



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

**CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**BRUNA DE GOIS MACÊDO**

**AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DE CÉLULAS T REGULADORAS  
(Treg) EM FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM  
HUMANOS**

**JOÃO PESSOA – PB**

**2018**

BRUNA DE GOIS MACÊDO

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DE CÉLULAS T REGULADORAS  
(Treg) EM FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM  
HUMANOS

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Universidade Federal da  
Paraíba como requisito parcial para  
obtenção do grau de bacharel em  
Biotecnologia.

**ORIENTADORA:**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Tatjana Keesen de Souza Lima

**JOÃO PESSOA – PB**

**2018**

**Catálogo na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação**

M141a Macêdo, Bruna de Gois.

Avaliação das respostas de células T reguladoras (Treg)  
em fases aguda e crônica da chikungunya em humanos /

Bruna de Gois Macêdo. - João Pessoa, 2018.

86 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. CHIKV. 2. Célula T. 3. Chikungunya - Fase aguda e  
crônica. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia



#### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos seis dias do mês de junho de 2018, às 14:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente e composta pelos avaliadores 1. Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam (CCS/UFPB); 2. Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas (CBIOTEC/UFPB), a discente Bruna de Gois Macêdo, matrícula 11402060, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Avaliação das respostas de células T reguladoras (Treg) em fases aguda e crônica da Chikungunya em humanos**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente      Márcia Regina Piuvezam  
Presidente da Banca Examinadora      Avaliador 1

Bruna de Gois Macêdo      Sandra Rodrigues Mascarenhas  
Discente      Avaliador 2

João Pessoa/PB, 06 de junho de 2018.

Dedico este trabalho à minha família, pois em  
cada parte de mim existe uma parte deles, e  
neste trabalho existe tudo de mim

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, na sua forma mais pura, na sua forma de energia, na sua forma de lições, na sua forma de mensagens, na sua forma de paz, na sua forma de universo. Então primeiramente agradeço a Ele.

Gostaria também de agradecer aos meus pais. Cada abraço de vocês me dá forças para seguir conquistando meus objetivos. Obrigada por compartilhar meus sonhos e não medir esforços e renúncias para vivê-los. Minha vitória é inteiramente de vocês.

Meus irmãos, Oseas, Kamila, Gustavo e Juliana, muito obrigada por tudo que vocês representam para mim. Vocês me ensinaram a falar, ler e escrever. O apoio e amor de vocês é essencial para mim. Obrigada também à minha mãe adotiva, Tia Franci. Nunca esquecerei tudo o que você fez por mim.

A toda a minha família, muito obrigada! Avôs, tios, primos, sobrinhos e agregados. Vocês moram no meu coração e me inspiram com suas palavras.

Gostaria também de agradecer àqueles que não fazem parte da árvore genealógica mas que são minha família também, os meus amigos. Primeiramente aos meus amados amigos do LABIDIC, vocês são minha alegria e sem vocês nada seria possível. Agradeço aos que aqui estão e aos que já se foram. Gostaria de agradecer em especial às minhas amigas Bell, Fany, Ju e Cinthia. Bellzinha e Faniquete, esse trabalho é tão meu quanto de vocês, obrigada por tudo! Juzinha, obrigada por todos os incentivos! Cinthia linda, obrigada por ser minha orientação em dias de caos. Verdadeiramente não seria quem eu sou hoje sem a vida de vocês existir na minha.

Um grande obrigada também aos meus amigos de turma, em especial aos meus queridos Ícaro, Paulo e Malu. Obrigada por fazerem meus dias mais felizes dentro e fora da universidade. Amiga, o que seria de mim sem você? Haha

Gostaria de agradecer imensamente aos pacientes que mesmo passando por momentos de dor e desconforto, tão gentilmente cederam amostras para a realização da pesquisa. Eu espero profundamente que essa pesquisa possa ajudar de alguma maneira a vida de vocês.

Fátima, minha grande amiga e técnica supermaster do citômetro, você é um anjo na vida de muitas pessoas. Muito obrigada pelo cuidado, carinho e confiança que você tem por mim! Meu muito obrigada também aos demais funcionários da UFPB, que me contagiam com seus sorrisos e desejos de sucesso, em especial a Mônica, Dona Ivanir e Wellington!

Tatjana Keesen. Gostaria de te agradecer profundamente. Mais que minha orientadora, você é minha amiga. Te agradeço por ter confiado em mim, por ter gerado as oportunidades que tive, por não ser egoísta e me ensinar cada detalhe do seu conhecimento

pacientemente. Se eu alcancei voos que me alegrem tanto, você foi uma das pessoas que me ajudou a construir minhas asas. Sou muito grata a você.

Meu obrigada aos membros da banca examinadora por sua disponibilidade e contribuições. Obrigada a todos os colaboradores e professores que me auxiliaram por diversas vezes tanto nessa pesquisa quanto na minha formação em biotecnologista. Eternamente vocês serão lembrados na minha vida.

“Nadie puede detenerte si tú tienes fé,  
Lucha fuerte y sin medidas no dejes de creer  
Lo que hagas siempre hazlo por amor,  
Pon las alas contra el viento, no hay nada que perder  
No pares nunca de soñar, no tengas miedo a volar  
Vive tu vida.”

