostração	50/67, (75%)	5/8, (63%)	10/14, (71%)	14/17, (82%)
Tontura/Vertigem	17/67, (25%)	2/8, (25%)	4/14, (29%)	10/17, (59%)
Náusea	31/67, (46%)	4/8, (50%)	7/14, (50%)	6/17, (35%)
Vômito	9/67, (13%)	5/8, (63%)	2/14, (14%)	4/17, (24%)
Adenomegalia	9/67, (13%)	0/8, (0%)	2/14, (14%)	4/17, (24%)
Prurido	28/67, (42%)	7/8, (88%)	4/14, (29%)	9/17, (53%)
Parestesia	2/67, (3%)	1/8, (13%)	0/14, (0%)	1/17, (5.9%)
<b>Exantema:</b>				
Maculopapular	12/67, (18%)	0/8, (0%)	3/14, (21%)	3/17, (18%)
Macular	2/67, (3%)	0/8, (0%)	0/14, (0%)	0/17, (0%)
Eritrodermia	8/67	0/8, (0%)	3/14, (21%)	4/17, (24%)
NI	12/67, (18%)	5/8, (63%)	1/14, (7%)	1/17, (5.9%)
Edema periarticular	21/67, (31%)	1/8, (13%)	5/14, (35%)	2/17, (12%)

População de estudo com 106 amostras, das quais 89 de pacientes mono infectados com CHIKV, nas três classificações – agudos (67), subagudos (8) e crônicos (14) – também foram analisados 17 casos de co-infecções (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV). Dados tabulados no EXCEL, expressos em Média ± Desvio Padrão e n/n total do grupos (%). Dias de doença representam o dia no início dos sintomas até o momento em que o paciente procurou a unidade de saúde e foi entrevistado. Outras comorbidades incluem bronquite, doenças cardíacas, tabagismo, asma, rinite, artrite reumatoide, sinusite, DPOC, gastrite, hepatite medicamentosa, faringite, hipofunção renal, alergia. NI = não informado.

### **5.1.1. Parâmetros hematológicos dos pacientes infectados pelo CHIKV**

Para fins de comparação do perfil dos resultados hematológicos encontrados em pacientes positivos para CHIKV, comparamos os resultados com o perfil encontrado em pacientes apresentando outras doenças febris (ODF) e negativos para os três vírus (DENV, ZIKV e CHIKV). Nas próprias unidades de saúde, foi pedido os exames de hemograma e leucograma de alguns pacientes, de ambos os sexos, escolhidos entre aqueles que apresentavam febre e artralgia no momento da consulta. Os resultados dos parâmetros avaliados foram comparados com seus respectivos valores de referência e com pacientes apresentando ODF, afim de estabelecer características próprias da infecção pelo CHIKV. Os parâmetros avaliados foram o hematócrito, plaquetas, leucócitos totais, linfócitos e monócitos.

Sabe-se que alterações de hematócrito podem indicar, entre outras coisas, anemia e extravasamento plasmático. Para essas análises foram utilizadas 21 amostras de pacientes positivos para infecção por CHIKV e 19 amostras de pacientes ODF. É possível observar que em 14 (66%) amostras positivas para CHIKV, a porcentagem do hematócrito está abaixo dos valores de referência e significativamente menor do que o perfil encontrado nas amostras de pacientes com outras doenças febris (Figura 8.A). A contagem de plaquetas nos permite inferir como está o *status* do sistema de coagulação sanguíneo. Nos pacientes infectados com chikungunya essa medida também se mostrou menor quando comparados com os pacientes ODF (Figura 8.B).

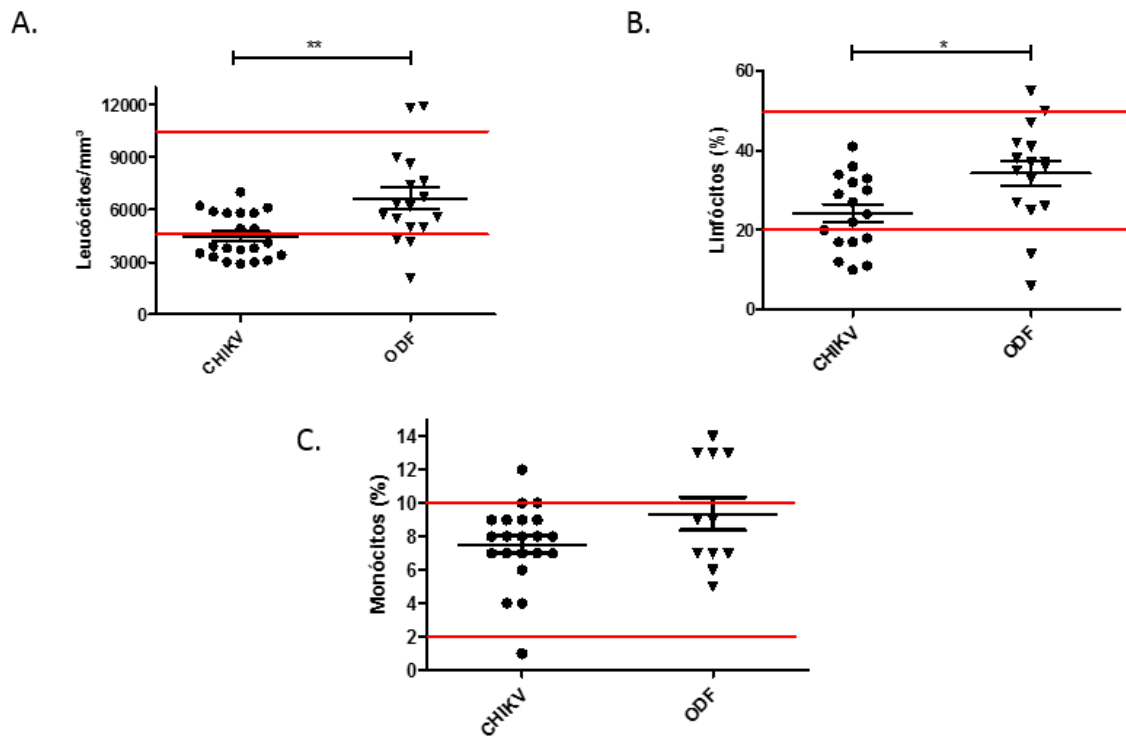


**Figura 8. Análise de hematócrito e plaquetas em pacientes infectados com CHIKV em comparação com pacientes com ODF.** Para determinação dos parâmetros hematológicos analisados foram avaliados pacientes infectados com chikungunya (n = 21) em relação a pacientes com ODF (n = 19). Os valores de referência estão indicados pelas linhas em vermelho. Em (A) foi avaliado o percentual de hematócrito em pacientes CHIKV+ e ODF e em (B) foi avaliada a contagem de plaquetas nos dois grupos. Em ambos, os pacientes infectados com CHIKV apresentam valores significativamente diminuídos em relação aos ODF. Barras horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste t – Mann Whitney onde \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$ .

Em relação aos leucócitos, o exame permite avaliar o aumento ou diminuição de populações responsáveis pela resposta a infecções virais. Nessa análise foi possível perceber que pacientes CHIKV+ podem estar sujeitos a leucopenia. Os resultados mostram a contagem de leucócitos abaixo do limite inferior do valor de referência, o que aparece em 12 (57%) dos pacientes infectados com o vírus. Ao comparar essa contagem com o encontrado nos indivíduos classificados como ODF também há diferença significativa entre os dois grupos (Figura 9.A).

Dentre os leucócitos avaliados, os linfócitos – células responsáveis pelo estabelecimento da imunidade específica - apareceram diminuídos quando em comparação com pacientes ODF e se apresentam abaixo do limite inferior em 6 (28.5%) dos pacientes (Figura 9.B). Enquanto os monócitos não apresentaram diferença entre os dois grupos avaliados e nem se apresentou fora dos valores de referência (Figura 9.C).





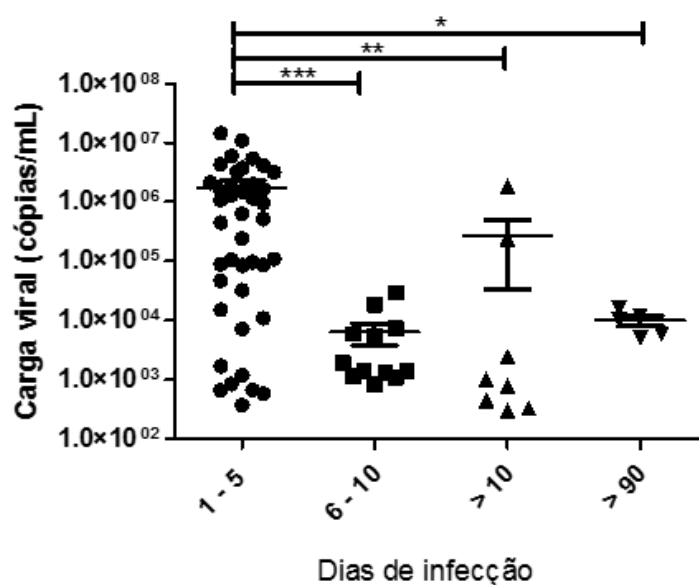
**Figura 9. Análise do leucograma e principais leucóцитos circulantes associados a infecções virais.** Para análise do leucograma durante a infecção pelo CHIKV, foram selecionados pacientes infectados com o vírus (n = 21) e pacientes com ODF (n = 19). As comparações entre os dois grupos demonstraram que (A) pacientes CHIKV+ possuem menor contagem de leucóцитos em relação aos ODF, bem como tendência a apresentar quadros de leucopenia. Os linfóцитos (B) também se mostraram diminuídos em relação aos pacientes ODF. Não foi vista nem diminuição na frequência nem extrapolação desta aos limites de referência nos monóцитos (C). Linhas horizontais nos grupos representam Média e verticais Desvio Padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo Teste t – Mann Whitney onde \*p<0,05 e \*\*p<0,005.

### 5.1.2. Carga viral e dias de infecção

As análises para a quantificação da carga viral foram realizadas através de qRT-PCR nos pacientes infectados com CHIKV. Para além dos fins de diagnóstico, a análise permite que seja avaliada a evolução da infecção e o *clearence* viral. Foi avaliada a carga viral entre o início do aparecimento dos sintomas e os primeiros cinco dias subsequentes; o fim da primeira semana até o décimo dia de infecção; os pacientes com mais de dez dias de doença e os pacientes que cronificaram. Desse modo, as amostras foram agrupadas de acordo com os dias de infecção em quatro diferentes grupos: 1 – 5 dias (n = 41), 6 – 10 dias (n = 12), >10 dias (n = 8) e pacientes fase crônica da infecção apresentando mais de 90 dias de doença (n = 5) (Figura 10).

Analizamos a carga viral (em cópias de partículas virais/mL) de acordo com dias de infecção. Foi possível perceber que mesmo após três meses de doença, alguns pacientes (5/14, nessa amostragem) persistem com carga viral

detectável na circulação sistêmica. Ademais, há maior carga viral em pacientes nos cinco primeiros dias de doença quando comparados aos pacientes com mais tempo de infecção. Quando comparada a carga viral entre pacientes na fase aguda e crônica, a diferença entre as duas foi a menor detectada quando em comparação com os outros grupos. Também foi visto que a partir do sexto dia, embora detectável, não há diferença estatística na quantificação da carga viral entre os grupos com mais tempo de infecção. Ao realizar o teste de correlação, vimos correlação negativa entre a carga viral e os dias de infecção, ou seja, quanto maior a carga viral menor o tempo de infecção ( $R = -0,6$ ,  $p = 0,0001$ ).



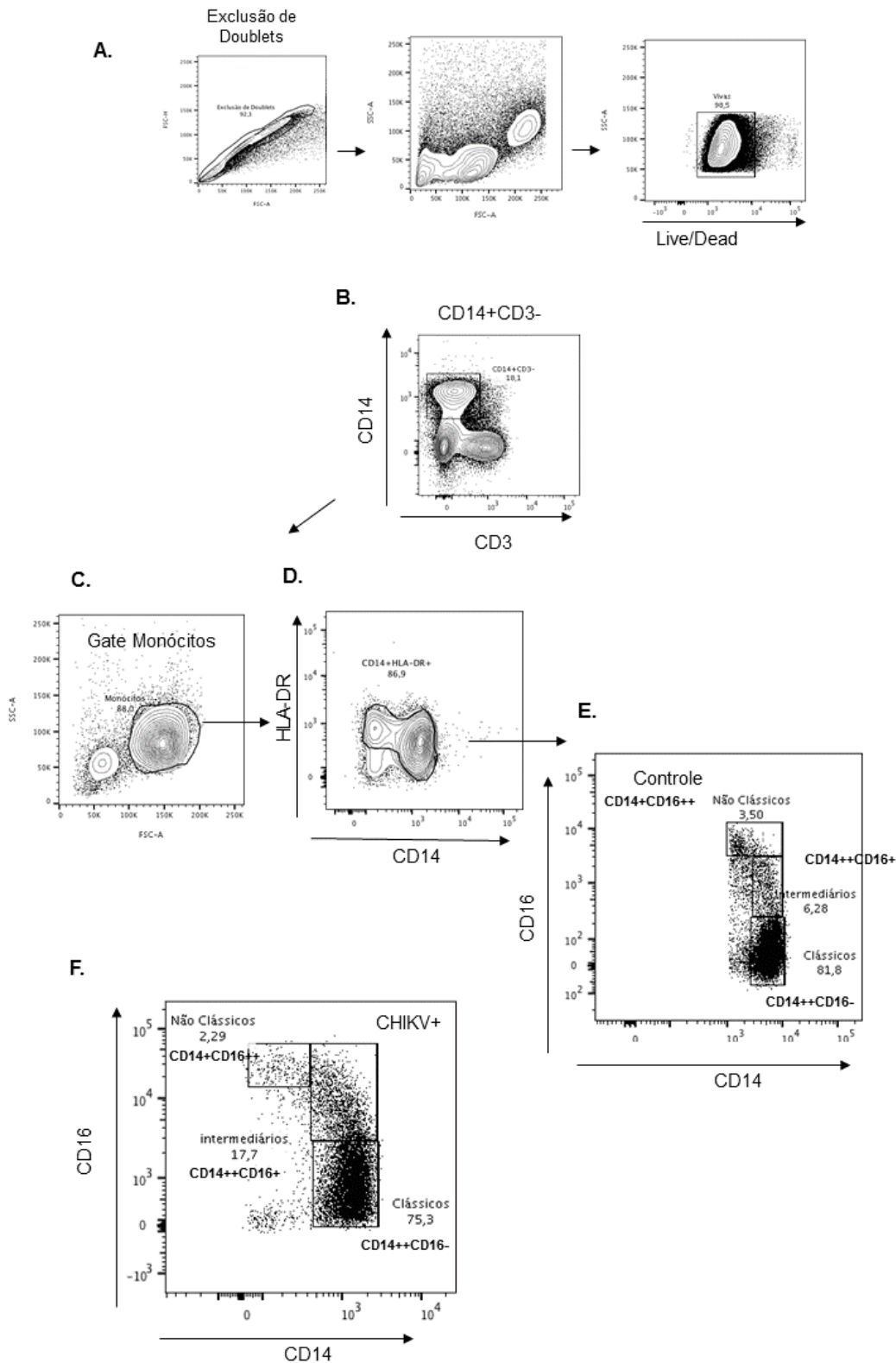
**Figura 10. Análise da carga viral por qRT-PCR de acordo com os dias de infecção.** O qRT-PCR é um ensaio que permite a quantificação da carga viral a partir de uma curva padrão de concentrações já conhecidas. Esse ensaio foi utilizado para investigação da quantidade de vírus circulante durante o curso da doença. Foi visto que nos primeiros 5 dias ( $n = 41$ ) é onde há maior número de cópias/mL de vírus em relação aos outros dias de infecção (6 – 10 dias  $n = 12$ ; >10 dias  $n = 8$  e >90 dias  $n = 5$ ). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's  $p < 0,001$ . Teste de correlação Spearman  $R = -0,6$  e  $p = 0,0001$ . Para comparação entre dois grupos foi realizado o Teste t – Mann Whitney onde \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

### 5.1.3. Caracterização das subpopulações de monócitos

Após a classificação das amostras nos diferentes grupos estudados e análise dos parâmetros hematológicos dos pacientes, foram selecionadas amostras para a realização do ensaio de citometria de fluxo. Utilizamos PBMCs de controles (CTRL) de indivíduos saudáveis ( $n = 18$ ), pacientes na fase aguda ( $n =$

22), crônica (n = 10) e apresentando co-infecção (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) (n = 6). As amostras foram descongeladas e marcadas com um mix de anticorpos monoclonais para caracterização dos monócitos.

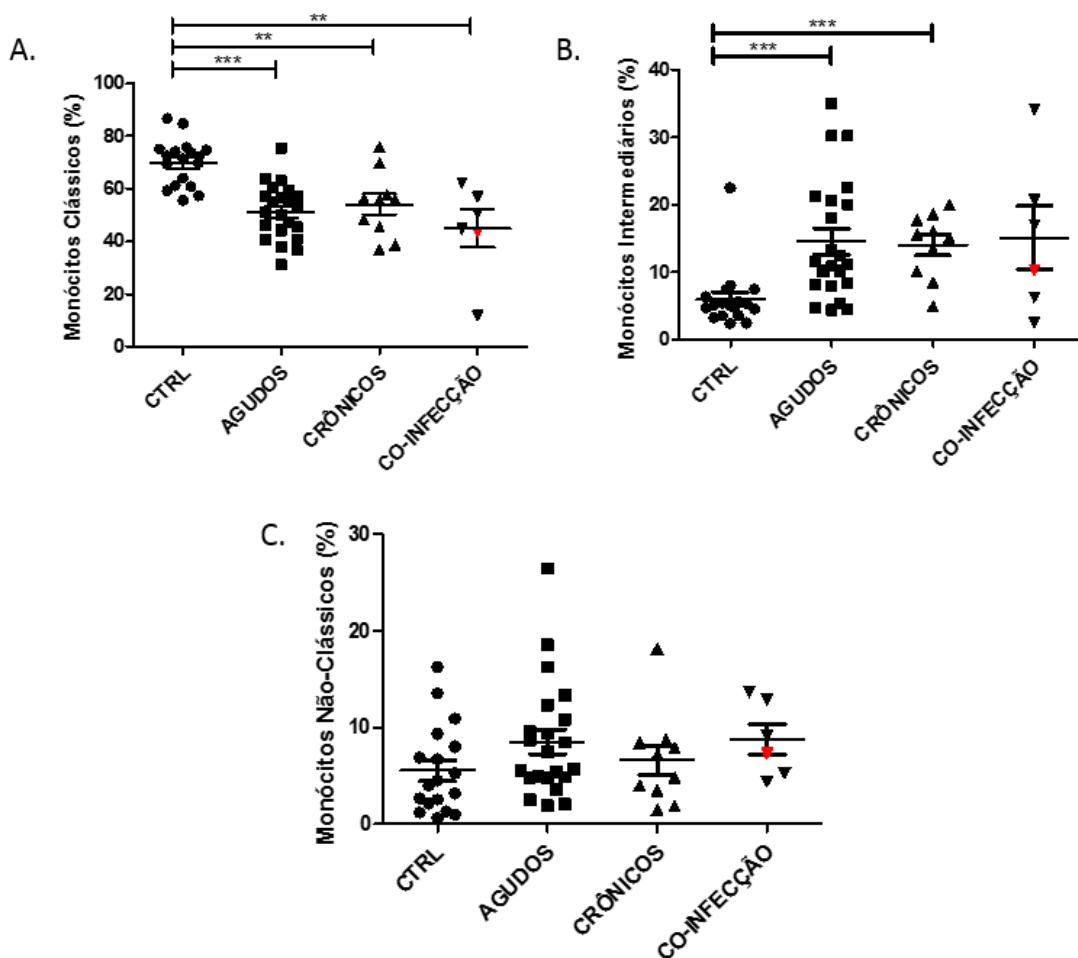
A estratégia de *gate* utilizada para análise da subpopulação de monócitos está descrita na Figura 11. Primeiramente foi realizada a exclusão de *doublets*, para que eventuais grumos de células mortas não prejudicassem a interpretação dos resultados. Em seguida foi feita a seleção das células vivas através do Live/Dead (Figura 11.A). Com a seleção das células vivas, feita a exclusão de células CD3 positivas para eliminar a presença de linfócitos e seleção de células CD14 positivas (Figura 11.B). Novamente a seleção foi analisada por tamanho e granulosidade e, em seguida foi feito um *gate* morfológico na região dos monócitos (Figura 11.C), de onde partimos para a seleção da população HLA-DR positiva CD14 positiva (Figura 11.D). Por fim, foi feita a classificação das diferentes populações em monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), monócitos intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e monócitos não-clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) em controles saudáveis (Figura 11.E) e pacientes infectados com CHIKV (Figura 11.F). Para isso foram utilizados os anticorpos monoclonais anti - CD14 V500, anti - CD16 PECy7, anti - HLA-DR PerCP (R&D) e anti - CD3 AF700 (BD) e o kit de Live & Dead.



**Figura 11. Estratégia de gate das diferentes subpopulações de monócitos.** Para análise das diferentes subpopulações de monócitos em indivíduos saudáveis (CTRL) e pacientes foram realizadas as imunomarcações multiparamétricas. Para começar a análise foi feita a exclusão de doublets (FSC-A vs FSC-H) e seleção das células vivas (A). Logo após foram selecionadas as células CD14+CD3- (B). As células foram avaliadas quanto seu tamanho e granulosidade (FSC-A vs SSC-A) novamente onde foi selecionada a população de monócitos (C). Então foi verificada a expressão de células HLA-DR+ (D) e dentro dessa população, verificar a expressão dos marcadores CD14 e CD16 (E e F). Figura representativa de um controle (E) e paciente infectado com o CHIKV durante a fase aguda da doença (F).

### **5.1.3.1. Análise da frequência das subpopulações de monócitos circulantes em pacientes infectados com CHIKV, co-infectados com CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV e controles**

Utilizando a estratégia de análise descrita na figura 11, observamos as três diferentes subpopulações de monócitos: clássicos, intermediários e não-clássicos. Podemos perceber que há diminuição significativa nos valores percentuais de monócitos clássicos nas amostras de pacientes em comparação aos controles (Figura 12.A). Em contrapartida, é possível observar um aumento da população de monócitos intermediários nesses mesmos pacientes (Figura 12.B). Já os monócitos não-clássicos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados (Figura 12.C).