Lynda Thomas

## RESUMO

O vírus da Chikungunya (CHIKV), pertencente ao gênero *Alphaviridae* e à família *Togaviridae*, é transmitido por mosquitos vetores do gênero *Aedes sp.*, levando a uma doença caracterizada principalmente por febre alta, dor de cabeça, mialgia, erupção cutânea e dor articular. Sabe-se que diversas células do sistema imune inato e adaptativo agem a fim de promover a eliminação viral e retornar à homeostase do indivíduo, dentre elas as células T reguladoras (Treg). Essas células são caracterizadas por apresentarem diversos mecanismos de supressão do sistema imune. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas de células Treg e seus mecanismos em pacientes apresentando as formas aguda e crônica da doença Chikungunya. Para tal, amostras do sangue periférico de indivíduos controles (n=7), pacientes agudos (n=7) e pacientes crônicos (n=6) foram coletadas e avaliadas por citometria de fluxo para caracterizar as células Treg e marcadores como CD39, CD73, Granzima B, Perforina, PD-1, CTLA-4, INF- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ . Foi observado: 1) Diminuição da frequência de células Treg em pacientes agudos (5,46 /20.000 leucócitos) e crônicos (2,91 /20.000 leucócitos), comparados ao controle (12,71 Treg /20.000 leucócitos); 2) Diminuição da expressão de enzimas de clivagem de ATP extracelular (CD39/CD73) em células Treg de pacientes agudos e crônicos comparados ao controle; 3) Células Treg de pacientes agudos e crônicos apresentaram diminuição da produção de grânulos como Granzima B e Perforina quando comparados ao grupo controle; 4) As células Treg de pacientes agudos apresentaram diminuição de cerca de 50% da expressão de CTLA-4 quando comparadas ao controle, que é reestabelecida em pacientes apresentando a forma crônica da doença; 5) Além disso, o receptor PD-1 apresentava menor expressão na superfície de células Treg de pacientes agudos e crônicos comparados a indivíduos saudáveis; 6) A produção de INF- $\gamma$  pelas células Treg é inalterada em ambas as formas da doença comparadas ao controle; 7) A produção de IL-10 em pacientes agudos não apresenta alterações comparadas ao grupo controle, contudo as células Treg de pacientes crônicos produzem maiores frequências de IL-10 em comparação a forma aguda da doença; 8) Células Treg de pacientes em ambas as formas da doença Chikungunya apresentam a produção diminuída da citocina moduladora TGF- $\beta$  comparados ao grupo controle. Dessa forma, sugere-se que a diminuição de células T reguladoras na doença, e seus mecanismos contribuem para o favorecimento do *clearance* viral, porém, a manutenção da inflamação pode acarretar em danos celulares que relacionam-se a características clínicas mais graves da doença. Isso pode indicar que as células Treg apresentam papel essencial no desenrolar imunológico da patogenia da doença.

**Palavras-chave:** CHIKV; Célula T; Fase aguda; Fase crônica

## ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) belongs to the genus Alphaviridae and to the family Togaviridae, and it is transmitted by mosquito vectors of the genus *Aedes* sp., generating a disease characterized mainly by high fever, headache, myalgia, rash and joint. It is known that several cells of innate and adaptive immune system act in order to promote viral elimination and return to the homeostasis of the individual, such as regulatory T (Treg) cells. These cells are characterized by several mechanisms of suppression of the immune system. Thus, the aim of this work was to evaluate Treg cell responses and its mechanisms in patients presenting both acute and chronic forms of Chikungunya disease. To reach this aim, peripheral blood samples from controls (n = 7), acute patients (n = 7) and chronic patients (n = 6) were collected and evaluated by flow cytometry for characterization of Treg cells and markers such as CD39, CD73, Granzyme B, Perforin, PD-1, CTLA-4, INF- $\gamma$ , IL-10 and TGF- $\beta$ . It was observed: 1) Decrease in Treg cells frequency of acute (2,91 /20.000 leukocytes) and chronic (2,91 /20.000 leukocytes) patients compared to controls (12,71 Treg /20.000 leukocytes); 2) Decreased expression of extracellular ATP cleavage enzymes (CD39 / CD73) in Treg cells from acute and chronic patients; 3) Treg cells from acute and chronic patients presented a decreased production of granules such as Granzyme B and Perforin compared to control group; 4) Treg cells of acute patients showed a decrease of 50% in CTLA-4 expression, which is reestablished in patients presenting the chronic form of the disease; 5) In addition, PD-1 receptor was decreased on the Treg cell surface of acute and chronic patients compared to healthy group; 6) Production of INF- $\gamma$  by Treg cells did not change in both forms of the disease compared to controls; 7) Production of IL-10 in acute patients did not present alterations compared to control group, however the Treg cells of chronic patients produced higher frequencies of IL-10 compared to the acute form of the disease; 8) Treg cells from patients in both forms of Chikungunya disease decreased the production of the TGF- $\beta$ , a modulating cytokine, compared to controls. Thus, our results suggest that the decrease of regulatory T cells in the disease, and its mechanisms contribute to the favoring of viral clearance, however, the maintenance of inflammation can promote cellular damages that are related to severe clinical characteristics of the disease. This may indicate that Treg cells play a key role in the immune development of the pathogenesis of the disease.