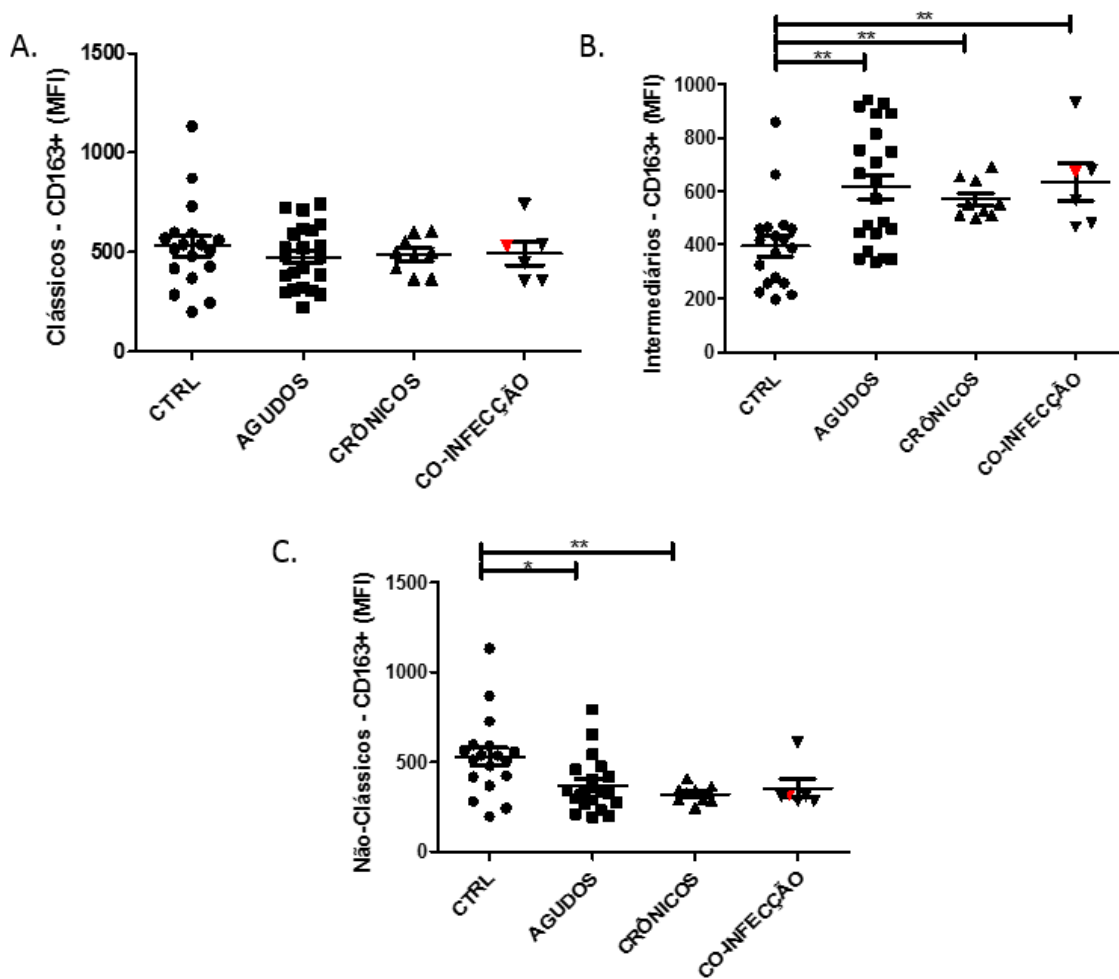
**Figura 12. Análise da frequência das subpopulações de monócitos nas diferentes fases da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** As subpopulações de monócitos foram analisadas a partir de PBMCs de controles e pacientes infectados com CHIKV nas fases agudas e crônicas e pacientes apresentando co-infecção (triângulo vermelho CHIKV-DENV). Para isso foi utilizada a imunomarcagem para citometria de fluxo e estratégia de *gate* indicada na Fig. 11. As frequências de monócitos foram analisadas entre os grupos de pacientes e em relação aos controles. (A) Frequência de monócitos clássicos. (B) Frequência de monócitos intermediários (C) Frequência de monócitos não-clássicos. Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados para cada subpopulação foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's: Clássicos  $p < 0,0001$  e intermediários  $p = 0,0005$ . Para comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $**p < 0,005$  e  $***p < 0,001$ .

### 5.1.3.2. Perfil de ativação das diferentes subpopulações de monócitos circulantes em pacientes infectados com CHIKV, co-infectados com CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV e controles

A imunofenotipagem e citometria de fluxo das subpopulações de monócitos nos permitiu também verificar o padrão de expressão de moléculas relacionadas a atividade imunológica dessas células. Para isso, foram utilizados anticorpos monoclonais intracelulares e de superfície.

A molécula CD163, encontrada somente na linhagem monócito-macrófago, é reconhecida como um importante receptor com papel durante o estabelecimento de processos inflamatórios. Sabe-se que citocinas e fatores solúveis, como TNF- $\alpha$  e IL-6, podem alterar a expressão dessa molécula que está envolvida na resposta anti-inflamatória (Etzerodt & Moestrup, 2013). Neste sentido, foi avaliada a expressão dessa molécula nas diferentes subpopulações de monócitos (Figura 13) em médias de intensidade de fluorescência (MFI).

Conforme podemos observar na Figura 13, não encontramos diferença significativa na expressão da molécula CD163 analisada pela MFI nos diferentes grupos de monócitos clássicos analisados (Figura 13.A). No entanto, monócitos intermediários dos pacientes infectados pelo CHIKV (agudos, crônicos e co-infectados) exibiram maiores valores de MFI quando comparados aos controles (Figura 13.B). Por fim, monócitos não clássicos exibiram baixa expressão de CD163 nos pacientes monoinfectados com CHIKV nas duas fases avaliadas (aguda e crônica) (Figura 13.C).

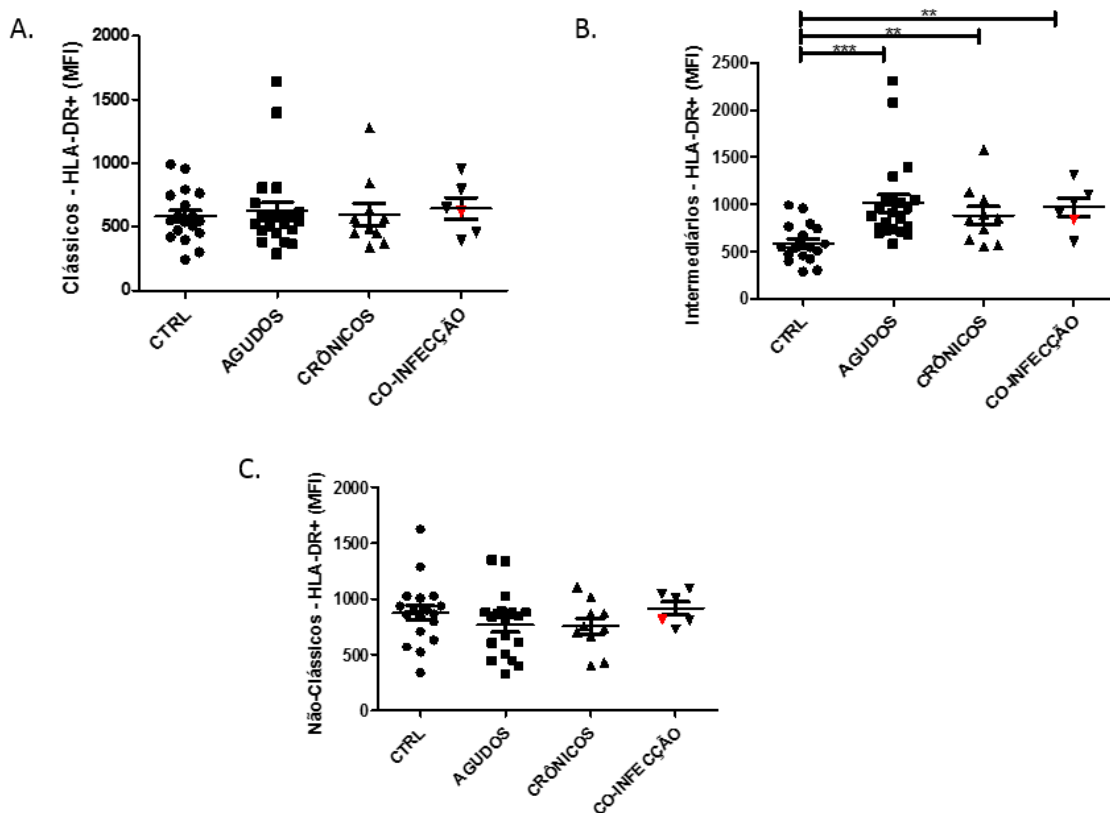


**Figura 13. Análise da expressão de CD163 nas diferentes subpopulações de monócitos durante fases (aguda e crônica) da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infetados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A expressão de CD163 nas subpopulações de monócitos foi analisada a partir de PBMCs de controles e pacientes infectados com CHIKV nas fases agudas e crônicas e pacientes apresentando co-infecção (triângulo vermelho CHIKV-DENV). Para isso foi utilizada a imunomarcagem para citometria de fluxo e estratégia de *gate* já explicitada. (A) de CD163 (MFI) nos monócitos clássicos dos diferentes grupos analisados comparados com controles (CTRL) (B) Expressão de CD163 (MFI) nos monócitos intermediários em pacientes agudos, crônicos e co-infetados comparados ao controle (CTRL). (C) Expressão de CD163 (MFI) nos monócitos não-clássicos de pacientes mono infectados com CHIKV comparados com controles (CTRL). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's: intermediários  $p=0.001$  e não-clássicos  $p<0.05$ . Para comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $*p<0,05$  e  $**p<0,005$ .

Outra molécula que indica ativação de células de linhagem fagocítica são as moléculas de MHC de classe II, dentre elas o HLA-DR. O HLA-DR é umas das moléculas responsáveis pela apresentação antigênica. Nesse sentido, avaliamos a expressão desta nos diferentes grupos de estudo (Figura 14). Nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de HLA-DR (MFI) nos monócitos clássicos (Figura 14.A) ou monócitos não-clássicos (Figura 14.C). Interessantemente, podemos observar que os monócitos intermediários apresentaram aumento na expressão



de HLA-DR em todos os grupos de pacientes analisados quando comparados aos controles (Figura 14.B).

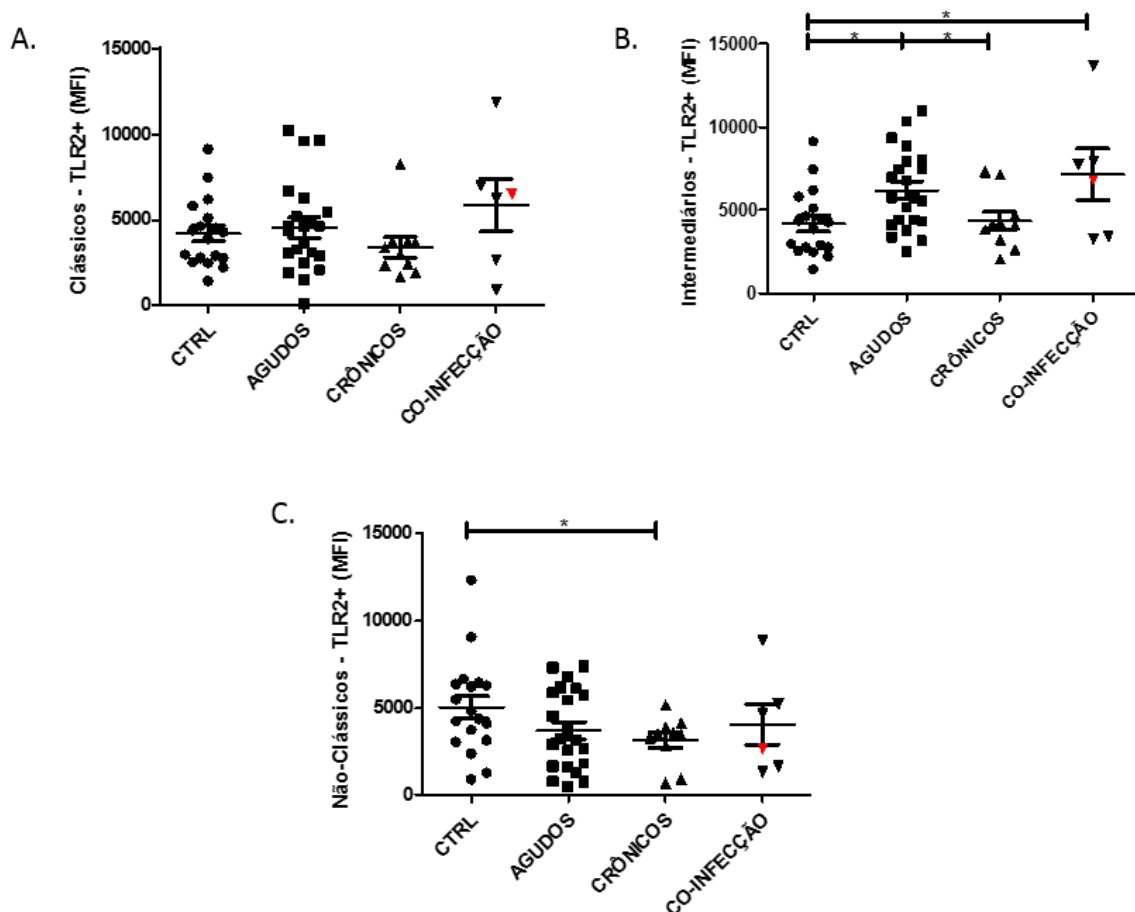


**Figura 14. Análise da expressão de HLA-DR nas diferentes subpopulações de monócitos durante fases (aguda e crônica) da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A expressão de HLA-DR nas subpopulações de monócitos foi analisada a partir de PBMCs de controles e pacientes infectados com CHIKV nas fases agudas e crônicas e pacientes apresentando co-infecção (triângulo vermelho CHIKV-DENV). Para isso foi utilizada a imunomarcagem para citometria de fluxo e estratégia de *gate* já explicitada. (A) Expressão de HLA-DR em monócitos clássicos (MFI) de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos, crônicos e co-infectados) em relação aos controles (CTRL). (B) Expressão de HLA-DR em monócitos intermediários (MFI) de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos, crônicos e co-infectados) em relação aos controles (CTRL). (C) Expressão de HLA-DR em monócitos não-clássicos (MFI) de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos, crônicos e co-infectados) em relação aos controles (CTRL). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos foi ONEWAY ANOVA – *Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn’s: intermediários  $p=0.0002$ . Para comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $**p<0,005$  e  $***p<0,0001$ .

Já é bem conhecido o papel de TLRs na ativação de células da imunidade inata durante as infecções virais. Dentre eles, estão os receptores que reconhecem as proteínas não-estruturais do vírus (Lester & Li, 2014). Foi realizada a marcação do TLR2 nas células de controles saudáveis e nos diferentes grupos de pacientes (Figura 15).

Não foram observadas alterações estaticamente significativas quanto à expressão de TLR2 nos monócitos clássicos dos grupos analisados. No entanto,

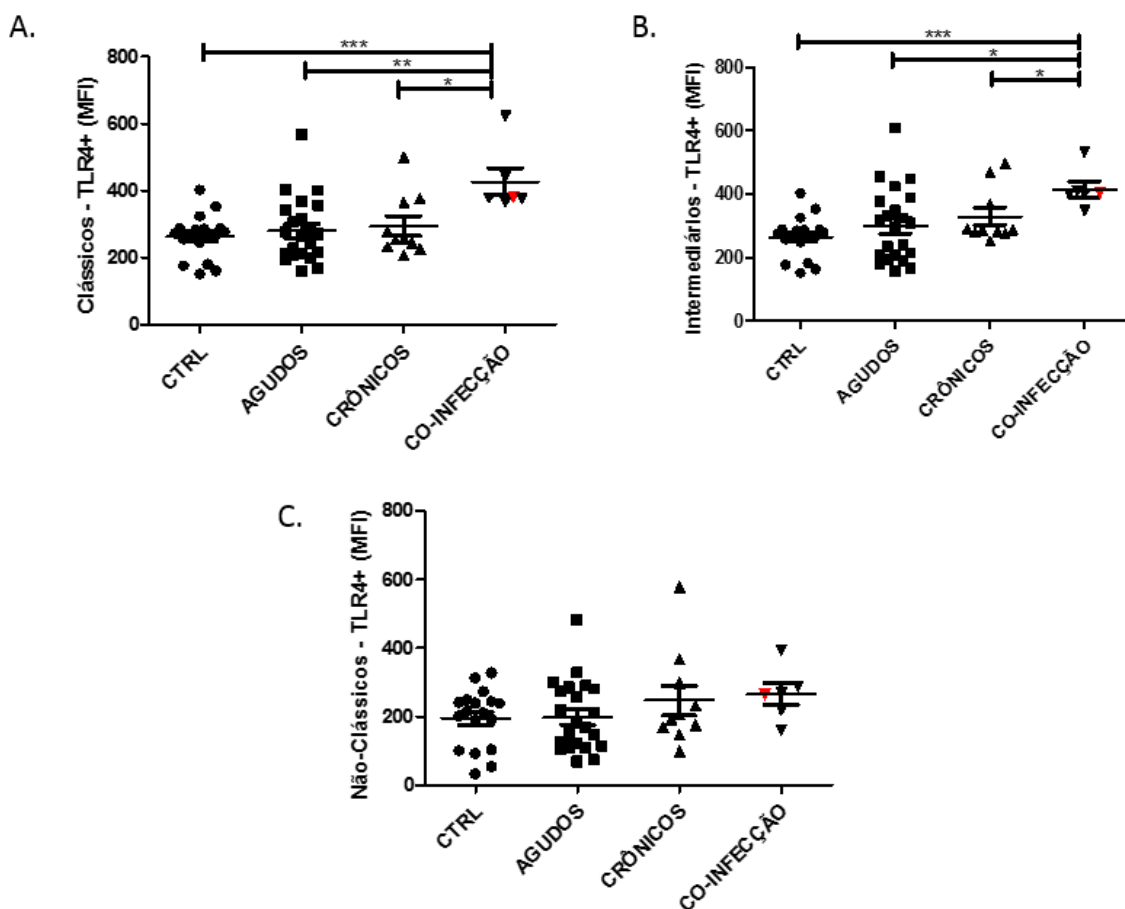
os nossos resultados demonstram que a subpopulação de monócitos intermediários apresentou aumento na expressão de TLR2 em pacientes infectados pelo CHIKV durante a fase aguda da infecção quando comparados com os indivíduos saudáveis e com os pacientes na fase crônica da infecção. Interessantemente, monócitos intermediários de pacientes co-infectados CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV também exibiram maiores médias de intensidade de fluorescência (MFI) de TLR2 quando comparados com controles (Figura 15.B). Por fim, podemos observar que a subpopulação de monócitos não clássicos apresentou baixa expressão de TLR2 nos pacientes na fase crônica da infecção comparados com os controles. (Figura 15.C).



**Figura 15. Análise da expressão de TLR2 nas diferentes subpopulações de monócitos durante fases (aguda e crônica) da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A análise da expressão de TLR2 nas subpopulações de monócitos foi realizada em controles e pacientes infectados com CHIKV nas fases aguda, crônica e pacientes apresentando co-infecção (triângulo vermelho CHIKV-DENV); através da citometria de fluxo. (A) Expressão de TLR2 em monócitos clássicos (MFI) de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos, crônicos e co-infectados em comparação com controles (CTRL). (B) Expressão de TLR2 em monócitos intermediários (MFI) de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos, crônicos e co-infectados) comparados aos controles (CTRL). (C) Expressão de TLR2 em monócitos não – clássicos (MFI) de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos, crônicos e co-infectados) comparados aos controles (CTRL). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's: intermediários  $p=0,0195$ . Para comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste *t – Mann Whitney* onde  $**p<0,05$ .

Outro TLR presente na superfície de monócitos que reconhece proteínas virais não-estruturais solúveis no plasma é o TLR4. Foi realizada a marcação do TLR4 nas células de controles saudáveis e nos diferentes grupos de pacientes (Figura 16). A análise dos resultados demonstrou elevada expressão de TLR4 nas subpopulações de monócitos clássicos (Figura 16.A) e de monócitos intermediários (Figura 16.B) em pacientes co-infectados CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV em relação aos controles e pacientes mono-infectados pelo CHIKV nas fases aguda e crônica. Não foram encontradas diferenças estatisticamente

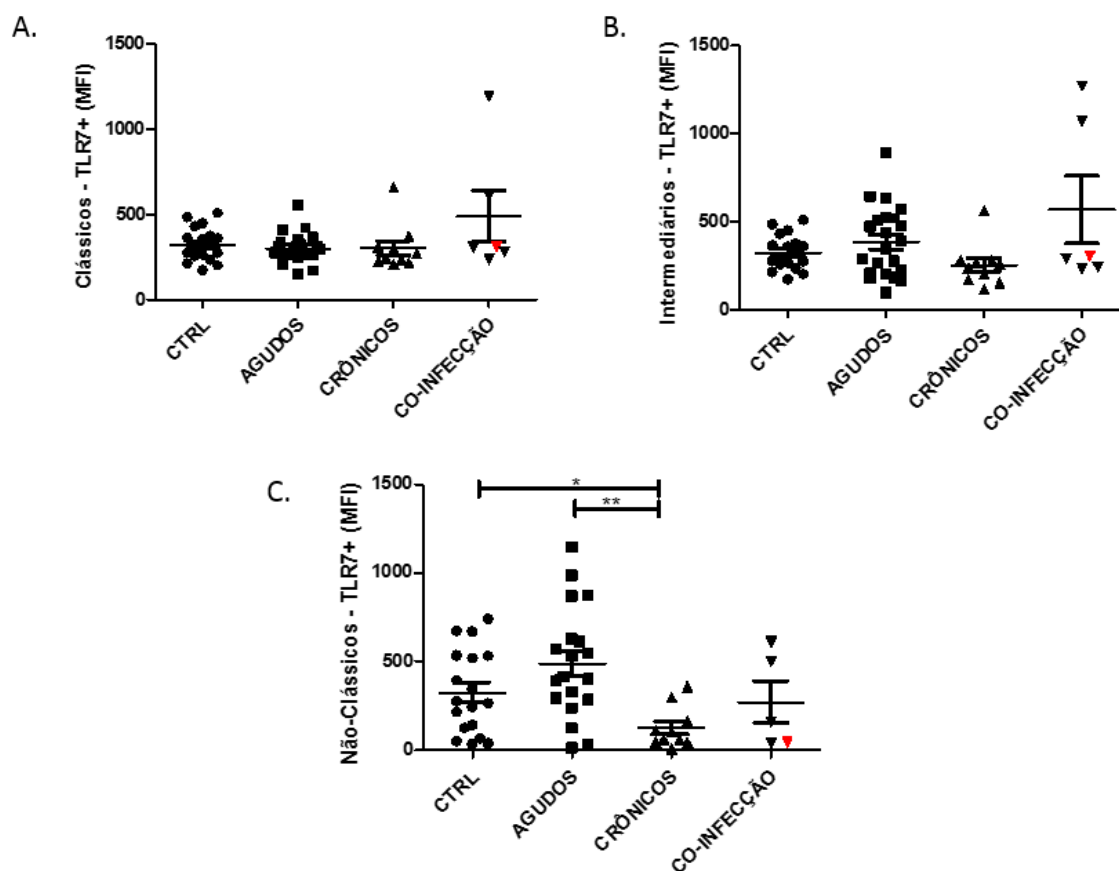
significativas quanto a expressão de TLR4 nos monócitos não clássicos nos diferentes grupos de estudo.



**Figura 16. Análise da expressão de TLR4 nas diferentes subpopulações de monócitos durante as fases (aguda e crônica) da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A técnica de citometria de fluxo permite a marcação de alvos específicos presentes nas células humanas. Foi analisada a expressão de TLR4 (MFI) nas três diferentes subpopulações de monócitos em células de controles saudáveis (CTRL), pacientes mono infectados com CHIKV (fase aguda e crônica) e pacientes sofrendo com co-infecção [CHIKV – ZIKV ou CHIKV – DENV (triângulo vermelho)]. Expressão de TLR4 nas subpopulações de monócitos clássicos (A), Intermediários (B) e monócitos não – clássicos (C). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's: Clássicos  $p = 0,0122$ ; Intermediários  $p=0.0085$ . Para comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $*p<0,05$ ;  $**p<0,005$  e  $***p<0,001$ .

Por fim, o TLR7 é um dos responsáveis pelo reconhecimento de genomas virais em células infectadas (Lester & Li, 2014). Desta forma, avaliamos a expressão desse receptor nas células dos diferentes grupos de estudo (Figura 17). Não foram encontradas diferenças estaticamente significativas na expressão de TLR7 nos monócitos clássicos e intermediários nos diferentes grupos analisados. No entanto, verificamos menor expressão de TLR7 nos monócitos não-clássicos dos-pacientes durante a fase crônica comparados com

os pacientes na fase aguda da infecção e em relação aos controles (Figura 17.C).



**Figura 17. Análise da expressão de TLR7 nas diferentes subpopulações de monócitos durante as fases (aguda e crônica) da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** Foi analisada a expressão de TLR7 (MFI), através da citometria de fluxo, nas três diferentes subpopulações de monócitos em células de controles saudáveis (CTRL), pacientes mono-infectados com CHIKV (fase aguda e crônica) e pacientes sofrendo com co-infecção [CHIKV – ZIKV ou CHIKV – DENV (triângulo vermelho)]. Expressão de TLR7 nos monócitos clássicos (A), intermediários (B) e monócitos não – clássicos (C). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's: Não - Clássicos  $p = 0,0149$ . Para comparação entre dois grupos foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,005$ .

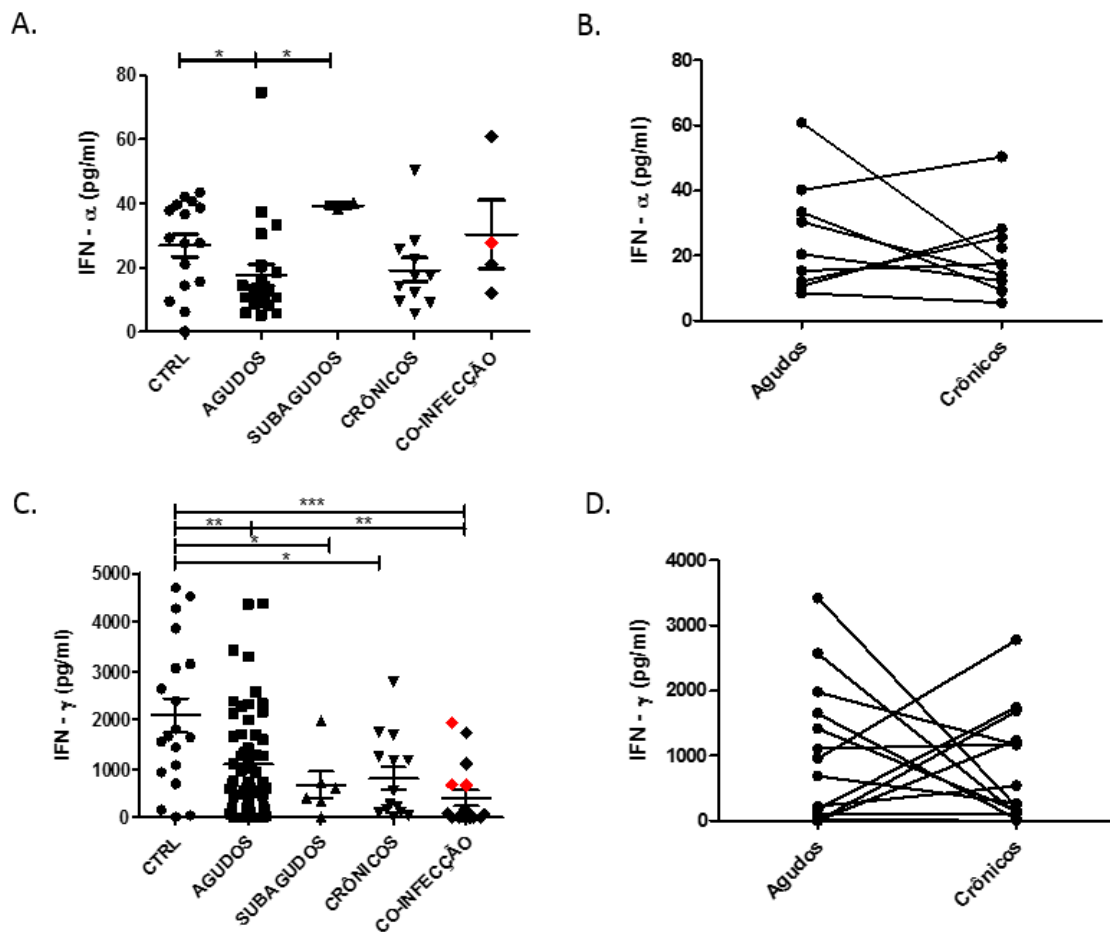
#### 5.1.4. Mediadores inflamatórios: citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

##### 5.1.4.1. Interferons do tipo I e do tipo II

Os Interferons (Figura 18), citocinas com papéis antivirais diretos e de recrutamento de células efetoras, mostraram diferenças estaticamente significativas entre os grupos analisados. Nossos resultados demonstram menores dosagens de IFN- $\alpha$  no plasma de pacientes durante fase aguda da

doença. Não observamos diferenças estatisticamente significativas quando foram analisadas amostras pareadas (agudos vs. crônicos) (Figura 18.B).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina relacionada a indução da resposta adaptativa e envolvida com maturação e funcionalidade de células NK (Malarkannan, 2018). Nossos resultados demonstraram maior heterogeneidade do IFN- $\gamma$  nos diferentes grupos analisados. Todos os grupos de pacientes infectados mostraram baixas dosagens plasmáticas de IFN- $\gamma$  em relação aos controles, destacando-se o grupo de pacientes co-infectados. Pacientes co-infectados pelo CHIKV-DENV ou pelo CHIKV-ZIKV apresentaram baixas dosagens plasmáticas de IFN- $\gamma$  em relação aos controles e pacientes mono-infectados durante a fase aguda da doença (Figura 18.C). As análises pareadas (agudos vs. crônicos) não mostraram diferenças estatísticas entre si (Figura 18.D).



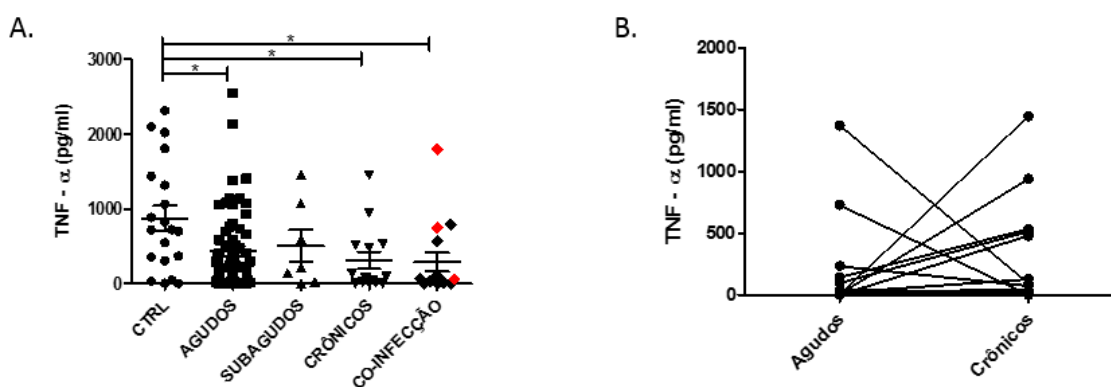
**Figura 18. Perfil de produção de Interferons do tipo I e do tipo II durante as diferentes fases da infecção pelo CHIKV, em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A técnica de ELISA sanduíche permite que sejam detectadas moléculas solúveis através da utilização de anticorpos específicos conjugados a enzimas que catalisam um substrato colorimétrico. Losangos vermelhos indicam co-infecção DENV-CHIKV. (A) Dosagem de IFN- $\alpha$  no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=21, subagudos n=3 e crônicos n=11) e controles (n=16). (B) Dosagem pareada (fase aguda vs fase crônica) de IFN- $\alpha$  no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (n = 9 pares, 18 amostras). (C) Dosagem de IFN- $\gamma$  no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=57, subagudos n=6 e crônicos n=14), co-infectados com CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV (n=16) e controles (n=19). (D) Dosagem pareada (fase aguda vs fase crônica) de IFN- $\gamma$  no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (n = 14 pares, 28 amostras). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's: IFN- $\alpha$  p<0.05 e IFN- $\gamma$  p<0.001. Para comparação entre dois grupos não-pareados foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde \*p<0,05; \*\*p<0,005 e \*\*\*p<0,001. Para análise das amostras pareadas foi utilizado o Teste *Wilcoxon*.

#### 5.1.4.2. Outras citocinas

Estudos clínicos com pacientes infectados pelo CHIKV são escassos, no entanto, estes sugerem que a resposta imune do hospedeiro é crucial no controle da infecção pelo CHIKV. Por outro lado, a persistência dos sintomas parece ser consequência direta da infecção viral além da associação com a resposta imune. Desta forma, mediadores inflamatórios tais como citocinas e quimiocinas são associados com a patogênese da artrite induzida pela infecção. Até o momento,

pouco se sabe sobre o papel destes mediadores na infecção pelo CHIKV e sua importância nas formas clínicas da doença assim como em pacientes co-infectados. Desta forma, as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15 e IL-10 foram avaliadas no plasma de controles clinicamente saudáveis e nos grupos de pacientes.

Nossos resultados demonstraram baixas dosagens plasmáticas de TNF- $\alpha$  nos pacientes infectados pelo CHIKV durante as fases agudas e crônicas quando comparados com controles saudáveis. Pacientes co-infectados pelo CHIKV-DENV e ou CHIKV-ZIKV apresentaram baixas dosagens de TNF- $\alpha$  (Figura 19.A).



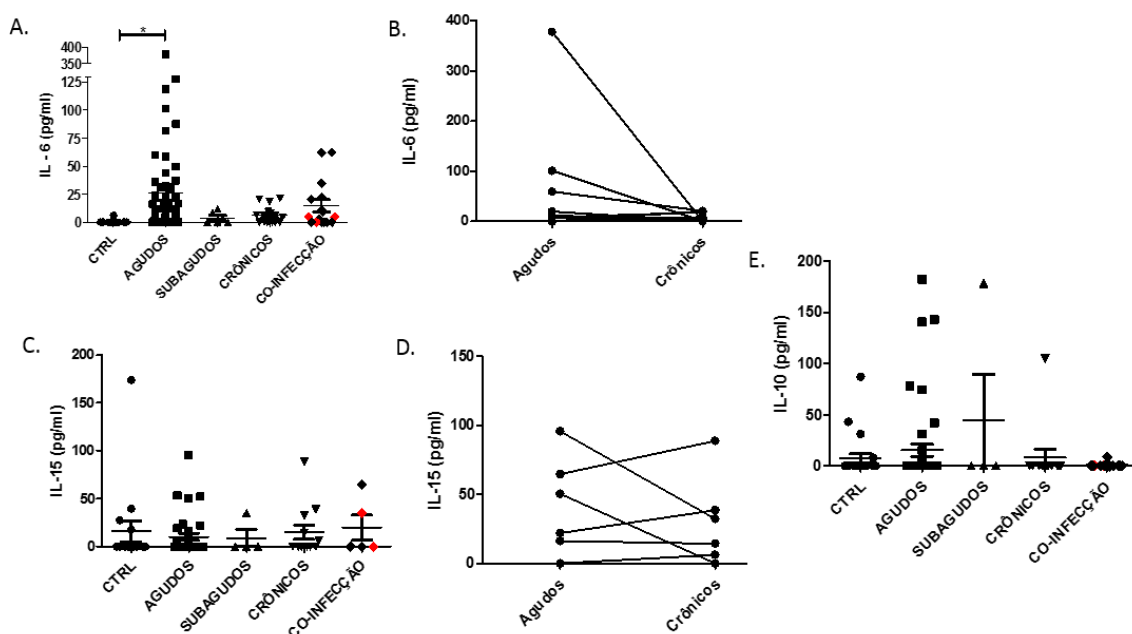
**Figura 19. Perfil de TNF- $\alpha$  sérico durante as fases da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados com (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** Através do ELISA foi possível avaliar os níveis plasmáticos da citocina inflamatória TNF- $\alpha$  nos diferentes grupos estudados. Losangos vermelhos indicam co-infecção DENV-CHIKV. (A) Dosagem de TNF- $\alpha$  em pacientes (agudos n=62, subagudos n=7 e crônicos n=14) e co-infectados (n = 15) em relação aos controles sadios (n = 20). (B) Dosagem de TNF- $\alpha$  pareada (fase aguda vs fase crônica) em pacientes infectados pelo CHIKV (n = 14 pares, 28 amostras). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's:  $p < 0,05$ . Para comparação entre dois grupos não-pareados foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $*p < 0,05$ . Para análise das amostras pareadas foi utilizado o Teste *Wilcoxon*.

Em relação a citocina pró-inflamatória IL-6, elevadas dosagens plasmáticas foram encontradas em pacientes mono-infectados com CHIKV durante a fase aguda da doença (Figura 20.A). Embora haja uma tendência a diminuição desta citocina na fase crônica, não houve diferença estatística na análise pareada (Agudos vs. Crônicos) (Figura 20.B).

A interleucina 15 (IL-15) é conhecidamente responsável pela ativação de populações de células NK (Malarkannan, 2018) (Figura 20.C e 20.D). Não foi observada diferença estatística na produção da IL-15 nos diferentes grupos de pacientes estudados. Da mesma forma, não observamos diferença estatística na produção da citocina anti-inflamatória, IL-10 nos diferentes grupos de pacientes



estudados e apenas três pacientes apresentaram dosagens elevadas dessa citocina (Figura 20.E). Não foi possível realizar a análise pareada (Agudos vs Crônicos) devido à falta de detecção da interleucina nos respectivos pares (valores abaixo do limite de detecção).



**Figura 20. Análise das citocinas séricas IL-6, IL-15 e IL-10 durante as diferentes fases da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A realização da técnica de ELISA permitiu a análise da concentração das interleucinas 6, 15 e 10 (IL-6, IL-15 e IL-10) em plasma de controles saudáveis e pacientes nas diferentes classificações. Losangos vermelhos indicam co-infecção DENV-CHIKV. (A) Dosagem de IL-6 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=59, subagudos n=8, crônicos n=12 e co-infectados n=15) e controles (CTRL, n=19). (B) Dosagem pareada de IL-6 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=7 pares, 14 amostras). (C) Dosagem de IL-15 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos n=50, subagudos n=7, crônicos n=13 e co-infectados n=13). (D) Dosagem pareada de IL-15 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=6 pares, 12 amostras) e controles (CTRL, n=15). (E) Dosagem de IL-10 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=52, subagudos n=7, crônicos n=12 e co-infectados n=13) e controles (CTRL, n=19). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação *Dunn's*, não houve diferença estatística em nenhum dos testes. Para comparação entre dois grupos não-pareados foi utilizado o Teste *t – Mann Whitney* onde \* $p < 0,05$ . Para análise das amostras pareadas foi utilizado o Teste *Wilcoxon*.

### 5.1.4.3. Quimiocinas

#### 5.1.4.3.1. Quimiocinas CC – CCL2, CCL4 e CCL5

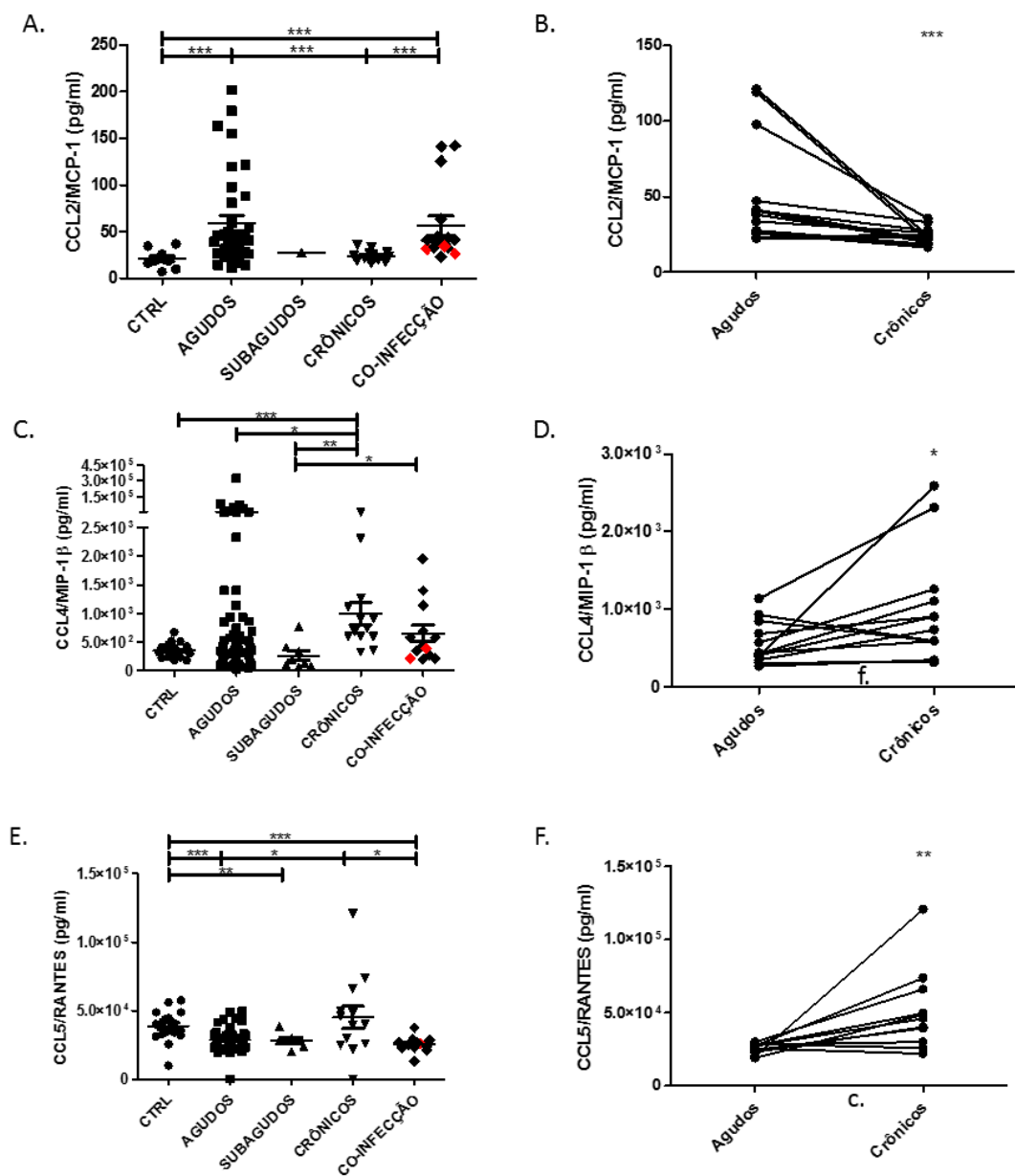
As quimiocinas CCL2, CCL4 e CCL5 foram analisadas no plasma de pacientes e em controles clinicamente saudáveis.

Em relação às quimiocinas, maiores níveis circulantes de CCL2 foram observados nos pacientes mono-infectados pelo CHIKV, e também nos pacientes co-infectados em relação aos controles. Análise das amostras pareadas (agudos

vs. crônicos) demonstrou menores dosagens nos pacientes na fase crônica (> 90 dias de infecção) (Figura 21.A e 21.B).

Em relação à quimiocina CCL4, proteína inflamatória de macrófago (MIP-1 $\beta$ ), observamos elevadas dosagens durante a fase aguda, fase crônica e em amostras de pacientes co-infectados (Figura 21.C). Após análise das amostras pareadas de pacientes nas fases agudas e crônicas, foi possível constatar elevadas dosagens de CCL4 na fase crônica (> 90 dias de infecção) (Figura 21.D).

A CCL5, também conhecida como RANTES (do inglês, *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*), possui papel na migração de macrófagos e células NK e na interação célula T/DC (Guerreiro *et al.*, 2011). Ao contrário das outras quimiocinas, observamos baixas dosagens plasmáticas de CCL5 nos pacientes durante a fase aguda, subaguda e pacientes co-infectados (Figura 21.C). A análise das amostras pareadas (Agudos vs. Crônicos) demonstrou elevadas dosagens plasmáticas durante a fase crônica da infecção (Figura 21.D).

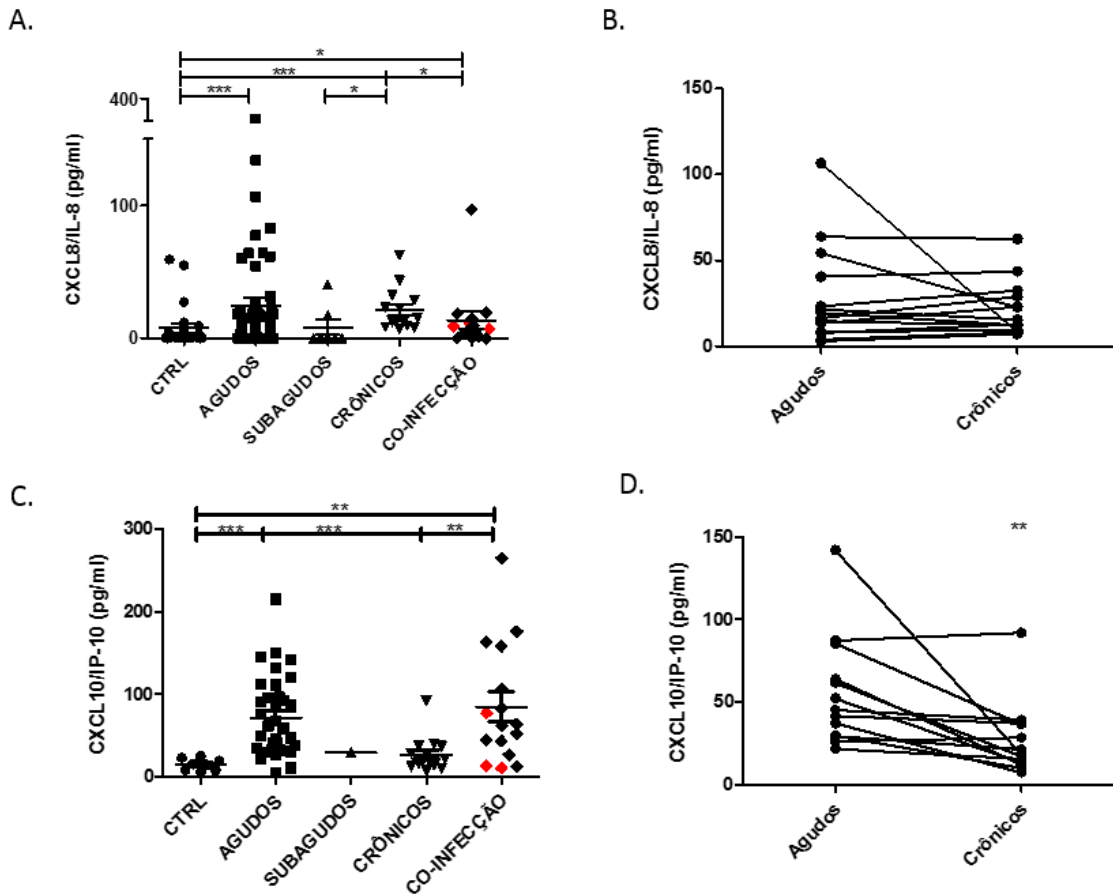


**Figura 21. Análise das quimiocinas CCL2, CCL4 e CCL5 durante as diferentes fases da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infetados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A técnica de ELISA permitiu a análise das quimiocinas CCL2, CCL4 e CCL5 no plasma de controles e pacientes nas diferentes classificações do estudo. Losangos vermelhos indicam co-infecção DENV-CHIKV. (A) Dosagem de CCL2 em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=36, subagudos n=1, crônicos n=14 e co-infetados n=16) e controles (CTRL, n=10). (B) Dosagem pareada de CCL2 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=14 pares, 28 amostras). (C) Dosagem de CCL4 em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=62, subagudos n=8, crônicos n=13 e co-infetados n=13) e controles (CTRL, n=22). (D) Dosagem pareada de CCL4 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=12 pares, 24 amostras). (E) Dosagem de CCL5 em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=51, subagudos n=7, crônicos n=13 e co-infetados n=13) e controles (CTRL, n=19). (F) Dosagem pareada de CCL5 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=11 pares, 22 amostras). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's, onde CCL4  $p < 0,005$ ; CCL2 e CCL5  $p < 0,001$ . Para comparação entre dois grupos não-pareados foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,001$ . Para análise das amostras pareadas foi utilizado o Teste *Wilcoxon* \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### **5.1.4.3.2. Quimiocinas CXC – CXCL8 e CXCL10**

Em relação as quimiocinas CXCL8 e CXCL10, observamos níveis significativamente elevados destes fatores nos pacientes mono infectados durante a fase aguda da doença (Figura 22). Pacientes infectados pelo CHIKV e na fase crônica da infecção apresentaram elevadas dosagens de CXCL8 em relação aos controles e aos pacientes na fase subaguda. Da mesma forma, os pacientes co-infectados apresentaram elevadas dosagens de CXCL8 quando comparados com os indivíduos saudáveis (Figura 22.A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na análise de amostras pareadas (Agudos vs. Crônicos) (Figura 22.B).