**Keywords:** CHIKV; T cell; Acute phase; Chronic phase

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1.</b> Estrutura do vírus da Chikungunya. ....	21
<b>Figura 2.</b> Imagens dos mosquitos vetores <i>Aedes aegypti</i> (Esquerda) e <i>Aedes albopictus</i> (Direita).....	22
<b>Figura 3.</b> Ilustração dos países que apresentam ou apresentaram transmissões pelo vírus da Chikungunya.....	25
<b>Figura 4.</b> Estratégia de análise de células Treg. Avaliação de células Treg a partir de <i>Gate</i> na região de linfócitos, CD4+, CD25 <sup>high</sup> e FOXP3+.....	38
<b>Figura 5.</b> Número de células T reguladoras por 20.000 leucócitos circulantes dos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico. ....	42
<b>Figura 6.</b> Frequência de células T reguladoras expressando CD39, CD73 e CD39/73 dos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico. ....	43
<b>Figura 7.</b> Frequência de células T reguladoras expressando Perforina, Granzima B e Perforina/Granzima B dos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico.....	44
<b>Figura 8.</b> Frequência de células T reguladoras expressando PD-1 e CTLA-4 dos grupos control, CHIKV agudo e CHIKV crônico.....	45
<b>Figura 9.</b> Frequência de células T reguladoras expressando INF- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ dos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico. ....	46

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Reagentes e sequência para realização da transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya. .....	36
<b>Tabela 2.</b> Descrição de dados do grupo Chikungunya Aguda. A tabela demonstra a idade, o gênero, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o gênero Feminino e M o gênero Masculino. ....	40
<b>Tabela 3.</b> Descrição de dados do grupo Chikungunya Crônica. A tabela demonstra a idade, o gênero, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o gênero Feminino e M o gênero Masculino. ....	41
<b>Tabela 4.</b> Descrição de dados do grupo controle. A tabela demonstra a idade, o gênero, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o gênero Feminino e M o gênero Masculino. ....	41

## Lista de siglas e abreviaturas

**CHIKV** – Vírus da Chikungunya

**ORF** – *Open Reading frame* (Janela de abertura de Leitura)

**SINAN** – Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**IgG** – Imunoglobulina do tipo G

**IgM** – Imunoglobulina do tipo M

**PFU** – Unidade de formação de placas

**INF $\alpha$**  – Interferon do tipo  $\alpha$

**INF $\gamma$**  – Interferon do tipo  $\gamma$

**TH1** - Célula T *helper* 1 (Célula T auxiliary 1)

**TH2** - Célula T *helper* 2 (Célula T auxiliar 2)

**TH17** - Célula T *helper* 17 (Célula T auxiliar 17)

**RNA** – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

**IL-2**– Interleucina do tipo 2

**IL-10** – Interleucina do tipo 10

**IL-17**– Interleucina 17

**IL-15**– Interleucina 15

**CCL2**– Proteína quimiotática 1 do monócito

**NK** – Célula *Natural Killer*

**Treg** – Célula T reguladora

**CD4** – *Cluster Differentiation* 4

**CD8** – *Cluster Differentiation* 8

**CD39** – *Cluster Differentiation* 39

**CD73** – *Cluster Differentiation* 73

**PD1** – *Programmed Cell death* 1 (Proteína de morte celular programada 1)

**CTLA4**- *Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (Proteína 4 associada linfócito T citotóxico)

**PD-L1** – *Programmed death-ligand 1* (Ligante 1 de Proteína de morte celular programada 1)

**PD-L2** – *Programmed death-ligand 2* (Ligante 2 de Proteína de morte celular programada 1)

**TGF  $\beta$**  – Transforming Growth Factor  $\beta$  (Fator de transformação do crescimento  $\beta$ )

**GZmB** – Granzima B

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**qRT-PCR** – PCR quantitativo em tempo real

**PBS** – Tampão Fosfato-Salino

**FOXP3** – *Forkhead box P3*

**AMPc** – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

**LAP** – Latency-Associated Peptide (Peptídeo associado à latência)

**ELISA** – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	20
2.1 O vírus da Chikungunya .....	20
2.2 Ciclo de Transmissão .....	21
2.3 Epidemiologia.....	23
2.4 Manifestações clínicas .....	25
2.5 Diagnóstico .....	26
2.6 Imunologia.....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	32
3.1 Objetivo geral .....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	34
4.1 Considerações Éticas.....	34
4.2 Seleção de casos agudos crônicos e controles .....	34
4.3 Amostras clínicas .....	34
4.4 Controles Virais .....	35
4.5 Extração do RNA viral e Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya.....	35
4.6 Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos de Imunofluorescência visando a avaliação de células T reguladora através da expressão de marcadores de superfície e intracelulares.....	36
4.7 Anticorpos monoclonais (Mabs) .....	37
4.8 Estratégia de análise .....	37
4.9 Análise estatística .....	38