Observamos elevadas dosagens circulantes de CXCL10 nos pacientes infectados pelo CHIKV quando comparados com controles. A CXCL10 também se destacou nos pacientes apresentando co-infecção com elevadas dosagens plasmáticas (Figura 22.C). A análise das dosagens em amostras pareadas (Agudos vs. Crônicos), demonstrou menores concentrações de CXCL10 durante a fase crônica. (Figura 22.D).

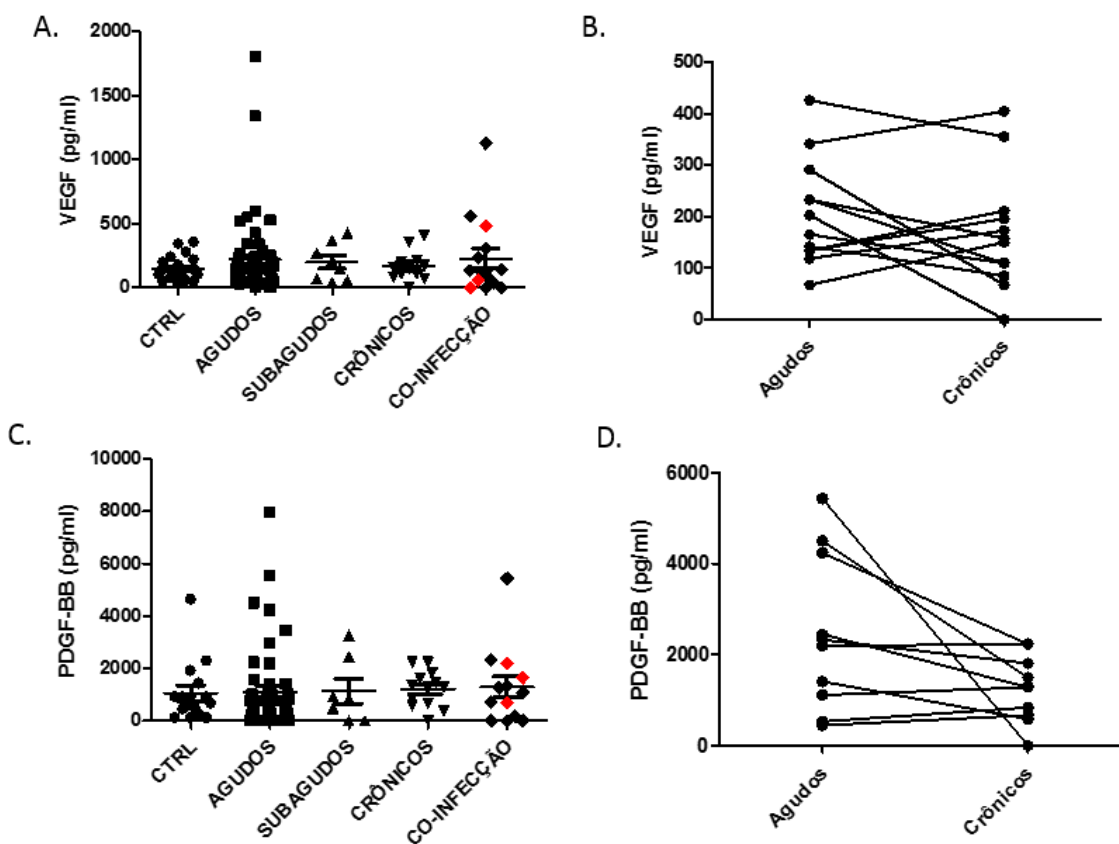


**Figura 22. Análise das quimiocinas CXCL8 e CCL10 durante as diferentes fases da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** Outrossim, a técnica de ELISA permitiu a avaliação do perfil sérico de quimiocinas CXC circulantes. Losangos vermelhos indicam co-infecção DENV-CHIKV. (A) Dosagem de CXCL8 em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=66, subagudos n=7, crônicos n=14 e co-infectados n=15) e controles (CTRL, n=24). (B) Dosagem pareada de CXCL8 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=14 pares, 28 amostras). (C) Dosagem de CXCL10 em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=36, subagudos n=1, crônicos n=14 e co-infectados n=16) e controles (CTRL, n=10). (D) Dosagem pareada de CXCL10 no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=13 pares, 26 amostras). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's, onde CXCL8 e CXCL10  $p < 0,001$ . Para comparação entre dois grupos não-pareados foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,005$  e  $***p < 0,001$ . Para análise das amostras pareadas foi utilizado o Teste *Wilcoxon*  $**p < 0,005$ .

#### 5.1.4.4. Fatores de Crescimento

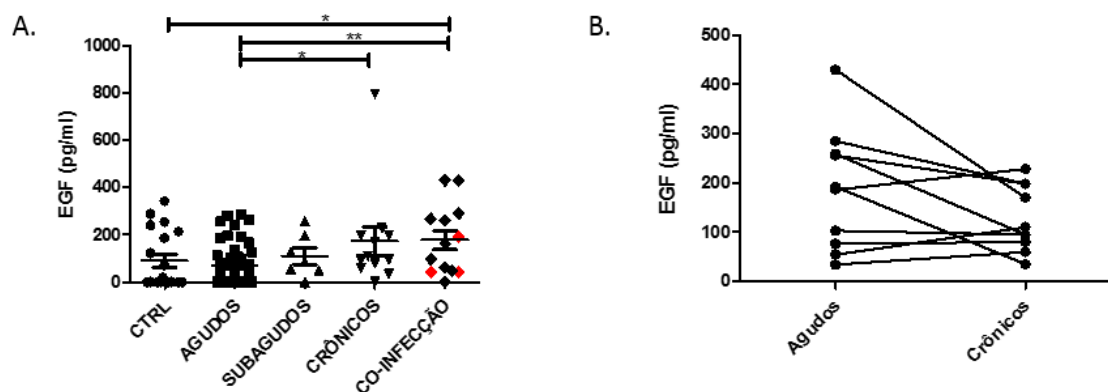
Por fim, a técnica de ELISA também nos permitiu avaliar alguns fatores de crescimento no plasma de controles clinicamente saudáveis e pacientes infectados pelo CHIKV. Foram selecionados para avaliação três fatores de crescimento relacionados a angiogênese e remodelamento tecidual, são eles: EGF, VEGF e PDGF-BB. As análises dos fatores VEGF (Figura 23.A e 23.B) – um dos fatores de crescimento responsáveis pela angiogênese, agindo no endotélio vascular - e PDGF-BB (Figura 23.C e 23.D) – fator também relacionado

a angiogênese e com papel na recuperação e remodelamento tecidual - nos diferentes grupos do estudo, não demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos de estudo.



**Figura 23. Análise de fatores de crescimento séricos VEGF e PDGF-BB durante as diferentes fases da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** A técnica de ELISA permitiu a mensuração dos níveis circulantes dos fatores de crescimento VEGF e PDGF-BB no plasma de pacientes e controles. Losangos vermelhos indicam co-infecção DENV-CHIKV. (A) Dosagem de VEGF em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=59, subagudos n=8, crônicos n=12 e co-infectados n=15) e controles (CTRL, n=23). (B) Dosagem pareada de VEGF no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=11 pares, 22 amostras). (C) Dosagem de PDGF-BB em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=50, subagudos n=7, crônicos n=12 e co-infectados n=13) e controles (CTRL, n=16). (D) Dosagem pareada de PDGF-BB no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=10 pares, 20 amostras). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação *Dunn's*, onde nenhum apresentou relevância estatística. Para comparação entre dois grupos não-pareados foi utilizado o *Teste t – Mann Whitney*. Para análise das amostras pareadas foi utilizado o *Teste Wilcoxon*.

A análise do EGF – fator de crescimento epidermal -, um dos responsáveis pela recuperação de lesões cutâneas, demonstrou baixas concentrações em pacientes na fase aguda. Observamos elevadas dosagens de EGF em pacientes durante a fase crônica e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) em comparação aos grupos de controles e pacientes pertencentes a fase aguda (Figura 24.A). Não observamos diferenças estatísticas nas análises pareadas (Agudos vs Crônicos) (Figura 24.B).



**Figura 24. Análise do fator de crescimento EGF durante as diferentes fases da infecção pelo CHIKV e em pacientes co-infectados (CHIKV-DENV ou CHIKV-ZIKV) e controles.** Através da técnica de ELISA mensuramos os níveis circulantes do fator de crescimento EGF no plasma de pacientes e controles. Losangos vermelhos indicam co-infecção DENV-CHIKV. (A) Dosagem de EGF em pacientes infectados pelo CHIKV (agudos n=52, subagudos n=7, crônicos n=13 e co-infectados n=13) e controles (CTRL, n=19). (B) Dosagem pareada de EGF no plasma de pacientes infectados pelo CHIKV (Agudos vs Crônicos; n=10 pares, 20 amostras). Linhas horizontais representam Média e verticais Desvio Padrão. Asteriscos representam estatística relevante decorrente da comparação entre dois grupos. A análise estatística utilizada para comparação dos grupos analisados foi *ONEWAY ANOVA – Kruskal-Wallis test* com pós teste de comparação Dunn's, onde apresentou  $p < 0,05$ . Para comparação entre dois grupos não-pareados foi utilizado o Teste t – Mann Whitney onde  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,005$ . Para análise das amostras pareadas foi utilizado o Teste *Wilcoxon*.

## 5.2. Amostragem *in vitro*

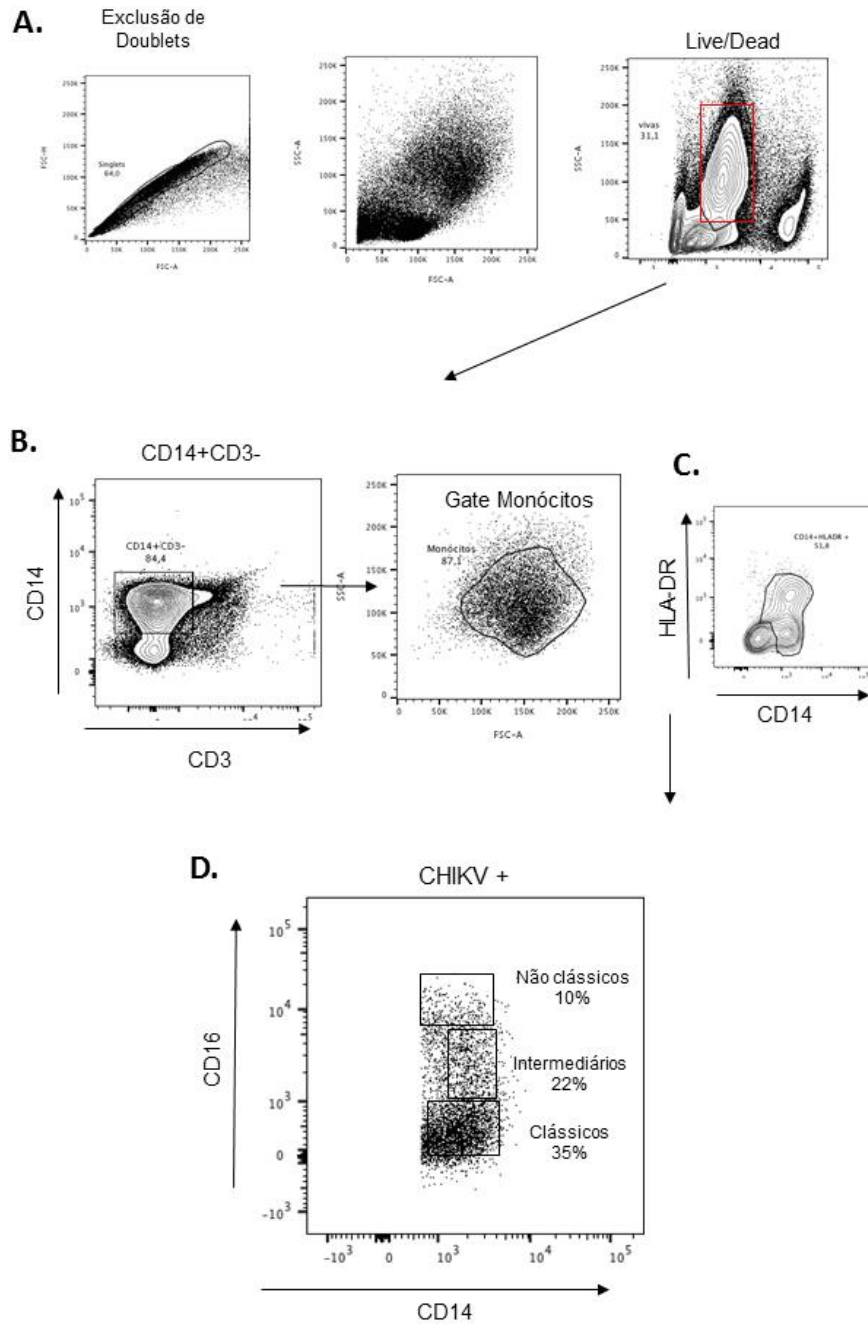
Estudos *in vitro* permitem a análise de populações celulares selecionadas, provenientes de linhagens de células imortalizadas ou de culturas primárias. Visando a melhor compreensão da infecção pelo CHIKV nas subpopulações de monócitos, estabelecemos um modelo de infecção *in vitro* dessas células utilizando PBMCs de doadores (n=2) clinicamente saudáveis provenientes de *Buffy Coats* do HUCFF – UFRJ. Assim, PBMCs foram infectadas com CHIKV (MOI 0.1) e após 24h as frequências das subpopulações de monócitos foram analisadas.

Além disso, as PBMCs foram plaqueadas, pré-tratadas ou não com peptídeo inibidor da MYD88 (MYD88i), estimuladas ou não com o agonista de TLR7/8 (R848) e infectadas ou não com CHIKV (conforme descrito no item 4.6). Após 24h de infecção, as células foram marcadas para sua fenotipagem com subsequente leitura por citometria de fluxo.

Foi avaliada a infecção pelo CHIKV na população total de monócitos através da estratégia de análise descrita a seguir (Figura 25). Primeiro, foi realizada a exclusão de *doublets* com subsequente seleção das células vivas através do Live/Dead (Figura 25.A). Em seguida foi feita a seleção de células

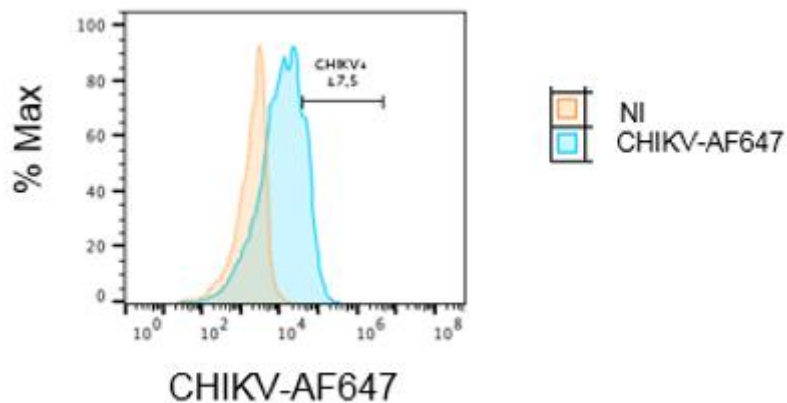
CD3-CD14+ para retirar a interferência de possíveis linfócitos (Figura 25.B). Foi, então, realizado o *gate* morfológico nos monócitos (Figura 25.B), seleção da população HLA-DR+CD14+ (Figura 25.C) e avaliação das subpopulações a partir da expressão das moléculas de CD14 e CD16 (Figura 25.D). Para isso foram utilizados os anticorpos monoclonais anti - CD14 V500, anti – CD16 PECy7, anti – HLA-DR PerCP (R&D) e anti – CD3 AF700 (BD) e o kit de Live & Dead.





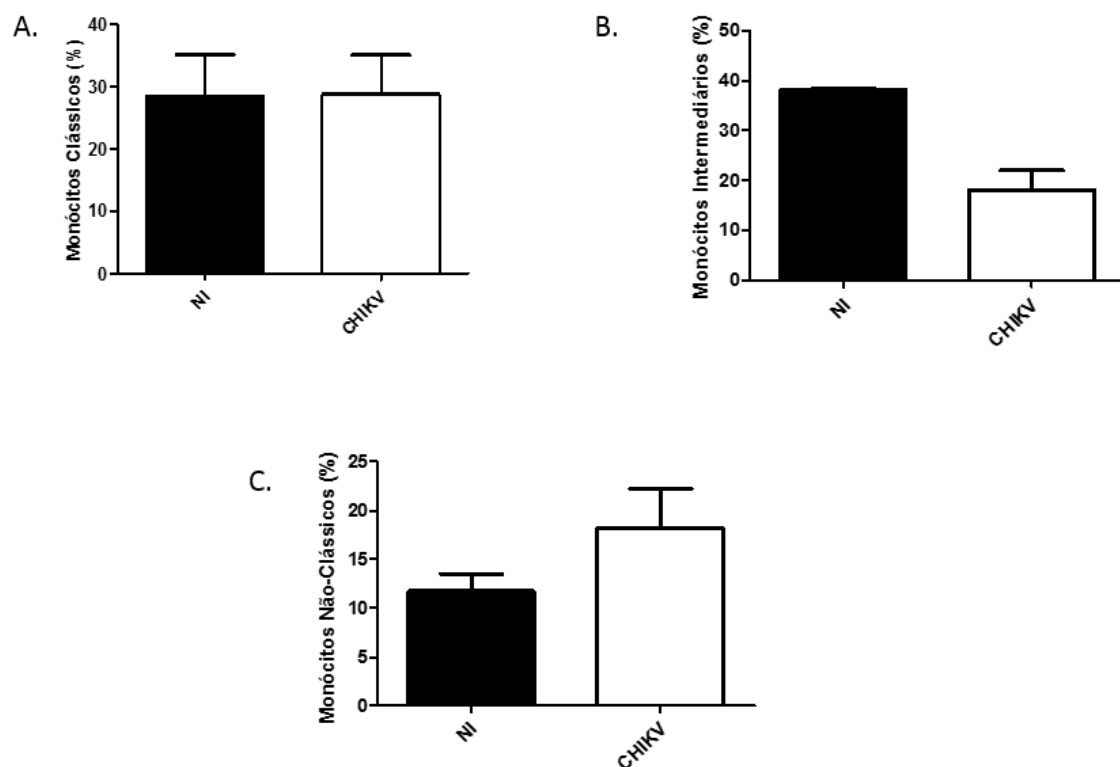
**Figura 25. Estratégia de análise das subpopulações de monócitos dos experimentos *in vitro*.** Para análise das diferentes subpopulações de monócitos em células não-infectadas e células infectadas com CHIKV foram realizadas as imunomarcações multiparamétricas. Para começar a análise foi feita a exclusão de doublets (FSC-A vs FSC-H) e seleção das células vivas (A). Logo após foram selecionadas as células CD14+CD3<sup>-</sup>. As células foram avaliadas quanto seu tamanho e granulosidade (FSC-A vs SSC-A) novamente onde foi selecionada a população de monócitos (B). Então foi verificada a expressão de células HLA-DR+CD14+ (C) e dentro dessa população, verificar a expressão dos marcadores CD14 e CD16 (D). Figura representativa de uma amostra infectada com CHIKV.

Avaliamos a infecção na população total de monócitos através da mesma estratégia de *gate* descrita na figura anterior (Figura 25). Os resultados demonstraram frequência de infecção em cerca de  $16 \pm 2.12$  (%) dos monócitos (média  $\pm$  desvio padrão) (Figura 26).



**Figura 26. Frequência de monócitos infectados com CHIKV *in vitro*.** Foi utilizado o protocolo de infecção *in vitro* em culturas primárias de monócitos provenientes de doadores saudáveis. O histograma mostra o percentual de monócitos infectados com CHIKV em comparação aos não infectados (NI), conforme a legenda.

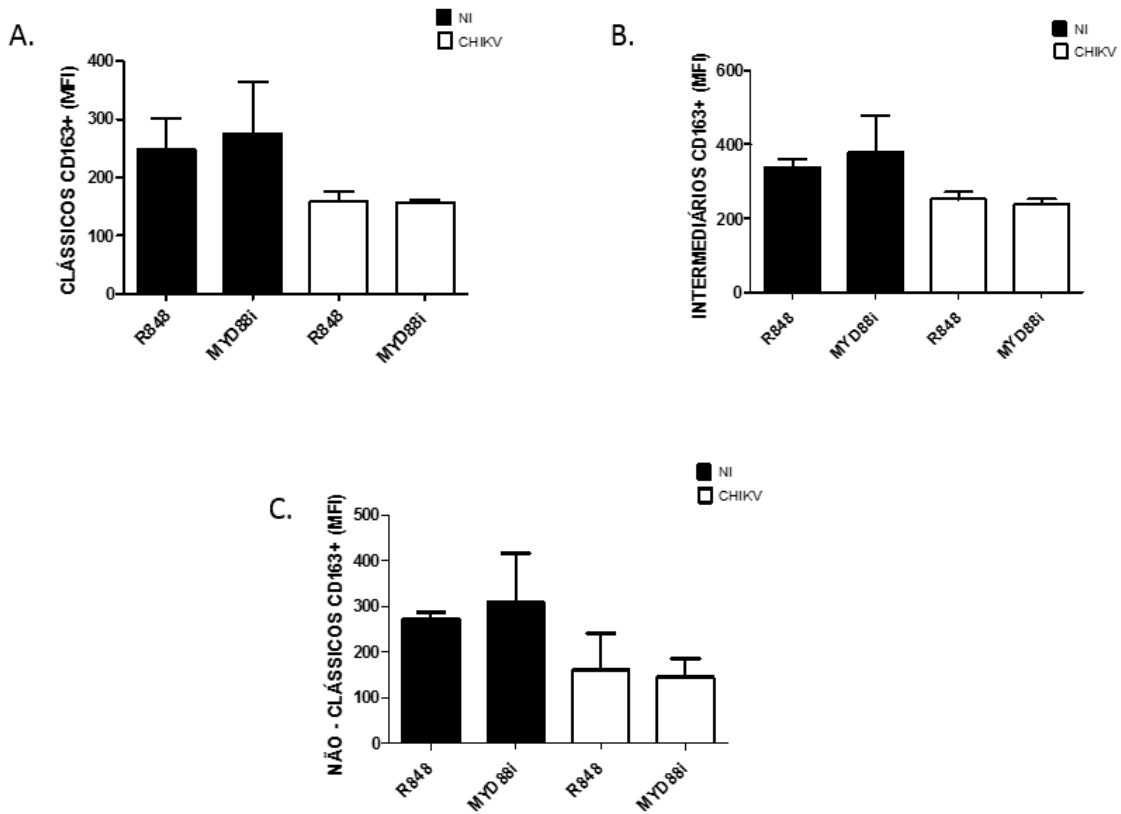
De forma subsequente, as três subpopulações de monócitos foram analisadas em amostras infectadas e não infectadas pelo CHIKV e não estimuladas (com o agonista e bloqueador) (Figura 27). Apesar de não encontramos diferença estatisticamente significativa, podemos verificar que os monócitos intermediários apresentaram menores valores percentuais (Figura 27.B), enquanto que os monócitos não-clássicos apresentaram maiores valores percentuais (Figura 27.C) nas PBMCs infectadas pelo CHIKV.



**Figura 27. Frequência das subpopulações de monócitos nos grupos NI, e CHIKV.** Foram analisadas as diferenças nas frequências das subpopulações de monócitos no grupo de células não infectadas (NI – barras negras) e infectadas com o vírus (CHIKV – barras brancas). (A) Frequência da subpopulação de monócitos clássicos nos três grupos estudados. (B) Frequência da subpopulação de monócitos intermediários nos grupos estudados. (C) Frequência da subpopulação de monócitos não-clássicos nos três grupos estudados. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

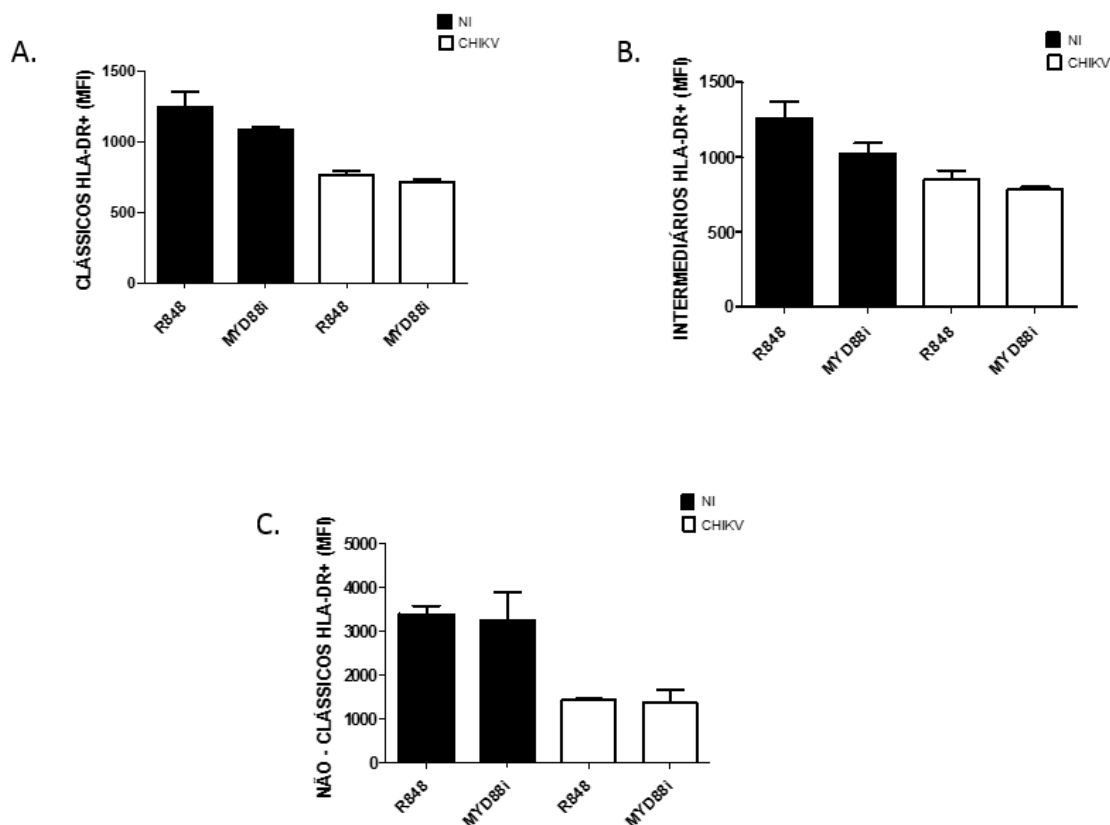
As subpopulações foram analisadas quanto aos perfis de ativação de cada uma de acordo com os estímulos utilizados (R848 e MYD88i).

Para fins de análise de ativação celular, realizamos a imunomarcagem para as moléculas de CD163 e HLA-DR (Figuras 28 e 29). A análise dos resultados preliminares demonstrou baixa expressão de CD163 nos monócitos clássicos, intermediários e não clássicos comparados com o NI, sem haver, no entanto, diferença estatisticamente significativa. (Figura 28).



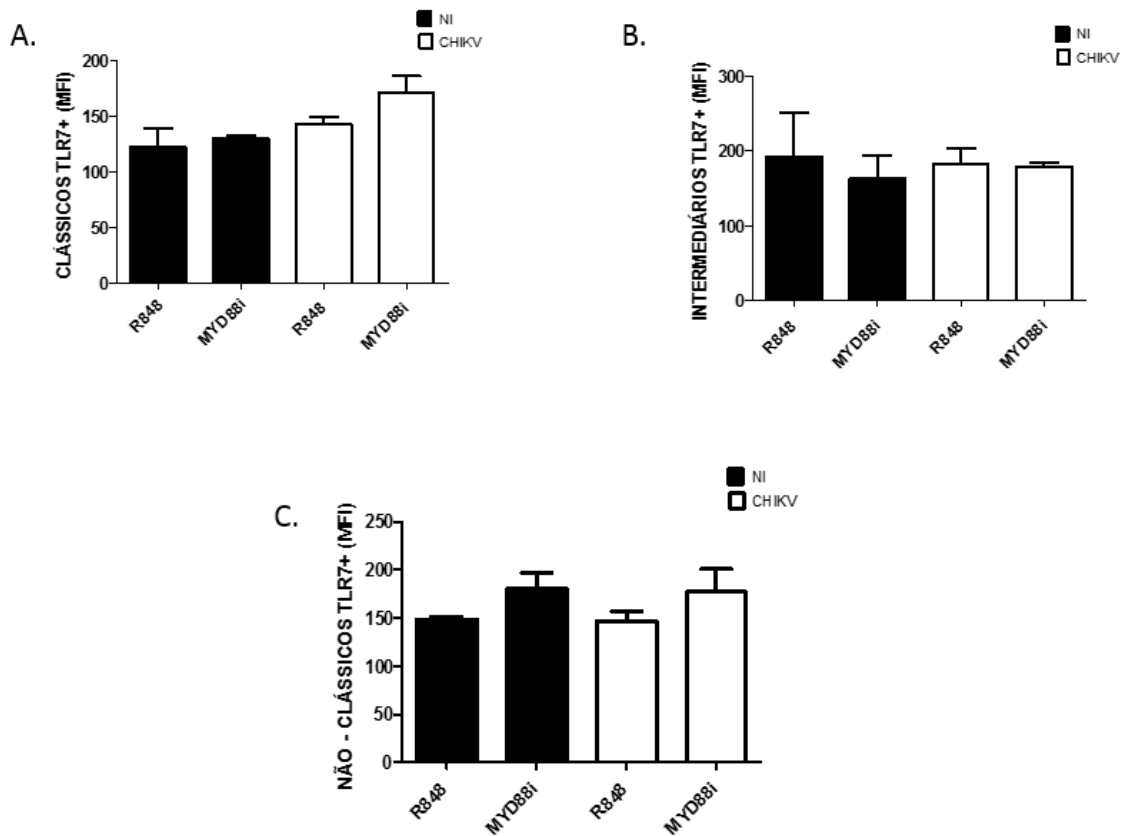
**Figura 28. Análise da expressão de CD163 em monócitos clássicos, intermediários e não - clássicos sob os diferentes estímulos utilizados.** A avaliação da expressão da molécula de CD163 foi realizada nas três subpopulações de monócitos (clássicos, intermediários e não-clássicos) sob os diferentes estímulos utilizados. Barras negras (NI) representam as células não infectadas, as barras brancas (CHIKV) representam as células infectadas pelo CHIKV. (A) Expressão da molécula de CD163+ (MFI) na subpopulação de monócitos clássicos. (B) Expressão da molécula de CD163+ (MFI) na subpopulação de monócitos intermediários e (C) não - clássicos. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

De forma similar, os resultados preliminares demonstraram que as subpopulações de monócitos clássicos, intermediários e não clássicos apresentaram baixa expressão de HLA-DR nas PBMCs infectadas pelo CHIKV comparadas com o controle (NI) (Figura 29).



**Figura 29. Análise da expressão de HLA-DR em monócitos clássicos, intermediários e não - clássicos sob os diferentes estímulos utilizados.** A avaliação da expressão da molécula de HLA-DR foi realizada nas três subpopulações de monócitos sob os diferentes estímulos utilizados. Barras negras (NI) representam as células não infectadas, as barras brancas (CHIKV) representam as células infectadas pelo CHIKV. Expressão de HLA-DR em monócitos clássicos (A), intermediários (B) e não-clássicos (C) nos três grupos estudados. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

Por fim, foi realizada a análise da expressão do TLR7 nas diferentes condições utilizadas (Figura 30). Sabe-se que o TLR7 é um dos principais PRRs sensíveis a infecções virais presentes nos endossomas dos monócitos (Lester & Li, 2014). Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão de TLR7 pelas subpopulações de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos para todos os estímulos aplicados (Figura 30).



**Figura 30. Análise da expressão de TLR7 em monócitos clássicos, intermediários e não - clássicos sob os diferentes estímulos utilizados.** A avaliação da expressão da molécula de TLR7 foi realizada nas três subpopulações de monócitos sob os diferentes estímulos utilizados. Barras negras (NI) representam as células não infectadas, as barras brancas (CHIKV) representam as células infectadas pelo CHIKV. Expressão de TLR7 (MFI) em monócitos clássicos (A) e não - clássicos (C) quando infectados com CHIKV. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## 6. DISCUSSÃO

As epidemias causadas pelo CHIKV constituem um sério problema na saúde pública brasileira. A Febre Chikungunya é uma doença marcada por uma febre de início abrupto que pode se estender por vários dias, geralmente acompanhada de erupção cutânea, além de grave e debilitante poliartralgia. A ausência de medicamentos específicos é um dos principais desafios. Além disso, os mecanismos imunológicos envolvidos durante a infecção pelo CHIKV são pouco conhecidos bem como desfechos clínicos dos pacientes infectados. Estudos clínicos com pacientes infectados pelo CHIKV são escassos, no entanto, estes sugerem que a resposta imune do hospedeiro é crucial no controle da infecção pelo CHIKV (Lum & Ng, 2015; Rivas-Estilla *et al.*, 2015; Labadie *et al.*, 2010; Gardner *et al.*, 2010). Por outro lado, a persistência dos sintomas parece ser consequência direta da infecção viral além da associação com a resposta imune. Neste sentido, nosso objetivo foi estudar as subpopulações de monócitos e citocinas/quimiocinas/fatores de crescimento na resposta imune antiviral em pacientes naturalmente infectados pelos vírus chikungunya e em modelo *in vitro* de interação com este vírus.

As subpopulações de monócitos podem desempenhar papéis diferentes na resolução de infecções virais. Sabe-se que os monócitos clássicos são responsáveis pela resposta a infecções por microrganismos (bactérias e fungos) enquanto que monócitos não – clássicos respondem a infecções virais. Monócitos intermediários são os principais apresentadores de antígeno, dentre as outras subpopulações, além de promoverem a regulação da apoptose e migração para tecidos (Kapellos *et al.*, 2019b). Diversos estudos têm demonstrado a susceptibilidade de monócitos (e macrófagos derivados de monócitos) a vírus de várias famílias em infecções de caráter agudo e crônico. A exemplo disso pode-se citar o vírus influenza, DENV, ZIKV e HCV, por exemplo (Nikitina *et al.*, 2018).

Os primeiros estudos sobre o perfil de resposta imunológica ao CHIKV divergiam quanto ao papel dos monócitos durante a infecção. Alguns deles, inclusive negavam que este tipo celular seria suscetível ao vírus (Kam *et al.* 2009). Atualmente sabe-se que essas células (e sua progênie, os macrófagos)

atuam como as principais células alvo da infecção natural em humanos e em modelos *in vitro* (Kasarskis *et al.*, 2018; Her *et al.*, 2010).

Já foi visto em estudos com o RRV, outro Alphavírus com intensas manifestações clínicas articulares, a persistência de macrófagos infectados no líquido sinovial. É possível que o CHIKV se utilize de monócitos/macrófagos e sua capacidade migratória para atingir sítios privilegiados, como as próprias cápsulas articulares. Além disso, cada vez mais tem se visto agentes infecciosos modulando e polarizando a diferenciação celular para fenótipos que possibilitem sua maior sobrevivência (Hoarau *et al.*, 2010).

Com a finalidade de entender melhor a imunopatogênese do CHIKV, foram utilizados diversos modelos de estudo como linhagens celulares (as THP-1, por exemplo, são de linhagem de monócitos), culturas primárias de monócitos a partir de doadores saudáveis e modelos animais (como camundongos e macacos). Nesses estudos, monócitos e macrófagos também aparecem como alvos de infecção evidenciando o papel desempenhado por essas células no estabelecimento da infecção (Tanabe *et al.*, 2018; Labadie *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012).

Desde que se tomou conhecimento das subpopulações de monócitos CD16+, diferentes estudos realizados com infecções de caráter crônico têm mostrado a importância delas no curso dessas infecções. Vale destacar um dos primeiros trabalhos com essa abordagem onde foi visto que monócitos expressando CD16 aparecem em maior frequência em pacientes HIV+ progredindo para AIDS. Foram vistos monócitos CD16+ conjugados a linfócitos T no sangue periférico, abrigando DNA viral e possivelmente contribuindo para disseminação do vírus (Ancuta *et al.*, 2006).

O contato com partículas virais leva a modificações nos padrões de comportamento celular (expressão e secreção de moléculas se modificam). Os processos que levam a ativação celular podem ser decorrentes da ativação de PRRs por DAMPs e/ou PAMPs produzidas por microrganismos infecciosos. A interação com esses receptores leva à ativação celular e transcrição de fatores que culminam na produção de citocinas e quimiocinas. A superfamília dos TLRs já é bem estudada no curso das infecções virais, dentre eles destacando-se o TLR7 – um dos responsáveis pela detecção do genoma viral - e mais recentemente os TLR2 e TLR4 – detectando proteínas solúveis provenientes das



partículas virais -, presentes nas três subpopulações citadas. Eles são responsáveis pela iniciação de cascatas de sinalização e consequente produção de IFN do tipo I e IFN- $\gamma$ , além de outras moléculas pró-inflamatórias responsáveis pela lise de células infectadas, recrutamento leucocitário e *clearance* viral (Sampath *et al.*, 2018; Lester & Li, 2014).

Sabendo que os monócitos desempenham um possível papel na disseminação viral em pacientes infectados e que esse tipo celular é heterogêneo na sua resposta as diversas infecções, buscamos avaliar o comportamento das subpopulações durante a infecção pelo CHIKV.

Nosso objetivo nesse trabalho foi analisar as frequências das subpopulações de monócitos em pacientes naturalmente infectados pelo CHIKV e pacientes co-infectados com o vírus. Também buscamos avaliar se os dados obtidos através das análises de citometria nas células de pacientes mono-infectados com CHIKV seria reprodutível no nosso modelo de infecção *in vitro*. Por fim também avaliamos o perfil de ativação de cada subpopulação de monócito através da avaliação das moléculas de CD163, TLR2/4/7 e HLA-DR. Em consonância buscamos estabelecer relações com os mediadores inflamatórios presentes no plasma dos pacientes infectados com CHIKV.

De forma a caracterizar os grupos de pacientes selecionados a participar dessa coorte, foram avaliados os sintomas mais comuns apresentados por eles, assim como as características demográficas dos grupos. Dados como sexo, comorbidades anteriores e idade foram recolhidos dos pacientes nos diferentes grupos de classificações utilizados. Também foram avaliadas as frequências das diversas manifestações clínicas nos diferentes grupos avaliados. Os resultados mostram que a média de idade nos diferentes grupos ficou entre 43 e 55 anos. Foi observada que a média de idade de pacientes que apresentaram cronificação da infecção foi de 55 anos, o que ratifica a média de idade encontrada na literatura de pacientes que desenvolvem a fase crônica (Paixão *et al.*, 2018).

Em seguida realizamos a avaliação dos parâmetros hematológicos de pacientes. Confirmando dados da literatura, foi exposto que aqueles infectados com CHIKV possuem baixo percentual de hematócrito, contagem de plaquetas e leucócitos diminuídos em relação a pacientes com outras doenças febris e, em alguns casos, abaixo do valor de referência. Padrão semelhante ao que ocorre durante a infecção pelo DENV (Cunha & Trinta, 2017; Santelli *et al.*, 2017) A

infecção pelo dengue é associada com trombocitopenia e alguns estudos correlacionaram baixas contagens de plaquetas com os casos mais graves (Azeredo *et al.*, 2015). A infecção pelo ZIKV, por outro lado, não é associada com trombocitopenia na maioria dos pacientes (Azeredo *et al.*, 2018). Existem poucos relatos de trombocitopenia em pacientes infectados pelo CHIKV. Nossos resultados enfatizam a importância do acompanhamento clínico e também laboratorial de pacientes em áreas de risco.

O Ministério da Saúde, segundo seu Manual de Manejo Clínico para pacientes com CHIKV, desaconselha a utilização de diagnóstico molecular a partir de oito dias de doença. Alega-se que a partir da primeira semana a tentativa de detecção do genoma viral por RT-PCR é sem utilidade (Santelli *et al.*, 2017).

De encontro ao que é preconizado estão os dados da quantificação da carga viral no plasma de pacientes monoinfectados com CHIKV. Embora a frequência de pacientes com carga viral detectável diminua conforme a evolução da doença, ainda foi possível detectar viremia em todas as fases de infecção, sobremaneira, em pacientes crônicos. Até então só havia sido encontrado RNA viral em macrófagos articulares de pacientes crônicos (Hoarau *et al.*, 2010). Ainda assim, a difícil detecção do genoma viral em outros estudos com pacientes infectados com CHIKV na fase crônica acabava tornando esses resultados contraditórios (Bilsborrow, 2019). A viremia inédita encontrada nesses pacientes com mais de 90 dias de doença explicita replicação viral em atividade no organismo dos mesmos. O que alerta para duas questões importantes, a primeira é que esses pacientes dificilmente estão evoluindo para a cura e a segunda alerta para a importância epidemiológica dos mesmos.

Em relação a primeira questão levantada, infecções virais crônicas, como HIV e HBV, já demonstraram a manutenção da viremia em pacientes com anos de infecção. Inclusive no HIV a carga viral está relacionada diretamente com o *status* de saúde do paciente. A relação é inversa, quanto maior a viremia, mais comprometido se encontra o paciente. Já foi estabelecida a relação entre uma alta carga viral e o aparecimento de doenças não relacionadas diretamente com a AIDS, como é o Linfoma de Hodgkin (Kowalkowski *et al.*, 2014). Estudos realizados com pacientes crônicos infectados com HBV mostram que maior carga viral/antígenos virais estão associados a pacientes com maior presença

de biomarcadores inflamatórios e, conseqüentemente um pior prognóstico (Lin & Kao, 2016).

Em relação a segunda questão levantada, precisamos avaliar o impacto desses pacientes na epidemiologia, dinâmica de dispersão do vírus e manutenção de epidemias por meses a fio (mesmo fora da época de verão). Para essa análise levamos em consideração os ciclos silvestres. Sabe-se que primatas não-humanos e outros mamíferos podem desempenhar papel de reservatórios virais (McCrae *et al.*, 1971). Assim, devemos refletir se os humanos que evoluem para a fase crônica da doença não poderiam estar desempenhando esse papel de reservatórios nos ciclos urbanos.

A persistência da carga viral também nos alerta para o tipo de tratamento oferecido a esses pacientes. A detecção da mesma durante a fase crônica poderia orientar o uso de medicamentos antivirais. Pacientes crônicos frequentemente utilizam metotrexato por meses, devido as manifestações dolorosas intensas. Embora seja um tratamento eficiente para diminuir o níveis de inflamação encontrados nas articulações, essa droga também possui atividade imunossupressora - o que pode complicar os casos de pacientes que ainda apresentam viremia (Hoarau *et al.*, 2010).

O próximo passo foi avaliar diretamente as subpopulações de monócitos durante a infecção pelo CHIKV. Nossos achados demonstram que pacientes naturalmente infectados com CHIKV se assemelham ao que acontece com pacientes infectados com o DENV. Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que as diferentes subpopulações de monócitos se comportam de maneira singular durante a infecção pelo vírus dengue. Um dos trabalhos do grupo mostrou que há diferença na frequência e ativação dessas subpopulações celulares em pacientes infectados pelo DENV e controles saudáveis. Os dados mostram que conforme se aumenta a gravidade da dengue, os monócitos intermediários também se mostram aumentados em pacientes naturalmente infectados pelo DENV e em modelos de cultura *in vitro* enquanto que frequência de monócitos clássicos diminui (Azeredo *et al.*, 2010).

O CHIKV diminui a frequência de monócitos clássicos e aumenta a frequência de monócitos intermediários. O que nos permite supor que a subpopulação de monócitos clássicos está sendo convertida em monócitos intermediários, processo esse já descrito na literatura em situações de infecção.

Demonstramos pela primeira vez que aparentemente, quando desafiados com agentes virais, os monócitos tendem a diminuir sua expressão de CD14 e aumentar a expressão de CD16, semelhante ao que é encontrado no DENV e ZIKV ([Azeredo et al., 2010](#); [Foo et al., 2017](#)). O efeito dessa plasticidade é a maior frequência de monócitos intermediários e não-clássicos diretamente envolvidos com a resposta aos vírus ([Sampath et al., 2018](#); [Kapellos et al., 2019a](#); [Kasarskis et al., 2018](#)).

Para avaliar o perfil de ativação celular, começamos com a avaliação da expressão da molécula de CD163 na superfície das três subpopulações analisadas. Essa molécula foi identificada somente na linhagem monocítica – macrofágica. O CD163, pode ser encontrado na superfície celular ou em sua forma solúvel (CD163s), tem sido descrito como uma molécula que produz efeitos imunomodulatórios durante os processos inflamatórios. Sua função principal é se ligar a complexos de haptoglobina-hemoglobina (Hp-Hb), induzindo a degradação do grupamento heme. Recentemente foi descoberto que o CD163 atua como receptor celular envolvido com as respostas inflamatórias tanto frente a bactérias quanto aos vírus. Alguns estudos sugerem que esse receptor sirva como forma de entrada para a infecção do vírus da febre suína africana (ASFV), por exemplo, desempenhando importante papel na disseminação viral ([Etzerodt & Moestrup, 2013](#)).

A sua forma solúvel só foi detectada em humanos, através da técnica de ELISA. A liberação de CD163 em sua forma solúvel se dá através da enzima TACE/ADAM17, a mesma enzima responsável pela clivagem de pró-TNF- $\alpha$  em TNF- $\alpha$  maduro. Assim, são feitas associações entre altas concentrações de TNF- $\alpha$  liberadas por monócitos e macrófagos e a detecção aumentada de CD163 no plasma. O aumento na produção de TNF- $\alpha$  se dá a partir da ativação celular por PRRs, principalmente os TLR, que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Coortes acompanhando mais de 8 mil voluntários mostraram que o aumento da expressão de CD163 pode estar associado ao desenvolvimento de doenças crônicas como o diabetes mellitus do tipo 2. A expressão desse receptor também aumenta em pacientes que apresentam quadros inflamatórios agudos, como é o caso da hepatite, mas em quadros crônicos há diminuição do mesmo. Essas alterações são vistas em doenças inflamatórias, sejam de origem

infecciosa ou de origem metabólica (como é o caso da arteriosclerose) (Etzerodt & Moestrup, 2013).

A análise da expressão de CD163 em pacientes infectados com o CHIKV e co-infectados mostrou que essa molécula apresenta comportamento singular em cada subpopulação. Nos monócitos clássicos ela não mostrou diferença entre os grupos analisados. Já nos monócitos intermediários houve aumento de expressão nos três grupos analisados (agudos, crônicos e co-infectados). Nos monócitos não-clássicos, houve diminuição dessa expressão nas duas fases, aguda e crônica. Os dados sugerem que monócitos intermediários e clássicos desempenham papéis diferentes durante a infecção pelo CHIKV. Os monócitos intermediários, apresentam aumento da frequência durante a infecção pelo CHIKV, atrelado a isso, aumento da expressão de CD163. No plasma desses pacientes vemos diminuição de produção de TNF- $\alpha$  em relação aos controles. O que nos leva a inferir que uma das causas das baixas concentrações da citocina em pacientes CHIKV+ não seria consequência de uma baixa atividade de TACE/ADAM17, já que as moléculas de CD163 embora abundantes, continuam ligadas a membrana dos monócitos e não em sua forma solúvel (Etzerodt & Moestrup, 2013).

Para melhor análise da ativação celular, avaliamos a expressão de HLA-DR e dos TLRs. Estudo do nosso grupo demonstrou baixa expressão de HLA-DR em monócitos CD14+ de pacientes infectados pelo DENV, e elevada expressão dos receptores de superfície TLR2 e TLR4, mostrando ativação celular de perfil inflamatório (Azeredo *et al.*, 2010).