<b>5. RESULTADOS</b> .....	40
5.1 Características dos pacientes avaliados.....	40
5.2. Número de células T reguladoras circulantes em pacientes agudos, crônicos e controles .....	42
5.3. Avaliação de enzimas de clivagem purinérgica de células Treg em pacientes agudos, crônicos e controles .....	42
5.4. Avaliação do perfil de produção de grânulos pelas células Treg de pacientes agudos, crônicos e controles .....	44
5.5. Avaliação da expressão de receptores de regulação em células Treg de pacientes agudos, crônicos e controles.....	45
5.6. Avaliação da produção de citocinas pelas células Treg de controles e pacientes agudos e crônicos .....	46
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	57
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>GLOSSÁRIO</b> .....	73
<b>ANEXOS</b> .....	75
<b>APÊNDICES</b> .....	80

# **INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Durante décadas as arboviroses foram pouco relacionadas à casos de mortalidade e desabilidade no mundo, dessa forma, poucos estudos e políticas de saúde foram direcionados ao controle e tratamento dessas doenças (WILDER-SMITH et al., 2017). Contudo, a atual dinâmica de urbanização, globalização e mobilidade internacional favoreceram a emergência, nos últimos anos, de doenças transmitidas por artrópodes, notavelmente a Zika, Dengue, Febre amarela e Chikungunya, despertando o alerta mundial para essas infecções.

O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um vírus pertencente ao gênero *Alphaviridae* e à família *Togaviridae* (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017), sendo encontrado em regiões tropicais e subtropicais do planeta. Esse alfavírus é originário da África e foi primeiramente isolado em 1952 no Planalto Makonde da província do sul da Tanzânia, antigo Tanganyika (THIBERVILLE et al., 2013). O vírus é transmitido por mosquitos dípteros especialmente do gênero *Aedes*, destacando-se o *Aedes aegypti* em áreas urbanas e *Aedes albopictus* em áreas rurais, e o nome Chikungunya é derivado da língua Makonde, significa “aquele que se dobra”, usado para descrever tanto o vírus quanto a doença, que é altamente incapacitante e de sintomatologia grave.

A doença é caracterizada principalmente por febre alta, dor de cabeça, mialgia, exantema e dor articular (BURT et al., 2012). Juntamente com outros alfavírus, o CHIKV apresenta sua característica mais destacada, que é a capacidade artritogênica (PAL, 2015; WESLUVA OLIVIA et al., 2015). Na maioria dos pacientes os sintomas desaparecem em alguns dias, porém, outros apresentam dores articulares que podem persistir por anos, caracterizando um quadro de doença crônica.

Os mecanismos imunopatológicos envolvidos nas infecções aguda e crônica da Chikungunya e sua relação com as características clínicas dos pacientes ainda são pouco elucidados, especialmente no que diz respeito às interações hospedeiro-patógeno que garantem a evolução de um paciente para a cura ou a cronicidade da doença. Sabe-se que o vírus, primeiramente, infecta células residentes epiteliais como queratinócitos, melanócitos e fibroblastos (COUDERC et al., 2008 e PUIPROM et al., 2013), iniciando uma resposta imune local na tentativa de conter o vírus (SCHILTE et al., 2010). O vírus pode então disseminar-se para órgãos como

músculo, fígado, rins, coração e cérebro (COUDERC et al., 2008; KAM et al., 2009; COUDERC et al., 2012 e PUIPROM et al.).

Diversas células do sistema imune inato e adaptativo agem a fim de promover a eliminação viral e retornar à homeostase do indivíduo. Dentre essas células encontram-se células T CD4+ e T CD8+ que atuam em estágios iniciais e posteriores da infecção (WAUQUIER et al., 2010). As células T CD4+, especialmente, parecem apresentar uma participação crítica na sintomatologia relacionada a inflamações nas articulações (TEO et al., 2013 e TEO et al., 2015).

Outro subtipo celular da imunidade adaptativa são as células T reguladoras (Treg). Essas células são caracterizadas por apresentarem fenótipo CD4+ e a expressão de marcadores imunes de supressão, estando envolvidas em diversas imunopatologias de doenças infecciosas como Hepatite C (SPENGLER et al., 2007) e Vírus sincicial respiratório (FULTON et al., 2010), indicando sua relação com mecanismos de infecções virais, porém o papel dessas células em infecções agudas e crônicas da Chikungunya ainda não foi elucidado.

Considerando a importância desse subtipo celular na regulação imunológica, a hipótese que norteou este trabalho foi que os mecanismos de regulação de células Treg poderiam estar envolvidos na patógenese de pacientes infectados com o CHIKV contribuindo para o desenvolvimento do quadro da doença em fases aguda e crônica. Esse trabalho objetivou avaliar as respostas de células T reguladoras e seus mecanismos em pacientes apresentando as formas aguda e crônica da Chikungunya, utilizando a técnica de citometria de fluxo, demonstrando o perfil de marcadores característicos dessas células frente à infecção viral, caracterizando um trabalho pioneiro relacionado aos estudos imunológicos dessas doenças em seres humanos.