O HLA-DR é uma molécula pertencente ao MHC de classe II, responsável pela apresentação antigênica em APC. Espera-se que células infectadas com microrganismos aumentem sua expressão de HLA-DR afim de estabelecer uma ponte eficaz com a resposta imune específica, além de sinalizar as outras células sobre seu status infectado. Assim células efetoras poderão identificar células infectadas e exercer controle sobre a disseminação da infecção (Cruvinel *et al.*, 2010) este estudo, foi possível avaliar a expressão de HLA-DR nas diferentes subpopulações de monócitos. Em especial, observamos elevada expressão de HLA-DR na subpopulação intermediária corroborando sua função principal como apresentadora de antígeno (Kapellos *et al.*, 2019a).

Durante a infecção pelo CHIKV foi possível observar o aumento da expressão de HLA-DR na subpopulação de monócitos intermediários de todos os grupos de pacientes analisados (agudos, crônicos e co-infectados com DENV ou ZIKV) em relação aos controles saudáveis. Já está bem caracterizada a função da subpopulação de monócitos intermediários quanto à apresentação de antígeno, migração transendotelial e regulação da apoptose. Monócitos intermediários são caracterizados pela alta expressão do receptor CCR5 e da molécula HLA-DR, ambos envolvidos no papel de apresentação antigênica e migração transendotelial – duas funções primordiais no combate a infecção pelo CHIKV (Kapellos *et al.*, 2019b). Já nos monócitos não-clássicos, não vimos diferenças entre pacientes e controles.

Nossos dados demonstraram o aumento na expressão de TLR2 nos monócitos intermediários durante a fase aguda, mas a expressão diminuiu durante a fase crônica. Também foi visto esse aumento da expressão de TLR2 na subpopulação intermediária em pacientes co-infectados. Em relação à subpopulação de monócitos não-clássicos, observamos diminuição da expressão de TLR2 em pacientes na fase crônica. Levando-se em consideração o papel desempenhado por essa subpopulação, tanto na resposta direta a infecções virais, como no patrulhamento de vasos sanguíneos e migração transendotelial, especulamos se a diminuição da expressão desse receptor não contribuiria para a manutenção da infecção durante a fase crônica. No entanto, estudos futuros ainda são necessários na elucidação dos mecanismos imunológicos envolvidos e associados com pacientes que evoluem para fase crônica da infecção.

Em relação ao TLR4, ao contrário do que foi visto no TLR2, observamos maiores médias de MFI nos monócitos clássicos e intermediários no grupo de pacientes co-infectados comparados aos controles e pacientes mono-infectados com CHIKV.

Já foi visto em experimentos realizados em camundongos que monócitos inflamatórios (análogos aos humanos CD16+) são peça fundamental para a resolução da infecção por Alphavirus. A depleção dos monócitos inflamatório na circulação desses animais aumenta a carga viral, as morbidades e impossibilita a detecção das moléculas antivirais como os IFN (Haist *et al.*, 2017). Também já está bem estabelecido que este tipo celular, junto com sua forma tecidual

principal (macrófagos) servem como alvo e reservatórios de diferentes vírus (Nikitina *et al.*, 2018). Está consolidado que as subpopulações de monócitos possuem certa plasticidade onde os monócitos clássicos atuam como fontes das outras duas subpopulações em casos de necessidade. Se diferenciando em monócitos intermediários e, posteriormente, diminuindo a expressão de CD14 e aumentando a expressão de CD16, caracterizando os monócitos não-clássicos. Sabe-se também que os monócitos intermediários e, principalmente os monócitos não-clássicos são os principais na resposta antiviral (Cros *et al.*, 2010).

Em conjunto esses dados apontam para alguns eventos importantes que estão acontecendo nas subpopulações de monócitos dos pacientes analisados nessa coorte. Primeiramente parece que está ocorrendo a conversão de monócitos clássicos em monócitos intermediários, o que explicaria a diminuição da frequência dos primeiros e consequente aumento da frequência dos segundos. Em segundo lugar, há aumento da expressão de CD163 nos intermediários e diminuição nos não-clássicos, sugerindo que essas células talvez possam desempenhar papéis antagônicos no que tange a contribuição para a resposta pró-inflamatória à infecção pelo CHIKV.

Embora monócitos clássicos e intermediários sejam os principais produtores de citocinas e quimiocinas, já foi visto que durante infecções virais, monócitos não-clássicos podem produzir TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8. Além da produção de citocinas, monócitos não-clássicos tem por função a fagocitose mediada pelo Sistema Complemento e receptores Fc, adesão e migração transendotelial além das respostas antivirais propriamente ditas. Semelhante aos monócitos intermediários, monócitos CD14dim detém a habilidade de processamento e apresentação antigênica. Ao secretarem TNF- $\alpha$  induzem a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular, promovendo a migração de outros tipos celulares também (Sampath *et al.*, 2018; Guilliams *et al.*, 2018).

O genoma do CHIKV ativa os receptores de reconhecimento de padrões do hospedeiro (PRRs), incluindo receptores endossômicos do tipo Toll (TLR3 e TLR7) e citoplasmáticos do tipo RIG-I (RIG-I e MDA5), que ativam moléculas adaptadoras (como MYD88 e TRIF) para ativação de respostas imunes antivirais dependentes do interferon tipo I, fundamentais para indução do estado antiviral nas células (White *et al.*, 2011). A ativação das subpopulações de monócitos se

dá a partir desses PRRs, como os TLR2, TLR4 e TLR7/8 (Cros *et al.*, 2010). A importância de PRRs já foi demonstrada em diversos estudos de infecção por arbovírus em humanos e modelos animais. Já foi visto que camundongos depletados de TLR3, por exemplo, quando infectados com CHIKV, tiveram uma doença mais pronunciada com aumento da carga viral (Lum & Ng, 2015). Assim como estudos com camundongos nocaute para a proteína adaptadora MYD88 exibiram doenças severas e aumento da extensão de danos teciduais quando infectados com CHIKV E RRV (Carpentier, 2018).

Os TLR2 e TLR7 diminuem sua expressão na subpopulação de monócitos não-clássicos durante a fase crônica, sugerindo que essas células estariam menos sensíveis a responder ao CHIKV, resultando na manutenção da infecção vista nesses pacientes com persistência de carga viral e sintomas clínicos. Arelado a este fato, está a diminuição na expressão de HLA-DR nessa subpopulação durante a infecção pelo CHIKV. É possível que o vírus esteja promovendo uma modulação dessa subpopulação, diminuindo sua efetividade no controle da infecção.

As diferenças demonstradas nos nossos resultados em relação ao padrão de expressão dos TLRs em pacientes infectados com CHIKV, concordam com estudos prévios cujos autores descreveram a ativação desses receptores por *Alphavirus* e, em especial, pelo CHIKV.

Não observamos diferenças significativas na frequência das subpopulações de monócitos ou na expressão dos marcadores de ativação assim como no receptor TLR7 em PBMCs infectadas ou não com CHIKV. Os resultados preliminares dos experimentos *in vitro* demonstraram pequena elevação na frequência da subpopulação de monócitos não-clássicos infectados com CHIKV. Nessa mesma população, há diminuição na expressão de CD163 nas células infectadas, confirmando dados observados nos pacientes naturalmente infectados com CHIKV.

Não encontramos diferenças estaticamente significativas nas subpopulações de monócitos de PBMCs pré-tratados com R848 e/ou MYD88i. Análises futuras são necessárias para que possamos avaliar melhor o papel da ativação dos receptores dependentes de MYD88 durante a infecção pelo CHIKV.

Os mediadores solúveis (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) apresentam papel importante no estabelecimento e manutenção



da resposta inflamatória. Eles podem ter efeitos pró ou anti-inflamatórios e agir nos processos de recrutamento leucocitário, ativação das células de defesa e remodelamento tecidual no processo de cura de enfermidades (Chung, 2009).

Dentre as citocinas classicamente relacionadas às infecções virais estão os IFNs, moléculas com papel antiviral que também agem no recrutamento leucocitário e os TNFs, capazes de induzir a morte de células infectadas (Ferreira *et al.*, 2016). Já foi visto que a liberação dessas citocinas auxilia células NK a impedir o escape do DENV, levando ao *clearance* viral eficiente (Lim *et al.*, 2014).

Os Interferons são conhecidos por inibir a replicação viral, inclusive no gênero dos *Alphavírus*. Já foi visto que o desfecho clínico – evolução mais rápida ou não para a cura espontânea – é determinada logo nas primeiras horas de infecção pelo Sindbis Virus (SINV) a partir da resposta com produção de IFN do tipo I pelas poucas células infectadas (Atasheva *et al.*, 2012). Em estudos realizados em camundongos foi visto que o tratamento prévio com IFN- $\alpha/\beta$  previne artrite durante a infecção pelo CHIKV (Gardner *et al.*, 2010).

Monócitos, macrófagos, células NK e linfócitos TCD4 e TCD8 são os principais componentes celulares dos infiltrados inflamatórios em modelos animais, indicando a participação destas células na patogênese da artrite. A infecção pelo CHIKV é associada com intensa produção de mediadores inflamatórios. Estudo mostrou níveis aumentados de IL-2R, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IFN- $\alpha$ , IP-10/CXCL10 e níveis reduzidos de IL-8/ CXCL8 em pacientes infectados pelo CHIKV (Hoarau *et al.*, 2010). Casos graves de infecção pelo CHIKV apresentaram aumento nas dosagens de IL-1 $\beta$  e IL-6 e diminuição nas dosagens de CCL5/RANTES (Chow *et al.*, 2011). Estudo recente correlacionou negativamente a produção de TNF- $\alpha$  à cronicidade e gravidade dos sintomas, mostrando que quanto menores os níveis dessa citocina maiores as chances da evolução para quadros crônicos e mais intensas as manifestações dolorosas (Chang *et al.*, 2018). Coletivamente, esses estudos sugerem que citocinas específicas (por exemplo, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) podem estar ligadas à gravidade da infecção pelo CHIKV.

Nossas análises mostram que o perfil de produção tanto do IFN- $\alpha$ , como do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estão diminuídas em pacientes infectados com CHIKV. A IL-6 se mostrou aumentada durante a fase aguda de pacientes mono-infectados com CHIKV. A IL-6 já mostrou ser capaz de aumentar a resposta de fagócitos

monocleares, por promover o aumento da expressão de TLR4 (Azeredo *et al.*, 2010). Esses dados sugerem que os pacientes da nossa coorte exibem um perfil de produção de citocinas condizentes com manifestações dolorosas intensas e indicativo de possibilidade de evolução para quadros crônicos. De acordo com o relatado na clínica, quase 100% dos pacientes apresentou artralgia, além de outras manifestações dolorosas.

Nesse estudo não constatamos diferenças nos níveis de IL-15 e nem de IL-10, em pacientes infectados com CHIKV quando comparados aos controles. Recentemente, Lee e colaboradores demonstraram que a expansão de células Tregs foi fundamental no controle da imunopatologia induzida pelo CHIKV em camundongos. O estudo demonstrou que a expansão de células Treg após a administração de IL-2 reduziu o inchaço nas patas, lesão tecidual e a expressão do RNAm de citocinas e quimiocinas, incluindo IL-6, IFN $\gamma$ , IP10/CXCL10 e IL-10 (Lee *et al.*, 2015). Pode ser que a pouca produção de IL-10 observada no nosso estudo se deva a um descontrole do sistema imunológico onde há produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e ativação celular com o mesmo perfil e diminuição de células reguladoras como a própria Treg.

Em relação as quimiocinas, confirmamos dados disponíveis na literatura que mostram altas concentrações séricas das citocinas CCL2, CXCL10 e CXCL8 em pacientes infectados com CHIKV e infectados com outras arboviroses (Teng *et al.*, 2015). Vale ressaltar que tem sido debatido o papel da CCL2 durante a infecção pelo CHIKV. O debate se baseia no fato da CCL2 ser uma das principais responsáveis pelo recrutamento de monócitos e macrófagos, e poderia acabar interferindo na dinâmica da infecção viral (Labadie *et al.*, 2010). Já sendo estabelecido o papel que monócitos e macrófagos desempenham durante a infecção pelo CHIKV enquanto alvos do vírus e possíveis reservatórios virais, tem se estudado o papel da CCL2 afim de interferir nessa dinâmica (Thiberville *et al.*, 2013). Um medicamento chamado Bindarit, inibidor da síntese de CCL2, foi administrado em camundongos com sintomas articulares devido à infecção com CHIKV e RRV. Os resultados demonstraram que o tratamento melhorou os sintomas articulares e reduziu a destruição tecidual (Rulli *et al.*, 2011).

Nossos dados mostram altas concentrações de CCL2 em pacientes durante a fase aguda. A análise pareada de pacientes na fase aguda x crônica mostrou que em pacientes crônicos a concentração dessa quimiocina diminui,

mesmo naqueles com carga viral detectável. Um padrão inverso foi encontrado nas concentrações de CCL5 e CCL4. Essas duas quimiocinas apresentaram maiores concentrações em pacientes na fase crônica, quando comparadas as duas fases. Esses achados são consistentes com o que se tem publicado a respeito do papel dessas quimiocinas associadas aos quadros de infecção pelo CHIKV, em relação a migração de monócitos e macrófagos para as articulações, como é o caso do CCL2, quanto a associação com sintomas dolorosos intensos e cronicidade, como é o caso da CCL5 (Chow *et al.*, 2011).

Em relação aos fatores de crescimento, não observamos níveis séricos divergentes durante as fases analisadas, a exceção do EGF, que demonstrou níveis plasmáticos diminuídos durante a fase aguda da infecção pelo CHIKV. Sugerindo que essa molécula poderia estar concentrada na derme dos pacientes infectados, promovendo a recuperação das lesões cutâneas dada sua função nos processos de reepitalização e recuperação de lesões. Também é possível que os quadros de trombocitopenia encontrados nesses pacientes estejam influenciando nos níveis de EGF e, inclusive, CCL5. Isso porque as plaquetas são as fontes principais desses dois mediadores. Essa hipótese já foi levantada por Chow e colaboradores, em 2011, quando o grupo demonstrou que pacientes durante a fase subaguda apresentam restauração dos níveis normais de CCL5 e EGF (Behm *et al.*, 2012; Chow *et al.*, 2011).

## 7. Perspectivas

Realizar novas análises *in vitro* afim de que se clarifique os dados obtidos nesse modelo de estudo quanto à ativação celular e expressão dos receptores da imunidade inata

Realizar novas análises voltadas as outras populações celulares da imunidade inata envolvidas na resposta a infecções virais (células NK e pDC), durante o doutorado.

## 8. Conclusões

Os diferentes grupos de pacientes analisados apresentaram sinais e sintomas semelhantes, 15% evoluíram para forma crônica da doença.

No que diz respeito as alterações laboratoriais, pacientes mono infectados pelo CHIKV apresentam baixos valores percentuais do hematócrito, menor contagem de plaquetas, leucócitos e linfócitos, confirmando dados da literatura; importante, demonstramos persistência da viremia na fase crônica da infecção.

De modo geral, observamos diminuição na frequência de monócitos clássicos e consequente aumento de monócitos intermediários nos pacientes infectados pelo CHIKV, sugerindo uma conversão de uma população em outra, respectivamente. Além disso, nosso estudo forneceu cenário do perfil de imunidade inata durante a infecção pelo CHIKV destacando importante papel dos monócitos intermediários e receptores do tipo Toll.

Confirmando dados disponíveis na literatura, encontramos altas concentrações séricas das citocinas CCL2/MCP-1, IL-6, CXCL10/IP-10 e CXCL8/IL-8 durante a fase aguda. Por outro lado, observamos baixas dosagens de IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e EGF nos pacientes infectados pelo CHIKV; foram encontradas altas concentrações de CCL5/RANTES e CCL4/MIP-1 $\beta$  nos pacientes crônicos. Coletivamente, esses resultados sugerem que mediadores inflamatórios específicos podem estar associados com diferentes desfechos observados nos pacientes;

Não encontramos diferenças estatísticas significativas nas subpopulações de monócitos de PBMCs infectadas *in vitro* com CHIKV. Estudos futuros são necessários para que possamos melhor avaliar o papel das subpopulações de monócitos e receptores do tipo Toll durante a infecção *in vitro* pelo vírus.

## 9. Referências bibliográficas

- Ancuta, Petronela, Kevin J. Kunstman, Patrick Autissier, Tauheed Zaman, David Stone, Steven M. Wolinsky, and Dana Gabuzda. 2006. "CD16+ Monocytes Exposed to HIV Promote Highly Efficient Viral Replication upon Differentiation into Macrophages and Interaction with T Cells." *Virology* 344 (2): 267–76. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.10.027>.
- Atasheva, S., M. Akhrymuk, E. I. Frolova, and I. Frolov. 2012. "New PARP Gene with an Anti-Alphavirus Function." *Journal of Virology* 86 (15): 8147–60. <https://doi.org/10.1128/jvi.00733-12>.
- Azeredo, Elzinandes L., Patrícia C. Neves-Souza, Allan R. Alvarenga, Sônia R.N.I. Reis, Amanda Torrentes-Carvalho, Sonia Maris O. Zagne, Rita M.R. Nogueira, Luzia M. Oliveira-Pinto, and Claire F. Kubelka. 2010. "Differential Regulation of Toll-like Receptor-2, Toll-like Receptor-4, CD16 and Human Leucocyte Antigen-DR on Peripheral Blood Monocytes during Mild and Severe Dengue Fever." *Immunology* 130 (2): 202–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03224.x>.
- Azeredo, Elzinandes Leal De, Robson Q. Monteiro, and Luzia Maria De-Oliveira Pinto. 2015. "Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators." *Mediators of Inflammation* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/313842>.
- Azeredo, Elzinandes Leal, Flavia Barreto dos Santos, Luciana Santos Barbosa, Thiara Manuele Alves Souza, Jessica Badolato-Corrêa, Juan Camilo Sánchez-Arcila, Priscila Conrado Guerra Nunes, et al. 2018. "Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-Circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil." *PLoS Currents*, 1–22. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5>.
- Behm, B., P. Babilas, M. Landthaler, and S. Schreml. 2012. "Cytokines, Chemokines and Growth Factors in Wound Healing." *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 26 (7): 812–20. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04415.x>.

- Borgherini, G., P. Poubeau, F. Staikowsky, M. Lory, N. L. Moullec, J. P. Becquart, C. Wengling, A. Michault, and F. Paganin. 2007. "Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients." *Clinical Infectious Diseases* 44 (11): 1401–7. <https://doi.org/10.1086/517537>.
- Brasil.Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2015. "Monitoramento Dos Casos de Dengue e Febre de Chikungunya Até a Semana Epidemiológica (SE) 53 de 2014." *Boletim Epidemiológico* 46 (03): 1–7. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002--BE-at---SE-53.pdf>.
- Brasil, Nildimar Alves Honório; Daniel Cardoso Portela Câmara; Guilherme Amaral Calvet; Patrícia. 2015. "Chikungunya: An Arbovirus Infection in the Process of Establishment and Expansion in Brazil." *Cad. Saúde Pública* 31 (5): 1–3.
- Brito, Carlos Alexandre Antunes de, Ana Karla Arraes von Sohsten, Clezio Cordeiro de Sá Leitão, Rita de Cássia Coelho Moraes de Brito, Lilian David De Azevedo Valadares, Caroline Araújo Magnata da Fonte, Zelina Barbosa de Mesquita, et al. 2016. "Pharmacologic Management of Pain in Patients with Chikungunya: A Guideline." *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 49 (6): 668–79. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0279-2016>.
- Cassadou, S., S. Boucau, M. Petit-Sinturel, P. Huc, I. Leparç-Goffart, and M. Ledrans. 2014. "Emergence of Chikungunya Fever on the French Side of Saint Martin Island, October to December 2013." *Eurosurveillance* 19 (13): 1–4. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20752>.
- Chang, Aileen Y, Sarah Tritsch, St Patrick Reid, Karen Martins, Liliana Encinales, Nelly Pacheco, Richard L Amdur, et al. 2018. "The Cytokine Profile in Acute Chikungunya Infection Is Predictive of Chronic Arthritis 20 Months Post Infection." <https://doi.org/10.3390/diseases6040095>.
- Chaplin, D. 2010. "Overview of the Immune Response." *J Allergy Clin Immunol.* 125: 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980.Overview>.
- Chow, Angela, Zhisheng Her, Edward K S Ong, Jin-miao Chen, Frederico Dimatatac, Dyan J C Kwek, Yee-sin Leo, et al. 2011. "Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection Is Associated with Interleukin-6

- and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor” 203 (II): 149–57.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiq042>.
- Chung, Kian Fan. 2009. “Cytokines.” In *Asthma and COPD: Basic Mechanisms and Clinical Management*, 2nd ed., 327–41. Elsevier.
- Coffey, Lark L., Anna Bella Failloux, and Scott C. Weaver. 2014. “Chikungunya Virus–Vector Interactions.” *Viruses* 6 (11): 4628–63.  
<https://doi.org/10.3390/v6114628>.
- Collin, Matthew, and Venetia Bigley. 2018. “Human Dendritic Cell Subsets: An Update.” *Immunology* 154 (1): 3–20. <https://doi.org/10.1111/imm.12888>.
- Commins, Scott P., Larry Borish, and John W. Steinke. 2010. “Immunologic Messenger Molecules: Cytokines, Interferons, and Chemokines.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125 (2 SUPPL. 2): S53–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.008>.
- Cros, Jérôme, Nicolas Cagnard, Kevin Woollard, Natacha Patey, Shen Ying Zhang, Brigitte Senechal, Anne Puel, et al. 2010. “Human CD14dim Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors.” *Immunity* 33 (3): 375–86.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.08.012>.
- Cunha, Rivaldo V. da, and Karen S. Trinta. 2017. “Chikungunya Virus: Clinical Aspects and Treatment.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 112 (8): 523–31. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170044>.
- Diallo, Mawlouth, Jocelyn Thonnon, Moumouni Traore-Lamizana, and Didier Fontenille. 1999. “Vectors of Chikungunya Virus in Senegal: Current Data and Transmission Cycles.” *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60 (2): 281–86. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.281>.
- Dreschers, Stephan, Peter Saupp, Mathias Hornef, Andrea Prehn, Christopher Platen, and Thorsten W Orlikowsky. 2016. “Reduced PICD in Monocytes Mounts Altered Neonate Immune Response to *Candida Albicans*,” 1–18.  
<https://doi.org/10.5061/dryad.7t4b1.Funding>.
- Etzerodt, Anders, and Søren K. Moestrup. 2013. “CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects.” *Antioxidants and Redox Signaling* 18 (17): 2352–63. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834>.
- Fátima, Luciana Alves, and Paula de Carvalho Papa. 2010. “Fator de Crescimento Do Endotélio Vascular (VEGF): Regulação Transcricional e



- Pós-Transcricional." *Revista Da Biologia* 4 (Cl): 22–27.  
<https://doi.org/10.7594/revbio.04.05>.
- Foo, Suan-Sin, Weiqiang Chen, Yen Chan, James W Bowman, Lin-Chun Chang, Younho Choi, Ji Seung Yoo, et al. 2017. "Asian Zika Virus Strains Target CD14+ Blood Monocytes and Induce M2-Skewed Immunosuppression during Pregnancy." *Nature Microbiology* 2 (11): 1558–70. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0016-3>.
- Gardner, J., I. Anraku, T. T. Le, T. Larcher, L. Major, P. Roques, W. A. Schroder, S. Higgs, and A. Suhrbier. 2010. "Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice." *Journal of Virology* 84 (16): 8021–32.  
<https://doi.org/10.1128/jvi.02603-09>.
- Gasque, Philippe, Therese Couderc, Marc Lecuit, Pierre Roques, and Lisa F.P. Ng. 2015. "Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 15 (4): 241–49.  
<https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1710>.
- Grandadam, Marc, Valérie Caro, Sébastien Plumet, Jean Michel Thiberge, Yvan Souarès, Anna Bella Failloux, Hugues J. Tolou, et al. 2011. "Chikungunya Virus, Southeastern France." *Emerging Infectious Diseases* 17 (5): 910–13. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101873>.
- Guerreiro, Rita, Quirina Santos-Costa, and J. M. Azevedo-Pereira. 2011. "As Quimiocinas e Os Seus Receptores: Características e Funções Fisiológicas." *Acta Medica Portuguesa* 24 (SUPPL.4): 967–76.
- Guilliams, Martin, Alexander Mildner, and Simon Yona. 2018. "Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes." *Immunity* 49 (4): 595–613.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.10.005>.
- Haist, Kelsey C., Kristina S. Burrack, Bennett J. Davenport, and Thomas E. Morrison. 2017. "Inflammatory Monocytes Mediate Control of Acute Alphavirus Infection in Mice." *PLoS Pathogens* 13 (12): 1–30.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006748>.
- Halstead, Scott B. 2015. "Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas." *Emerging Infectious Diseases* 21 (4): 557–61.  
<https://doi.org/10.3201/eid2104.141723>.
- Harold Brem, 1\* Olivera Stojadinovic, 2\* Robert F Diegelmann, 3 Hyacinth Entero, 1, 4 Brian Lee, 5 Irena Pastar, 2, and 6 Michael Golinko, 1 Harvey

- Rosenberg, 1 and Marjana Tomic-Canic<sup>2</sup>. 2007. "Molecular Markers in Patients with Chronic Wounds to Guide Surgical Debridement." *Molecular Medicine* 13 (January-February): 134–42. <https://doi.org/10.2119/2006>.
- Her, Z., B. Malleret, M. Chan, E. K. S. Ong, S. C. Wong, D. J. C. Kwek, H. Tolou, et al. 2010. "Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response." *The Journal of Immunology* 184 (10): 5903–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0904181>.
- Her, Zhisheng, Yiu Wing Kam, Raymond T.P. Lin, and Lisa F.P. Ng. 2009. "Chikungunya: A Bending Reality." *Microbes and Infection* 11 (14–15): 1165–76. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.004>.
- Hoarau, J. J., M. C. Jaffar Bandjee, P. Krejbich Trotot, T. Das, G. Li-Pat-Yuen, B. Dassa, M. Denizot, et al. 2010. "Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response." *The Journal of Immunology* 184 (10): 5914–27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900255>.
- Hoarau, Jean-Jacques, Marie-Christine Jaffar Bandjee, Pascale Krejbich Trotot, Trina Das, Ghislaine Li-Pat-Yuen, Bérengère Dassa, Mélanie Denizot, et al. 2010. "Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response." *The Journal of Immunology* 184 (10): 5914–27. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900255>.
- Hong, Sujeong, Sangjun Park, and Je-wook Yu. 2011. "Pyrin Domain (PYD)-Containing Inflammasome in Innate Immunity" 41 (3): 133–46.
- Johnson, Barbara W, Brandy J Russell, Robert S Lanciotti, and J C L I N M Icrobiol. 2005. "Competing Pressures for Hr Investment.Pdf." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (10): 4977–83. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4977>.
- Joshua Britton Bilsborrow, José Kennedy Amaral and Robert T. Schoen. 2019. "Clinical Features and Management of Chronic Chikungunya Arthritis." *Current Topics in Neglected Tropical Diseases* i: 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- Juan A. González-Sánchez, MD\*; Giovanni F. Ramírez-Arroyo, MS. 2018. "Chikungunya Virus: History, Geographic Distribution, Clinical Picture, and Treatment." *Erkenntnis* 37 (4): 187–94.