# **REFERENCIAL TEÓRICO**

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

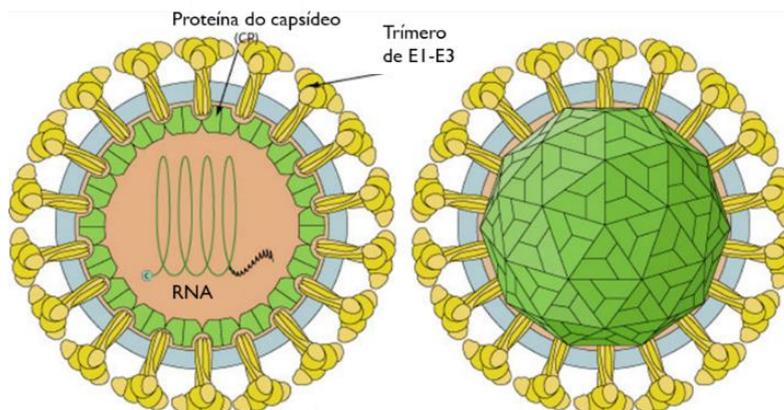
### 2.1 O vírus da Chikungunya

O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um vírus de envelope fosfolipídico, apresentando RNA de cadeia simples e de sentido positivo de aproximadamente 12 kb e contendo 2 sequências de leitura aberta (ORFs- *opening reading frames*) (SMITH et al., 2015). O vírion maduro de CHIKV contém duas glicoproteínas, a proteína de fusão E1 e a de ancoramento E2, a qual é gerada a partir de um precursor poliproteico p62-E1, pela clivagem proteolítica (SMITH et al., 2015) (Figura 1).

O genoma viral do CHIKV codifica 4 proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4) e cinco proteínas estruturais, sendo flanqueado por regiões não traduzidas com um tampão de N-metil guanosina 5' e uma cauda de poliA, entre as quais residem duas ORFs. A ORF no final 5' codifica 4 proteínas não estruturais (nsP1-nsP4), que formam o complexo de replicação envolvido na síntese de RNA genômico bem como o RNA subgenômico (PAL, 2015; WICHIT et al., 2017). A ORF no final 3' (PAL, 2015) codifica proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral, glicoproteínas do envelope E1 e E2 (SILVA et al., 2014), e dois pequenos produtos de clivagem, E3 e 6K (VU; JUNGKIND; LABEAUD 2017).

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

**Figura 1. Estrutura do vírus da Chikungunya.**



Fonte: <https://netnature.wordpress.com/2016/03/10/xxx-aedes-aegypti-e-a-epidemiologia-do-chikungunya/> (Adaptado)

## 2.2 Ciclo de Transmissão

Os ciclos de infecção do vírus da Chikungunya são classificados como ciclos silvestre e urbano de acordo com a região e a espécie do vetor de transmissão (NASCI, 2014). Dentre os mosquitos dípteros envolvidos na transmissão da doença, destaca-se o *Aedes aegypti* em áreas urbanas e *Aedes albopictus* em áreas rurais (HONÓRIO et al., 2015) (Figura 2). O ciclo silvestre, com sua primeira aparição no continente africano, é um ciclo zoonótico que envolve padrões semelhantes ao de outras arboviroses, como a febre amarela, no qual o vírus é transmitido a um mosquito vetor do gênero *Aedes spp* através do repasto sanguíneo em primatas não humanos e roedores infectados com o vírus, em seguida, caso o mosquito realize o repasto sanguíneo em um hospedeiro não infectado, o mesmo poderá vir a ser contaminado (KOGA, 2017).

Em contrapartida, o ciclo urbano inicia-se quando o vírus encontra, em áreas previamente não ocupadas pelo mesmo, situações favoráveis de proliferação, especialmente em mosquitos adaptados a áreas urbanas como o *Aedes aegypti*. Esses mosquitos vivem em áreas domésticas ou peri domésticas, e por sua vez, entram em contato com humanos, iniciando o processo de infecção na realização do repasto sanguíneo a um indivíduo não infectado (THIBERVILLE et al., 2013). Após a infecção, o tempo de incubação varia de 2-12 dias após o repasto sanguíneo (DELISLE et al., 2015).

Os humanos funcionam como reservatório durante períodos epidêmicos, enquanto em períodos inter-epidêmicos, outras espécies são utilizadas como hospedeiros, como macacos, roedores e pássaros (THIBERVILLE et al., 2013). Para adquirir uma transmissão eficiente, diversos fatores envolvendo os hospedeiros, os vetores, o vírus e condições ambientais devem convergir (VEGA-RÚA et al., 2014).