- <https://doi.org/10.1007/BF02074138>.
- Kam, Yiu Wing, Edward K.S. Ong, Laurent Rénia, Joo Chuan Tong, and Lisa F.P. Ng. 2009. "Immuno-Biology of Chikungunya and Implications for Disease Intervention." *Microbes and Infection* 11 (14–15): 1186–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.003>.
- Kapellos, Theodore S., Lorenzo Bonaguro, Ioanna Gemünd, Nico Reusch, Adem Saglam, Emily R. Hinkley, and Joachim L. Schultze. 2019a. "Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases." *Frontiers in Immunology* 10 (AUG): 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>.
- . 2019b. "Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases." *Frontiers in Immunology* 10 (August): 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>.
- Kasarskis, Andrew, Theodore R Pak, Eun-Young Kim, Maria Suprun, Eva Harris, Steven M Wolinsky, Mayte Suárez-Fariñas, et al. 2018. "Comprehensive Innate Immune Profiling of Chikungunya Virus Infection in Pediatric Cases." *Molecular Systems Biology* 14 (8): e7862.  
<https://doi.org/10.15252/msb.20177862>.
- Kathryn S. Carpentier, Thomas E. Morrison. 2018. "INNATE IMMUNE CONTROL OF ALPHAVIRUS INFECTION." *Curr Opin Virol.* 28: 53–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>.
- Kawai, Taro, and Osamu Adachi. 1999. "Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin" 11: 115–22.
- Kim, et al. 2016. "NOD-like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases." *Yonsei Medical Journal* 57 (1): 5–14.  
<https://doi.org/10.3349/ymj.2016.57.1.5>.
- Konstantin A., Tsetsarkin, Rubing Chen, Michael B. Sherman and Scott C. Weaver. 2011. "Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence Konstantin." *Curr Opin Virol.* 1 (4): 310–17.  
<https://doi.org/10.1037/a0032811>.Child.
- Kowalkowski, Marc A., Rena S. Day, Xianglin L. Du, Wenyaw Chan, and Elizabeth Y. Chiao. 2014. "Cumulative HIV Viremia and Non-AIDS-Defining Malignancies among a Sample of HIV-Infected Male Veterans." *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 67 (2): 204–11.

<https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000000289>.

- Kumar, Narendran Pradeep, Abidha Suresh, Perumal Vanamail, Shanmugavelu Sabesan, Kalianna Gounder Krishnamoorthy, Jacob Mathew, Varakilparambil Thomas Jose, and Purushothaman Jambulingam. 2011. "Chikungunya Virus Outbreak in Kerala, India, 2007: A Seroprevalence Study." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 106 (8): 912–16. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800003>.
- Kumar, Shiril, Marie Christine Jaffar-Bandjee, Claude Giry, Léa Connen De Kerillis, Andres Merits, Philippe Gasque, and Jean Jacques Hoarau. 2012. "Mouse Macrophage Innate Immune Response to Chikungunya Virus Infection." *Virology Journal* 9 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-313>.
- Labadie, Karine, Thibaut Larcher, Christophe Joubert, Abdelkrim Mannioui, Benoit Delache, Patricia Brochard, Lydie Guigand, et al. 2010. "Chikungunya Disease in Nonhuman Primates Involves Long-Term Viral Persistence in Macrophages." *Journal of Clinical Investigation* 120 (3): 894–906. <https://doi.org/10.1172/JCI40104>.
- Lanciotti R S, Calisher C H, Gubler D J, Chang G J, and Vorndam A V. 1992. "Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction." *Journal of Clinical Microbiology* 30 (3): 545–551. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265106/pdf/jcm00027-0023.pdf>.
- Lanciotti, Robert S., Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Amanda J. Panella, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, and Grant L. Campbell. 2007. "Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006." *Emerging Infectious Diseases* 13 (5): 764–67. <https://doi.org/10.3201/eid1305.070015>.
- Lanciotti, Robert S., Olga L. Kosoy, Janeen J. Laven, Jason O. Velez, Amy J. Lambert, Alison J. Johnson, Stephanie M. Stanfield, and Mark R. Duffy. 2008. "Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007." *Emerging Infectious Diseases* 14 (8): 1232–39. <https://doi.org/10.3201/eid1408.080287>.
- Langers, Inge, Virginie M. Renoux, Marc Thiry, Philippe Delvenne, and Nathalie Jacobs. 2012. "Natural Killer Cells: Role in Local Tumor Growth and

- Metastasis." *Biologics: Targets and Therapy* 6: 73–82.
- Lee, Wendy W L, Teck-hui Teo, Zhisheng Her, Fok-moon Lum, Yiu-wing Kam, Doreen Haase, and Laurent Rénia. 2015. "Expanding Regulatory T Cells Alleviates Chikungunya Virus-Induced" 89 (15): 7893–7904.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00998-15>.
- Lester, Sandra N, and Kui Li. 2014. "Toll-Like Receptors in Antiviral Innate Immunity." *Journal of Molecular Biology* 426 (6, SI): 1246–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.024>.
- Lim, Daniel Say Liang, Nobuyo Yawata, Kevin John Selva, Na Li, Chen Yu Tsai, Lai Han Yeong, Ka Hang Liong, et al. 2014. "The Combination of Type I IFN, TNF- $\alpha$ , and Cell Surface Receptor Engagement with Dendritic Cells Enables NK Cells To Overcome Immune Evasion by Dengue Virus." *The Journal of Immunology* 193 (10): 5065–75.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302240>.
- Lin, Chih Lin, and Jia Horng Kao. 2016. "New Perspectives of Biomarkers for the Management of Chronic Hepatitis B." *Clinical and Molecular Hepatology* 22 (4): 423–31. <https://doi.org/10.3350/cmh.2016.0069>.
- Loo, Yueh Ming, and Michael Gale. 2011. "Immune Signaling by RIG-I-like Receptors." *Immunity* 34 (5): 680–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.003>.
- Lowe, Rachel, Christovam Barcellos, Patrícia Brasil, Oswaldo G. Cruz, Nildimar Alves Honório, Hannah Kuper, and Marilia Sá Carvalho. 2018. "The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15 (1).  
<https://doi.org/10.3390/ijerph15010096>.
- Lum, Fok Moon, and Lisa F.P. Ng. 2015. "Cellular and Molecular Mechanisms of Chikungunya Pathogenesis." *Antiviral Research* 120 (June): 165–74.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.009>.
- LUMSDEN, W. H. R. 1955. "An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory." *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49 (1): 33–57.
- Malarkannan, Subramaniam. 2018. "Natural Killer Cells : Development , Maturation , and Clinical Utilization" 9 (August): 1–23.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>.

- Maurer, M., and E. Von Stebut. 2004. "Macrophage Inflammatory Protein-1." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 36 (10): 1882–86. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.10.019>.
- Mccrae, A W R, B E Henderson, B G Kirya, and S D K Sempala. 1971. "CHIKUNGUNYA VIRUS IN THE ENTEBBE AREA OF UGANDA : Mosquito Collections" 65 (2): 152–68.
- Mcdonald, Douglas R &, and Ofer Levy. 2018. *Principles of Immune Response. Clinical Immunology*. Fifth Edit. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00003-X>.
- Mobley, James L., Michael Leininger, Steven Madore, Theodore J. Baginski, and Richard Renkiewicz. 2007. "Genetic Evidence of a Functional Monocyte Dichotomy." *Inflammation* 30 (6): 189–97. <https://doi.org/10.1007/s10753-007-9036-0>.
- Mussaret Bano Zaidi , Leticia Cedillo-Barron , Mar´ia Elena Gonz´alez y Almeida , Julio Garcia-Cordero , Freddy D. Campos , Karime Namorado-Tonix, Freddy Perez. 2019. "Serological Tests Reveal Significant Cross-Reactive Human Antibody Responses to Zika and Dengue Viruses in the Mexican Population." *Acta Tropica* 201: 105–201. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105201>.
- Nikitina, Ekaterina, Irina Larionova, Evgeniy Choinzonov, and Julia Kzhyshkowska. 2018. "Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092821>.
- Nunes, Marcio Roberto Teixeira, Nuno Rodrigues Faria, Janaina Mota de Vasconcelos, Nick Golding, Moritz U.G. Kraemer, Layanna Freitas de Oliveira, Raimunda do Socorro da Silva Azevedo, et al. 2015. "Emergence and Potential for Spread of Chikungunya Virus in Brazil." *BMC Medicine* 13 (1). <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>.
- Okumoto, Osnei, Sônia Maria Feitosa Brito, Adele Schwartz Benzaken, André Luiz de Abreu, Daniela Buosi Rohlfs, Elisete Duarte, Amanda Coutinho de Souza, Danielle Bandeira Costa de Sousa Freire, Larissa Arruda Barbosa, and Sulamita Brandão Barbiratto Vera Lúcia Carvalho da Silva Secretaria Executiva Márcia Maria Freitas Silva. 2018. "Monitoramento Dos Casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Doença Aguda Pelo Vírus Zika Até a

- Semana Epidemiológica 49 de 2018.” *Boletim Epidemiológico* 49 (59): 14.  
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/02/2018-067.pdf>.
- Outline, Chapter, Ross River, and Barmah Forest. 2017. “Chapter 28 – Togaviridae.” *Fenner’s Veterinary Virology*, no. 1: 511–24.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00028-3>.
- Paixão, Enny S., Laura C. Rodrigues, Maria da Conceição N. Costa, Martha Itaparica, Florisneide Barreto, Patrick Gérardin, and Maria Glória Teixeira. 2018. “Chikungunya Chronic Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 112 (7): 301–16. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try063>.
- Palomino, Diana Carolina Torres, and Luciana Cavalheiro Marti. 2015. “Chemokines and Immunity.” *Einstein (São Paulo)* 13 (3): 469–73.  
<https://doi.org/10.1590/s1679-45082015rb3438>.
- Pan American Health Organization. 2017. “Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory 2016.” *Chikungunya: PAHO/WHO Data, Maps and Statistics 2016* (January): 6524.  
[http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=rdmore&cid=8379&Itemid=40931](http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=8379&Itemid=40931).
- Panning, Marcus, Klaus Grywna, Marjan Van Esbroeck, Petra Emmerich, and Christian Drosten. 2008. “Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region, 2006.” *Emerging Infectious Diseases* 14 (3): 416–22. <https://doi.org/10.3201/eid1403.070906>.
- Petersen, Lyle R., and Ann M. Powers. 2016. “Chikungunya: Epidemiology.” *F1000Research* 5: 1–8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.7171.1>.
- Petitdemange, Caroline, Nadia Wauquier, and Vincent Vieillard. 2015. “Control of Immunopathology during Chikungunya Virus Infection.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (4): 846–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.039>.
- Pinto, Luzia M O, Solange A Oliveira, Elzinandes L A Braga, Rita Nogueira, and Claire F Kubelka. 1999. “Increased Pro-Inflammatory Cytokines ( TNF- a and IL-6 ) and in Brazilian Patients during Exanthematic Dengue Fever.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (3): 387–94.

- Rezza, G., L. Nicoletti, R. Angelini, R. Romi, AC Finarelli, M. Panning, P. Cordioli, et al. 2007. "Infection with Chikungunya Virus in Italy: An Outbreak in a Temperate Region." *Lancet* 370 (9602): 1840–46.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6).
- Rica, Costa, and Saint Lucia. 2015. "Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas , by Country or Territory Cumulative Cases ( Updated 15 May 2015 ) Data Source : Cases Reported by IHR NFPs to PAHO / WHO and / or through Member States Websites or Official News Publication." *PAHO*, no. May: 2048.
- Rivas-Estilla, A.M., J.A. Farfan-Ale, I. Fernández-Salas, K.A. Galán-Huerta, and J. Ramos-Jiménez. 2015. "Chikungunya Virus: A General Overview." *Medicina Universitaria* 17 (68): 175–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.06.001>.
- Rulli, Nestor E, Michael S Rolph, and Anon Srikiatkachorn. 2011. "Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit , an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis" 204. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir470>.
- Sampath, Pavithra, Kadar Moideen, Uma Devi Ranganathan, and Ramalingam Bethunaickan. 2018. "Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection." *Frontiers in Immunology* 9 (July): 1–8.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01726>.
- Santelli, Ana Carolina Faria e Silva, Laura Nogueira da Cruz, and Livia Carla Vinhal Frutuoso. 2017. "Manejo Clínico Chikungunya." *Ministério Da Saúde* 2ª edição: 77.
- Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da. 2019. "Monitoramento Dos Casos de Arboviroses Urbanas Transmitidas Pelo Aedes (Dengue, Chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 34 Dengue,.." *Boletim Epidemiológico* 50: 1–11.
- Schuffenecker, Isabelle, Isabelle Itean, Alain Michault, Séverine Murri, Lionel Frangeul, Marie Christine Vaney, Rachel Lavenir, et al. 2006. "Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak." *PLoS Medicine* 3 (7): 1058–70.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>.
- Silva, L.A., and T.S. Dermody. 2017. "Chikungunya Virus: Epidemiology,



- Replication, Disease Mechanisms, and Prospective Intervention Strategies." *The Journal of Clinical Investigation* 127 (3): 737–49. <https://doi.org/10.1172/JCI84417>.
- Simon, F., E. Javelle, A. Cabie, E. Bouquillard, O. Troisgros, G. Gentile, I. Leparç-Goffart, et al. 2015. "French Guidelines for the Management of Chikungunya (Acute and Persistent Presentations). November 2014." *Medecine et Maladies Infectieuses* 45 (7): 243–63. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.05.007>.
- Smyth, Mark J., Erika Cretney, Janice M. Kelly, Jennifer A. Westwood, Shayna E.A. Street, Hideo Yagita, Kazuyoshi Takeda, Serani L.H. Van Dommelen, Mariapia A. Degli-Esposti, and Yoshihiro Hayakawa. 2005. "Activation of NK Cell Cytotoxicity." *Molecular Immunology* 42 (4 SPEC. ISS.): 501–10. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>.
- Soumahoro, Man Koumba, Pierre Yves Boelle, Bernard Alex Gaüzere, Kokuvi Atsou, Camille Pelat, Bruno Lambert, Guy La Ruche, et al. 2011. "The Chikungunya Epidemic on La Réunion Island in 2005-2006: A Cost-of-Illness Study." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001197>.
- Souza et al., de. 2018. "Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapá in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016." *Viruses* 10 (11): 623. <https://doi.org/10.3390/v10110623>.
- Souza, Thiara Manuele Alves, Elzinandes Leal Azeredo, Jessica Badolato-Correa, Paulo Vieira Damasco, Carla Santos, Fabienne Petitinga-Paiva, Priscila Conrado Guerra Nunes, et al. 2017. "First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil." *PLoS Currents* 9 (February). <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727>.
- Suhrbier, Andreas, Marie Christine Jaffar-Bandjee, and Philippe Gasque. 2012. "Arthritogenic Alphaviruses-an Overview." *Nature Reviews Rheumatology* 8 (7): 420–29. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>.
- Tanabe, Ithallo S.B., Eloiza L.L. Tanabe, Elane C. Santos, Wanessa V. Martins, Isadora M.T.C. Araújo, Maria C.A. Cavalcante, Ana R.V. Lima, et al. 2018.

- “Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8 (October): 345.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00345>.
- Teng, Terk Shin, Yiu Wing Kam, Bennett Lee, Hapuarachchige Chanditha Hapuarachchi, Abeyewickreme Wimal, Lee Ching Ng, and Lisa F.P. Ng. 2015. “A Systematic Meta-Analysis of Immune Signatures in Patients with Acute Chikungunya Virus Infection.” *Journal of Infectious Diseases* 211 (12): 1925–35. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv049>.
- Thiberville, Simon Djamel, Nanikaly Moyen, Laurence Dupuis-Maguiraga, Antoine Nougairede, Ernest A. Gould, Pierre Roques, and Xavier de Lamballerie. 2013. “Chikungunya Fever: Epidemiology, Clinical Syndrome, Pathogenesis and Therapy.” *Antiviral Research* 99 (3): 345–70.  
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>.
- Tsetsarkin, Konstantin A., Rubing Chen, Ruimei Yun, Shannan L. Rossi, Kenneth S. Plante, Mathilde Guerbois, Naomi Forrester, et al. 2014. “Multi-Peaked Adaptive Landscape for Chikungunya Virus Evolution Predicts Continued Fitness Optimization in *Aedes Albopictus* Mosquitoes.” *Nature Communications* 5 (May): 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms5084>.
- Tsetsarkin, Konstantin A., and Scott C. Weaver. 2011. “Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence.” *PLoS Pathogens* 7 (12).  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002412>.
- Turner, Mark D., Belinda Nedjai, Tara Hurst, and Daniel J. Pennington. 2014. “Cytokines and Chemokines: At the Crossroads of Cell Signalling and Inflammatory Disease.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1843 (11): 2563–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>.
- Vigilância, Secretaria De. 2018. “Monitoramento Dos Casos de Dengue, Febre de Chikungunya e Febre Pelo Virus Zika Ate a Semana Epidemiologica 52, 2017” 49 (Tabela 2): 1–13.
- Vinicius L. Ferreira, Helena H.L. Borba, Helena H.L. Borba Vinicius L. Ferreira, Leticia P. Leonart and Aline de F. Bonetti, Leticia P. Leonart and Aline de F. Bonetti, and Roberto Pontarolo. 2016. “Cytokines and Interferons: Types and Functions C.” *IntechOpen* i (4): 13.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.

- Voss, James E., Marie Christine Vaney, Stéphane Duquerroy, Clemens Vonrhein, Christine Girard-Blanc, Elodie Crublet, Andrew Thompson, Gérard Bricogne, and Félix A. Rey. 2010. "Glycoprotein Organization of Chikungunya Virus Particles Revealed by X-Ray Crystallography." *Nature* 468 (7324): 709–12. <https://doi.org/10.1038/nature09555>.
- Weaver, Scott C., and Naomi L. Forrester. 2015. "Chikungunya: Evolutionary History and Recent Epidemic Spread." *Antiviral Research* 120 (May): 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>.
- Weaver, Scott C, Jorge E Osorio, Jill A Livengood, Rubing Chen, T Dan, Scott C Weaver, Jorge E Osorio, Jill A Livengood, and Rubing Chen. 2016. "Chikungunya Virus and Prospects for a Vaccine" 0584 (April): 1087–1101. <https://doi.org/10.1586/erv.12.84>.
- White, Laura K, Tina Sali, David Alvarado, Evelina Gatti, Philippe Pierre, Daniel Streblow, and Victor R Defilippis. 2011. "Chikungunya Virus Induces IPS-1-Dependent Innate Immune Activation and Protein Kinase R-Independent Translational Shutoff □" 85 (1): 606–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00767-10>.
- Wilson de Melo Cruvinel<sup>1</sup> , Danilo Mesquita Júnior<sup>2</sup> , Júlio Antônio Pereira Araújo<sup>3</sup> , Tânia Tiekó Takao Catelan<sup>4</sup> , Alexandre Wagner Silva de Souza<sup>5</sup>, Neusa Pereira da Silva<sup>6</sup>, Luís Eduardo Coelho Andrade<sup>6</sup>. 2010. "Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos Da Imunidade Inata Com Ênfase Nos Mecanismos Moleculares e Celulares Da Resposta Inflamatória." *Rev Bras Reumatol* 50 (4): 434–61. <https://doi.org/10.1007/BF02166249>.
- Yoon, In Kyu, Maria Theresa Alera, Catherine B. Lago, Ilya A. Tac-An, Daisy Villa, Stefan Fernandez, Butsaya Thaisomboonsuk, et al. 2015. "High Rate of Subclinical Chikungunya Virus Infection and Association of Neutralizing Antibody with Protection in a Prospective Cohort in The Philippines." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (5): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003764>.
- Zawada, Adam M, Kyrill S Rogacev, Peter Winter, Rolf-r Marell, Danilo Fliser, and Gunnar H Heine. 2018. "SuperSAGE Evidence for CD14  $\geq$  CD16  $\geq$  Monocytes as a Third Monocyte Subset" 118 (12): 50–62.

<https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-326827>.This.