**Figura 2. Imagens dos mosquitos vetores *Aedes aegypti* (Esquerda) e *Aedes albopictus* (Direita).**



Fonte: <https://www.zikavirusdiseases.com/the-zika-virus-mosquitoes/>

Relacionado à infecção, esta é iniciada após a inoculação do vírus por mosquitos fêmeas infectadas através da via intradermal em capilares subcutâneos. O vírus da Chikungunya possui um ciclo de replicação semelhante a outros alfavírus, iniciando a replicação imediatamente após a internalização do vírus nas células permissivas da pele, como macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. A ligação da proteína do capsídeo E1 com receptores celulares leva a fusão da partícula viral com a membrana da célula hospedeira (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015) resultando na internalização viral por endocitose (LEE et al., 2013; THAA et al., 2015). Em seguida, as partículas virais são envolvidas por endossomas iniciais, a partir dos quais o capsídeo viral é liberado no citosol pela formação de poros de fusão (LEE et al., 2013).

O último processo é desencadeado pelo ambiente de baixo pH no endossoma que induz uma mudança irreversível na conformação da glicoproteína e uma dissociação dos heterodímeros E2/E1, seguidos de trimerizações E1 (WICHIT et al., 2017). A síntese do RNA viral acontece em complexos localizados próximo à membrana plasmática (THAA et al., 2015). As proteínas E1 e E2 são traduzidas no

retículo endoplasmático, transportadas e processadas pelo Complexo de Golgi e, finalmente, transportadas para a membrana plasmática onde ocorre o surgimento do vírus (WICHIT et al., 2017).

### 2.3 Epidemiologia

O CHIKV é um alfavírus originário da África, primeiramente isolado em 1952 no Planalto Makonde da província do sul da Tanzânia, antigo Tanganyika (THIBERVILLE et al., 2013). Após o isolamento do vírus, em 1953 sabe-se que o mesmo permaneceu circulante em ciclos silvestres na África, sendo a primeira re-emergência documentada com sua introdução no sudeste asiático e na Índia, no ano de 2005, instalando-se em um ciclo esporádico de transmissão urbana que permanece atualmente (HONÓRIO et al., 2015; MORRISON; PLANTE, 2016; PRESTI et al., 2016). Esses surtos documentados estão associados a mutações no genoma viral do CHIKV que facilitaram a replicação do vírus em mosquitos *Aedes albopictus* (THIBERVILLE et al., 2013).

Em 2004, no Quênia, a segunda re-emergência do vírus ocorreu atingindo diversas ilhas do Oceano Índico, Índia e sudeste asiático. No ano de 2006, o vírus atingiu as Ilhas La Réunion, na África, sendo essa epidemia estudada por muitos pesquisadores devido ao surgimento de mutações virais levando a uma transmissibilidade mais eficaz pelo *Ae. Albopictus* (HONÓRIO et al., 2015; FROS; PIJLMAN, 2016). Em outubro de 2013, o CHIKV alcançou o continente americano através do Caribe, resultando em milhares de infecções. Em maio de 2014 o Caribe apresentava mais de 100.000 suspeitos e 4.000 casos laboratoriais confirmados, e durante as duas semanas epidemiológicas seguintes, o número de casos reportados foi dobrado (CDC, 2017; SLAVOV et al., 2015).

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

notificação e investigação em um banco de dados nacional denominado SINAN (Sistema de informação de agravos de notificação).

As fichas de cadastro utilizadas na notificação dessas doenças de agravo contêm informações importantes para estratégias epidemiológicas como sexo, área residencial (urbano ou rural), estado e município de residência, data dos primeiros sintomas, município, estado e país da infecção (para determinação de casos autóctones), além disso, informações relacionadas às características clínicas dos pacientes (SINAN, 2017). O SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) objetiva registrar os dados sobre agravos de notificação em todo o território nacional, fornecendo informações para análise do perfil da morbidade e contribuindo, desta forma, para a tomada de decisões em nível municipal, estadual e federal.

Em 2014, a primeira transmissão autóctone foi detectada no Brasil, na cidade de Oiapoque (Amapá) (HONÓRIO et al., 2015). O Brasil era um país considerado “virgem” para o vírus da Chikungunya, o que indica que os habitantes não apresentavam memória imunológica para o mesmo. Além desse fator, suas características climáticas e ambientais associadas à ineficácia do controle dos mosquitos do gênero *Aedes*, garantiram que o vírus da Chikungunya encontrasse no Brasil um cenário de alta receptividade a sua disseminação.

Ao longo de 2014, 2.772 casos de CHIKV foram confirmados, distribuídos em seis Unidades Federativas: Amapá (1.554 casos), Bahia (1.214), Distrito Federal (2), Mato Grosso do Sul (1), Roraima (1) e Goiás (1). No ano de 2016 foram registrados no país 271.824 casos prováveis de febre Chikungunya (taxa de incidência de 133,0 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.829 municípios, dos quais 151.318 (55,7 %) foram confirmados, ocorrendo 196 óbitos (SVS, 2017). Já no ano de 2017, até a Semana Epidemiológica 4, foram registrados 3.754 casos prováveis de febre Chikungunya e uma taxa de incidência de 1,8 caso/100 mil hab., sendo 564 (15,02 %) casos confirmados, números muito menores se comparados aos dados de anos anteriores (SVS, 2017).

**Figura 3. Ilustração dos países que apresentam ou apresentaram transmissões pelo vírus da Chikungunya.**



Fonte: <http://infectologiabr.blogspot.com.br/2014/11/chikungunya-duas-linhagens-virais.html> (Adaptado)

#### 2.4 Manifestações clínicas

A infecção pelo CHIKV acarreta, em sua maioria, em manifestações sintomatológicas. O primeiro sintoma relatado da doença Chikungunya é a febre alta e abrupta após os dias 2 a 7 de infecção pelo vírus (WESULA OLIVIA et al., 2015). Além da febre, outras complicações podem acometer os indivíduos infectados, como erupções cutâneas, artralgia e mialgia (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012).

Os sintomas mais conhecidos e incapacitantes desta infecção estão relacionados à artrite e a artralgia que geralmente são resolvidas de 1 a 3 semanas após o início dos sintomas, porém algumas vezes esses sintomas podem persistir por meses ou anos caracterizando a doença crônica (CHANG et al., 2014). Essa artralgia acomete várias articulações do indivíduo, sendo assim denominada poliartralgia (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017). As articulações mais comumente envolvidas são as articulações das extremidades e dos joelhos, no entanto outras articulações também são afetadas (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012; ZEANA et al., 2016). Os pacientes agudos também apresentam sintomas como fadiga, dores musculoesqueléticas, náuseas, vômitos e conjuntivite (MCCARTHY; MORRISON, 2016; VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017).

Alguns dos pacientes, cerca de 40 a 80% dos pacientes agudos, evoluem para casos crônicos (WIM et al., 2010 e MANIMUNDA et al., 2010). Esses pacientes

apresentam a persistência de dor nas articulações, artralgia, inchaço e mialgia, além de complicações como desgaste ósseo, inflamação nos tendões e estafa (ARROYO-ÁVILA e VILÁ, 2015).

Essa doença febril pode levar a sérias complicações e possui fatalidade em alguns casos. Complicações neurológicas foram relatadas em um surto em 2006 na Ilha de La Réunion e em um surto na Índia. Dentre as complicações foram descritas a Encefalite e síndrome de Guillain-Barré. Além dessas, outras complicações graves da CHIKV incluem miocardite e hepatite (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017)

Essas complicações podem ainda ser exacerbadas a depender da idade dos indivíduos acometidos. Em um surto de infecção de por CHIKV no ano de 2006 em Ahmedabad, na Índia, dos 90 casos relatados, 18 foram fatais, das quais 15 apresentavam 60 anos ou mais (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017).

## 2.5 Diagnóstico

Diversos testes diagnósticos são aplicados para a detecção de infecções pelo vírus da Chikungunya. Alguns deles partem da premissa de detecção do vírus, de componentes virais, como antígenos e ácidos nucleicos, já outros, da detecção de componentes da resposta imune humana do hospedeiro ao vírus (HUNSPERGER et al., 2014; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015;). A escolha do teste varia de acordo com o propósito do mesmo, e dos recursos disponíveis para sua realização. Os testes diagnósticos utilizados para determinação da infecção pelo vírus da Chikungunya incluem análises clínico-epidemiológicas, a detecção viral, imunoenaios e detecção de material genético.

As *análises clínico-epidemiológicas* levam em consideração a avaliação de características clínicas dos pacientes como sinais, sintomas e exames, associado a avaliação epidemiológica de ambientes em que o paciente esteve inserido. Dessa forma, a apresentação de sintomas característicos da Chikungunya associados à presença do indivíduo em áreas endêmicas ou epidêmicas para o CHIKV, caracteriza um paciente como um paciente suspeito de infecção pelo CHIKV.

Já a *detecção viral* é caracterizada pelo isolamento dos vírus presentes no sangue, soro, plasma e tecidos do hospedeiro. As amostras são inoculadas em meios de cultura seletivos, e caso haja o crescimento do vírus, o diagnóstico é considerado positivo. Apesar de altamente específico, o teste exige o uso de

laboratório de segurança nível 3 sendo essa uma característica limitante do processo (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). Esses laboratórios destinam-se ao trabalho com agentes de risco biológico da classe 3, ou seja, com microrganismos que acarretam elevado risco individual e baixo risco para a comunidade. O uso do mesmo necessita de treinamentos rigorosos, o uso de vestimenta específica, além de exigir instalações físicas especiais (SANGIONI et al., 2013).

Além do isolamento viral, o *teste de imunoenensaio* também é amplamente realizado, em âmbito clínico e acadêmico, sendo um de seus principais representantes o teste ELISA. Este ensaio é capaz de detectar anticorpos IgM e IgG em soro de pacientes infectados por meio de ensaios imuno-absorventes de captura por ligação de anticorpo. A detecção de infecção por Chikungunya utilizando imunoenensaio permite a identificação de infecção aguda (detecção de IgM) e de prévia infecção pelo vírus (detecção de IgG) (REDDY et al., 2012; PRAT et al., 2014; SOH et al., 2015).