## 10. ANEXOS

### Projeto Dengue, Zika e Chikungunya.

### Projeto Imunologia Viral – FIOCRUZ



#### FICHA DE REQUISIÇÃO DE EXAME LABORATORIAL \*PREENCHER EM LETRA DE FORMA

PRONTUÁRIO:

Unidade de atendimento:		E-mail:	
Nome do paciente:			
Endereço:			
Bairro:	Município:	Estado:	
Telefone:	Data de nascimento:	Idade:	
Sexo: ( ) F ( ) M	Ocupação:	Gestante: ( ) SIM _____ semanas ( ) Não ( ) Microcefalia/Malformação	
Vacinado contra Febre Amarela? ( ) Sim – Data: ____/____/____ ( ) Não	Teve dengue antes? ( ) Sim – Data: ____/____/____ ( ) Não ( ) Não sabe		
Outras vacinas? _____			
<b>SUSPEITA:</b> ( ) DENGUE ( ) ZIKA ( ) CHIKUNGUNYA			
<b>DADOS CLÍNICOS</b>			
Data do início dos sintomas: ____/____/____			
Data da 1ª coleta: ____/____/____		Data da 2ª coleta: ____/____/____	
Espécime coletado: ( ) Soro ( ) Sangue ( ) Tecido especificar:			
<b>MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS</b>			
( ) Febre ____°C	( ) Vômitos	( ) Dor abdominal	
( ) Cefaléia	( ) Náuseas	( ) Artrite	
( ) Prostração	( ) Diarréia	( ) Volemia	
( ) Astenia	( ) Exantema	( ) Hiperemia conjuntival	
( ) Parestesia	( ) Edema	( ) Tontura/vertigem	
( ) Mialgia	( ) Prurido	( ) Tosse	
( ) Artralgia	( ) Epigastralgia	( ) Icterícia	
( ) Lombalgia	( ) Adenomegalia	( ) Alteração transaminases	
( ) Dor retro-orbitária	( ) Plaquetopenia		
( ) Anorexia	( ) Leucopenia		
<b>COMPLICAÇÕES – SINAIS DE ALARME</b>			
Ocorreu hospitalização: ( ) Sim ( ) Não		Data de internação: ____/____/____	
Nome do hospital:			
<b>NO CASO DE COMPLICAÇÕES ESPECIFICAR:</b>			
( ) Alterações neurológicas	( ) Plaquetopenia < 50.000/mm <sup>3</sup>	( ) Leucometria < 1.000/mm <sup>3</sup>	( ) Choque
( ) Disfunção cardiorespiratória	( ) Hemorragia digestiva	( ) Dor Abdominal persistente	( ) Alteração Sist. Nervoso Central
( ) Insuficiência hepática	( ) Derrames cavitários	( ) Ascite	
( ) Sangramento espontâneo	( ) Sangramento volumoso	( ) Vômitos persistentes	
( ) Hepatomegalia	( ) Derrame Pleural	( ) Derrames Pericárdio	
( ) Hipotensão Postural	( ) Hipotensão Arterial	( ) Hemoconcentração	( ) ÓBITO Data do óbito: ____/____/____
Outros:			
<b>MANIFESTAÇÕES HEMORRÁGICAS</b>			

<input type="checkbox"/> Prova do laço positiva	<input type="checkbox"/> Petéquias	<input type="checkbox"/> Gengivorragia	<input type="checkbox"/> Epistaxe
<input type="checkbox"/> Metrorragia			
<b>Exames laboratoriais solicitados:</b>			
<input type="checkbox"/> Sorologia	<input type="checkbox"/> RT-PCR* - Dengue – Zika (até o 5º dia doença após o início dos sintomas) Chikungunya (até o 8 dia de doença após o início dos sintomas)		
<input type="checkbox"/> Isolamento viral			
<b>COMORBIDADES</b>			
<input type="checkbox"/> Artrite reumatóide			
<input type="checkbox"/> Diabetes mellitus			
<input type="checkbox"/> DPOC			
<input type="checkbox"/> Asma brônquica			
<input type="checkbox"/> Hipertensão arterial			
<input type="checkbox"/> Doença cardíaca			
<input type="checkbox"/> Doença falciforme			
<input type="checkbox"/> Doença auto-imune			
<input type="checkbox"/> Tabagismo			
<input type="checkbox"/> Rinite			
<input type="checkbox"/> Doença Viral Crônica?	Quais? _____		
<input type="checkbox"/> Faz uso de medicamento contínuo?	Especificar: _____		
<b>Dados laboratoriais:</b>			
1º HT: _____%	1º Plaqueta: _____ mm <sup>3</sup>	Data: ____/____/____	
2º HT: _____%	2º Plaqueta: _____ mm <sup>3</sup>	Data: ____/____/____	
3º HT: _____%	3º Plaqueta: _____ mm <sup>3</sup>	Data: ____/____/____	
Anexar dados do hemograma e bioquímica			
<b>Outras informações:</b>			

**Requerente:**

\_\_\_\_\_  
Nome/Carimbo/CR

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Data de Coleta

**Entrevistador:**

**Data da entrevista:**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Instituição:** Fundação Oswaldo Cruz-IOC, Hospital Rio-Laranjeiras, Hospital plantadores de Cana.

**Projeto de Pesquisa:** Vírus DENGUE, ZIKA e CHIKUNGUNYA: uma abordagem multidisciplinar para a caracterização dos aspectos epidemiológicos, virológicos e imunológicos em apoio à investigação do impacto destas arboviroses no Brasil.

**Investigadores:** Prof. Dr. Paulo Vieira Damasco, DR LUIZ JOSE DE SOUZA, DRA. LUZIA MARIA DE OLIVEIRA PINTO, DRA. ELZINANDES LEAL AZEREDO, DRA. FLÁVIA BARRETO DOS SANTOS.

**Objetivo da Pesquisa:** ESTUDAR AS DOENÇAS DA DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA PARA MELHORAR OS TRATAMENTOS E AJUDAR O DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA EFICAZ.

Eu, \_\_\_\_\_ fui informado de que este estudo é para obter mais conhecimentos sobre minha doença, que se chama DENGUE. **MINHA PARTICIPAÇÃO SERÁ APENAS PARA DOAR SANGUE DURANTE OU APÓS MEU ATENDIMENTO MÉDICO.** Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas com esta doença.

O procedimento será o seguinte: **UM VOLUME DE 5 ML OU DE 20 ML SANGUE** será obtido por punção da veia do antebraço, no mesmo momento em que for coletado sangue **PARA DOSAGEM DE PLAQUETAS E HEMATÓCRITO NECESSÁRIOS PARA CONHECER E CONTROLAR A GRAVIDADE DO MEU ESTADO. SEREI SOLICITADO A DOAR 5 OU 20 ML SANGUE UMA VEZ APÓS A RECUPERAÇÃO (ENTRE 1 A 2 MESES) COM A FINALIDADE DE CONFIRMAR A NORMALIDADE DOS EXAMES LABORATORIAIS.**

**FOI-ME EXPLICADO QUE ESTA QUANTIDADE DE SANGUE REPRESENTA UMA PEQUENA PORÇÃO DO QUE POSSUO E SUA RETIRADA NÃO VAI ME PREJUDICAR.**

A retirada do sangue será feita por um enfermeiro ou técnico do Hospital Rio-Laranjeiras. Os possíveis desconfortos e riscos, se ocorrerem, são aqueles relacionados com a retirada de sangue, como dor local e/ou hematoma (rouxidão) no local da punção, com duração de 3 a 5 dias. Todos os cuidados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartáveis e álcool para assepsia local, entre outros. Quanto aos exames e procedimentos não foram identificados riscos até o momento.

Os resultados deste estudo serão relatados à minha pessoa e considerados confidenciais, podendo os mesmos ser divulgados na forma de comunicação científica. Entretanto não será permitida a minha identificação, o que garante a minha privacidade.

O pesquisador responsável colocou-me a par destas informações, estando à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver novas dúvidas. Também tenho toda liberdade para contactar os demais pesquisadores envolvidos neste estudo.

**MINHA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É INTERAMENTE VOLUNTÁRIA, E SOU LIVRE PARA RECUSAR A PARTICIPAR NO ESTUDO, OU ME RETIRAR EM QUALQUER FASE DA PESQUISA SEM QUE ISSO POSSA AFETAR OU PREJUDICAR O CUIDADO MÉDICO A QUE DEVO RECEBER.**

Recebi uma cópia deste termo de consentimento, e pela presente consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos acima sejam realizados na minha pessoa.

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

Eu, Responsável pelo menor acima identificado, autorizo sua participação, como voluntário (a) no presente projeto de pesquisa.

Data: \_\_\_\_\_

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

Assinatura : \_\_\_\_\_



Pesquisadores:



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR EM APOIO À INVESTIGAÇÃO DESTAS ARBOVIROSES NO BRASIL

**Pesquisador:** FLAVIA BARRETO DOS SANTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 57221416.0.1001.5248

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ  
FUNDACAO OSWALDO CRUZ

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.760.114

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma solicitação de Emenda ao projeto APROVADO, parecer Número 1.920.256, de 14 de fevereiro de 2017.

A pesquisadora responsável pede as seguintes alterações:

1. Inclusão do Objetivo Específico: INVESTIGAR O EFEITO ANTIVIRAL E/OU IMUNOMODULADOR DE COMPOSTOS ORIGINADOS DE PLANTAS MEDICINAIS FRENTE À INFECÇÃO PELOS ARBOVIRUS.

2. Inclusão da Pesquisadora Dra Patrícia Brasil e das pós-graduandas Raquel Curtinhas de Lima e Natália Gedeão Salomão na equipe participante.

3. Alteração do TCLE, Anexo I:

- Diante da inclusão da Dra Patrícia Brasil (INI/FIOCRUZ), o TCLE será modificado com a inclusão do seu nome e contato.
- Inclusão de coleta de amostra de urina e saliva em alguns casos, visto que já foi amplamente descrito a persistência viral nestes espécimes biológicos menos invasivos.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.760.114

- O TCLE foi ajustado com a inclusão da opção de autorização para armazenamento e utilização do material biológico coletado, visando uma maior praticidade ao paciente e diminuição do gasto com papel, por questões ambientais. Desta forma, o ANEXOIX (TERMO DE CONSENTIMENTO DE AUTORIZAÇÃO PARA O ARMAZENAMENTO E UTILIZAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO) foi excluído.
- Modificação do nome do Laboratório no cabeçalho, de Laboratório de Flavivírus para Laboratório de Imunologia Viral.

4. Nos Objetivos Específicos do DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, solicita-se a inclusão dos itens:

- (v) Desenvolver testes in-house de detecção e captura de antígeno NS1 recombinante de DENV, ZIKV e YFV em apoio à vigilância destas arboviroses no Brasil;
- (vi) Produzir aptâmeros para potencial utilização no diagnóstico específico de infecções por DENV e CHIKV em apoio a vigilância destas arboviroses no Brasil.

"Neste Projeto serão analisados casos suspeitos de dengue, chikungunya, zika e outras arboviroses recebidos por demanda espontânea no Laboratório de Flavivírus, IOC, FIOCRUZ, Laboratório de Referência Regional para o Ministério da Saúde e Laboratório de Imunologia Viral, IOC, FIOCRUZ, no período de Julho de 2016 a Dezembro de 2021. Os pacientes com sintomatologia compatível com dengue, chikungunya, zika ou

outras arboviroses atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto (UERJ), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) pela Dra Patrícia Brasil, Hospital Rio Laranjeiras pelo Dr Paulo Vieira Damasco, Hospital Dia Professora Esterina Corsini, na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande (MS) pelo Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha e no Centro de Referência em Dengue do Hospital dos

Plantadores de Cana, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro pelo Dr. Luiz José de Souza serão convidados a participar da pesquisa, mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A investigação dos casos suspeitos de gestantes com zika e casos de microcefalia, seguirão as recomendações do Ministério da Saúde (Brasil, 2016). Todos os casos suspeitos serão notificados. Para o diagnóstico de casos suspeitos de microcefalia, deverá ser realizado exame sorológico para dengue, chikungunya, sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes simples. Dengue: Para o isolamento e identificação dos DENV será utilizado o cultivo de células de mosquito Aedes albopictus clone C6/36 (Igarashi, 1978), associado à técnica de

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.760.114

imunofluorescência utilizando-se anticorpos monoclonais (Gubler et al., 1984) e RT-PCR por Lanciotti et al. (1992). Chikungunya: será realizado o MAC-ELISA e IgG anti-CHIKV de acordo com o CDC e Ministério da Saúde, ou kit Anti-CHIKV ELISA IgG/IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha) e RT-PCR por Collao et al. (2010). Zika: O RT-PCR por Lanciotti et al. (2008), IgM e IgG anti-ZIKV será realizado com Anti-ZIKV ELISA IgG/IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha) ou kit comercial registrado pela ANVISA. Sequenciamento e metagenômica: conforme descrito por dos Santos et al. 2002, Soni et al., 2013; Lanciotti et al (2008). A análise do sequenciamento será realizada utilizando o Programa Chromas (<http://www.technelysium.com.au/chromas14x.html>), a identidade da seqüência será determinada pelo uso do BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). O alinhamento das seqüências será realizado com CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) e a análise filogenética com o Programa MEGA 6. Estas análises serão realizadas na Plataforma de Sequenciamento, IOC/FIOCRUZ. Realização de análise histopatológica de casos fatais de DENV, ZIKV e CHIKV: Serão utilizadas amostras de tecidos de casos fatais humanos de dengue, Zika e chikungunya, obtidas de biópsias/necropsias e cedidas pelos nossos colaboradores. Avaliação da eficácia de moléculas candidatas à inibição da infecção por ZIKV em modelos de infecção in vitro: A avaliação de potenciais fármacos inibidores da NS1 será realizada pela triagem virtual, docking molecular e cálculos de energia livre, utilizando banco de dados como Drug Bank, Cambridge Structure Database e Zinc Database, programa DockThor3 e as configurações de menor energia de interação do complexo ligante-receptor serão realizadas através do método de integração termodinâmica. Obtenção e caracterização de nanopartículas com caráter Janus para potencial utilização em testes de diagnóstico precoce do dengue: Nanopartículas de ouro esféricas serão sintetizadas através da redução do sal HAuCl<sub>4</sub> (ácido cloroáurico) por citrato de sódio. Proposta de modelo de formação profissional para ACE e ACS: Três municípios de cada região de saúde (9 regiões) do estado do Rio de Janeiro serão convidados, via correspondência eletrônica, para participar do estudo. Os 27 municípios serão selecionados de acordo com o número de habitantes. Serão identificados municípios de grande, médio e pequeno porte.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar os aspectos clínico-epidemiológicos, virológicos e imunopatológicos de casos de dengue, chikungunya e zika em apoio ao conhecimento do impacto destas arboviroses no Rio de

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** [cepfiocruz@ioc.fiocruz.br](mailto:cepfiocruz@ioc.fiocruz.br)



Continuação do Parecer: 2.760.114

Janeiro e Brasil.

Objetivos Secundários:

VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA, VIROLOGICA E DIAGNOSTICO LABORATORIAL:

(i) Descrever os aspectos clínico-epidemiológicos, laboratoriais e imunológicos de casos de infecção pelos DENV, ZIKV, CHIKV e outras arboviroses ocorridos no RJ e Estados colaboradores, recebidos no Laboratório de Flavivírus, IOC/FIOCRUZ, Centro Referência Regional para o Ministério da Saúde e coletados a partir de colaborações estabelecidas pelo Laboratório de Flavivírus e pelo Laboratório de Imunologia Viral, IO/FIOCRUZ;

(ii) Realizar a vigilância dos genótipos circulantes e análise metagenômica do viroma dos arbovirus detectados,

(iii) Descrever o perfil epidemiológico dos DENV, ZIKV, CHIKV nas gestantes, nas microcefalias e nas complicações neonatais associadas à transmissão destes vírus;

(iv) Correlacionar a base de dados de notificações de doenças exantemáticas, microcefalia e resultados laboratoriais com o georreferenciamento estadual de DENV, ZIKV, CHIKV;

(v) Constituir pólo-sentinela de vigilância epidemiológica para dengue, zika e chikungunya no território de Manguinhos a fim de descrever a frequência das manifestações clínicas e laboratoriais das três arboviroses e a distribuição espaço-temporal dos casos no território;

(vi) Realizar o acompanhamento e investigação de gestantes com sintomatologia de ZIKV e casos de microcefalia pelo Centro de Referência de Dengue e Maternidade Referência do Município de Campos dos Goytacazes, RJ, por Hospitais e Maternidades sediados no estado do RJ e Estados colaboradores;

(vii) Promover a descentralização do diagnóstico de CHIKV e ZIKV para mais de um grupo de colaboradores possibilitando a melhoria da capacidade diagnóstica no RJ e Estados colaboradores;

(viii) Propor um modelo de formação profissional para ACE e ACS, com ênfase na territorialização,

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.760.114

visando à melhoria na qualidade do serviço no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

**ASPECTOS CLINICOS, FISIOPATOLOGICOS E VACINAS:**(i) Selecionar epítomos de células T e B mais imunogênicos em proteínas dos DENV, CHIKV e ZIKV por predição in silico e de acordo com os alelos de HLA mais frequentes dos pacientes recrutados; (ii) Determinar a carga viral de casos de infecção pelos DENV, CHIKV e ZIKV correlacionando-a com o quadro clínico; (iii) Quantificar níveis séricos de citocinas e quimiocinas em pacientes com DENV, CHIKV ou ZIKV e correlacionar com dados clínicos, hematológicos, bioquímicos; (iv) Realizar a análise histopatológica de casos fatais de DENV recebidos retrospectivamente e prospectivamente durante 30 anos e na disponibilidade de casos fatais por ZIKV e CHIKV; (v) Avaliar a interação vírus-hospedeiro do ZIKV em diferentes linhagens celulares in vitro;

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO:**(i) Avaliar por dinâmica molecular, o impacto da mutação P250L na estabilidade da NS1 dos flavivírus; (ii) Obter modelo de estrutura da NS1 do ZIKV e obter moléculas candidatas à inibição desta proteína; (iii) Avaliar a eficácia das moléculas candidatas à inibição da infecção por ZIKV em modelos de infecção in vitro em atuação conjunta com Laboratórios da Rede; (iv) Obter e caracterizar nanopartículas com caráter Janus para potencial utilização em testes de diagnóstico precoce do dengue baseados na NS1.(v)Desenvolver testes inhouse de detecção e captura de antígeno NS1 recombinante de DENV, ZIKV e YFV em apoio à vigilância destas arboviroses no Brasil; (vi) Produzir aptâmeros para potencial utilização no diagnóstico específico de infecções por DENV e CHIKV em apoio à vigilância destas arboviroses no Brasil.

**INVESTIGAR O EFEITO ANTIVIRAL E/OU IMUNOMODULADOR DE COMPOSTOS ORIGINADOS DE PLANTAS MEDICINAIS:** (i)Infectar monócitos humanos de doadores saudáveis, HuH-7 (hepatócitos), condrocitos (NHAC-kn), células endoteliais HMVEC com cepa brasileira de DENV, ZIKV e CHIKV; (ii) Investigar o efeito antiviral e/ou imunomodulador dos extratos obtidos de plantas medicinais na infecção "in vitro"

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

"Os possíveis riscos desse projeto serão: desconfortos relacionados com a retirada de sangue, dor ou rouidão no local da coleta. Com intuito de evitar esse risco utilizaremos pessoal treinado e capacitado para a realização de coleta de sangue. Em caso de rouidão os participantes da pesquisa serão avaliados pelo corpo médico e será fornecido os medicamentos para o tratamento

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.760.114

do hematoma. Deve ser considerado também a possibilidade de ocorrer estresse e constrangimentos na aplicação dos TCLEs e formulários, por isso contaremos com uma equipe treinada para aplicar os termos e formulários de forma com que os participantes não se sintam obrigados a participar da pesquisa e também sejam devidamente orientados com linguagem clara e adequada de todos os procedimentos submetidos as amostras de cada participante."

**Benefícios:**

"O Projeto proposto visa atender às demandas emergenciais de enfrentamento do dengue, zika e chikungunya no âmbito da Saúde Pública nacional e propõe uma abordagem multidisciplinar que contribua nas áreas da vigilância epidemiológica, clínica, diagnóstico laboratorial, fisiopatologia e desenvolvimento tecnológico."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante. Metodologia e equipe, de acordo com o apresentado, estão adequadas para atender os objetivos propostos na emenda.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram analisados os seguintes documentos:

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1) PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1007766 - Documento preenchido corretamente.

- Houve inclusão do objetivo específico "INVESTIGAR O EFEITO ANTIVIRAL E/OU IMUNOMODULADOR DE COMPOSTOS ORIGINADOS DE PLANTAS MEDICINAIS FRENTE À INFECÇÃO PELOS ARBOVIRUS.
- Houve inclusão do nome da pesquisadora Patrícia Brasil e das alunas de pós-graduação Raquel Curtinhas de Lima e Natália Gedeão Salomão na equipe do estudo.
- Houve a inclusão do itens "(v) Desenvolver testes in-house de detecção e captura de antígeno NS1 recombinante de DENV, ZIKV e YFV em apoio à vigilância destas arboviroses no Brasil; (vi) Produzir aptâmeros para potencial utilização no diagnóstico específico de infecções por DENV e CHIKV em apoio a vigilância destas arboviroses no Brasil, no objetivo DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO."

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.760.114

2) "CEPREDEDENGUE\_com\_ementa.doc" – Documento conforme, exceto por se nominado "ementa" e não "emenda".

Projeto na íntegra apresentado ao CEP.

Documento em formato word em papel timbrado com 33 páginas. As emendas solicitadas foram incluídas no projeto. .

3) "Justificativa\_ementa\_020518.docx" – Documento conforme, exceto por utilizar o termo "ementa" e não "emenda".

Carta de justificativa de pedido de emenda em formato word apresentada ao CEP assinada pela responsável pelo estudo proposto e datada de 02/05/2018. Documento em conforme

4) ANEXO\_I\_modificado.doc - Documento conforme.

TCLE intitulado "ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO COLETA DE AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA, direcionado aos participantes para obtenção de sangue, e/ou na urina, e/ou na saliva.

Alterações observadas no documento:

Inclusão do nome da pesquisadora Dra. Patrícia Brasil, assim como telefones de contato.

Inclusão do procedimento de coleta de amostra de urina e saliva.

Inclusão da autorização para armazenamento e utilização do material biológico coletado no próprio termo.

Modificação do nome do Laboratório no cabeçalho, de Laboratório de Flavivírus para Laboratório de Imunologia Viral.

5) ANEXO\_V\_modificado.doc- Documento em conformidade com as Resoluções do CNS em vigor no país. ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO COLETA DE AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EM CASOS DE NATIMORTOS, direcionado as mães para retirada de tecido de bebês nascidos mortos.

Foi incluído no termo o nome da pesquisadora Dra. Patrícia Brasil, assim como seus telefones de contato. Além disso, foi modificado o nome do Laboratório no cabeçalho, de Laboratório de Flavivírus para Laboratório de Imunologia Viral.

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 2.760.114

**Recomendações:**

Substituir nos documentos apresentados o termos "ementa" pelo termo correto, emenda.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A Emenda está em conformidade com as Resoluções do CNS vigentes.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP Fiocruz/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/2012, manifesta-se por APROVAR a Emenda ao projeto CAAE: 57221416.0.1001.5248, após a deliberação do Comitê na 239ª Reunião Extraordinária, comunicando que:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou nova emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

O participante de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Cabe ressaltar que a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1123193 E1.pdf	02/05/2018 14:27:41		Aceito

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.760.114

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	CEPREDEDENGUE_com_ementa.doc	02/05/2018 14:13:59	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	Justificativa_ementa_020518.docx	02/05/2018 13:42:34	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_V_modificado.doc	02/05/2018 13:42:03	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_I_modificado.doc	02/05/2018 13:40:58	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_VII_CEP_1609597_ACS.pdf	16/01/2017 23:12:17	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_VI_CEP_1639471.pdf	16/01/2017 23:12:01	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_II_CEP_HPC.pdf	16/01/2017 23:11:41	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_VIII_TERMOS_DE_CONFIDENCIALIDADE.pdf	16/01/2017 23:10:01	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	16/01/2017 23:08:52	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Outros	ANEXO_IV_QUESTIONARIO_GESTANTE.pdf	16/01/2017 23:07:42	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Anuencia_MS.pdf	16/01/2017 23:06:40	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTA_ANUENCIA_RIOLARANJEIRAS.pdf	16/01/2017 23:05:48	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIAIBEX.pdf	16/01/2017 23:05:26	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIACAMPOS.pdf	16/01/2017 23:05:07	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração do Patrocinador	OUTORGA_FAPERJ.pdf	16/01/2017 23:01:25	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio160117.pdf	16/01/2017 22:40:10	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Alteracoes160117.pdf	16/01/2017 22:37:04	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOIII.doc	16/01/2017 22:32:03	FLAVIA BARRETO DOS SANTOS	Aceito

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)**Bairro:** Manguinhos **CEP:** 21.040-360**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO**Telefone:** (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -  
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.760.114

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIO DE JANEIRO, 08 de Julho de 2018

---

**Assinado por:**

**Maria Regina Reis Amendoeira  
(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br