A *detecção de material genético viral* também é um método diagnóstico aplicado para infecções por Chikungunya. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é capaz de realizar a amplificação de regiões do genoma viral do sangue e soro de pacientes infectados, porém, o mesmo só se aplica caso o paciente ainda apresenta vírus circulantes. Esse tipo de diagnóstico é definitivo, porém depende da viremia dos pacientes assim como o teste de isolamento viral. Apesar de ser um limitante, a viremia não parece ser um problema para diagnósticos em infecções pela Chikungunya, isso porque o vírus da Chikungunya apresenta alta persistência viral em humanos, diferente do vírus da zika, por exemplo, na qual a viremia é transiente e o diagnóstico por PCR não é eficaz após os primeiros dias de infecção (PETERSEN et al., 2016).

## 2.6 Imunologia

Após a inoculação intradermal do vírus a partir do repasto sanguíneo de um mosquito fêmea, o CHIKV adentra capilares subcutâneos e inicia sua replicação em fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (PETITDEMANGE et al., 2015). Apesar das respostas anti-virais iniciais do hospedeiro, o mesmo rapidamente se distribui pelo sistema circulatório. Altas taxas de replicação viral culminam a uma taxa de cerca  $10^8$  PFU/mL de plasma (BAUTISTA-REYES et al., 2018) apresentando

o pico de infecção após 1 ou 6 dias do início dos sintomas (THIBERVILLE et al., 2013). Assim como em infecções virais diversas, a fase aguda da Chikungunya é acompanhada por respostas iniciais de IFN- $\alpha$  (HOARAU et al., 2010). As respostas relacionadas ao perfil de citocinas TH1 são essenciais para promover a ativação celular no combate ao patógeno, porém, também é responsável pela causa de injúrias teciduais (PETITDEMANGE et al., 2015).

A persistência dos sintomas parece ser uma consequência direta da infecção viral e das respostas imunológicas pró-inflamatórias (TSETSARKIN et al., 2014 e HOARAU et al., 2010). Os sinais de fase aguda normalmente são resolvidos de 1 a 3 semanas após o início dos sintomas, porém, a artralgia pode persistir por meses e até mesmo anos em alguns pacientes (PETITDEMANGE et al., 2015). É plausível que o CHIKV persista em sítios imunoprivilegiados, inflingindo danos diretos ao tecido sinovial, de fato, Hoarau e colaboradores (2010) evidenciaram a persistência de antígenos virais e RNA em tecidos sinoviais de pacientes com artralgia crônica, e a persistência foi associada à expressão de IFN- $\alpha$ , IL-10 e CCL2.

As células da imunidade inata como células *Natural killer* (NK) constituem a primeira linha de defesa contra uma variedade de infecções virais, incluindo a Chikungunya, além de contribuir com mecanismos imunopatológicos pela infiltração em tecidos sinoviais e manutenção de um ambiente inflamatório que contribuem para o desenvolvimento de sintomas de artralgia (HOARAU et al., 2010). Além das células NK, os monócitos/macrófagos apresentam papel fundamental na patologia da infecção pelo CHIKV, agindo como um reservatório para o vírus e parecem participar de sinalizações do controle da apoptose e do INF- $\alpha$ . Além disso, monócitos/macrófagos infectados migram para tecidos sinoviais, contribuindo para o desenvolvimento de processos inflamatórios (PETITDEMANGE et al., 2015).

A imunidade adaptativa também participa da imunopatologia da Chikungunya. Anticorpos naturais anti-CHIKV de isotipos IgM e IgG foram identificados em pacientes em diversos estágios da doença. Anticorpos anti-CHIKV são capazes de promover proteção inicial e o controle da disseminação do vírus pela neutralização direta e ativação do sistema complemento (KAM et al., 2012).

Os estudos relacionados ao envolvimento de células T na Chikungunya ainda são recentes. Em estágios iniciais da infecção, é observada diminuição de valores de frequência e número total de células T comparado a controles, que retorna a valores basais em cerca de dois meses (PETITDEMANGE et al., 2011). As células

remanescentes, contudo, apresentam-se como importantes efetoras durante a infecção viral, ambas as células T CD4+ e T CD8+ são requeridas para a eliminação de células infectadas (NG, 2017). As células T CD8+ parecem dominar os primeiros estágios da doença, com as células T CD4 atuando tardiamente (WAUQUIER et al., 2010). Células T CD4+ mas não T CD8+ são detectadas em tecidos sinoviais de pacientes com inflamação crônica (HORAU et al., 2010), além de células de perfil TH17 serem relatadas na patogênese de diversas infecções por arbovírus, bem como na artrite reumatóide (NG, 2017).

Mecanismos regulatórios que silenciam as respostas inflamatórias são requeridos para a manutenção da homeostase do organismo. Células T regulatórias (Treg), são uma subpopulação de células T CD4+ que mantém a tolerância imunológica e estão envolvidas em doenças autoimunes e infecciosas (DHAZE et al., 2015 e BELKAID et al., 2007). A patologia da Chikungunya prevê o estabelecimento desenfreado de respostas inflamatórias, caracterizando dessa forma uma desregulação da inflamação em fases agudas da doença e crônicas da doença (NG 2017).

As Tregs caracterizam uma subpopulação de linfócitos T CD4 as quais expressam o receptor de IL-2 (CD25) e o fator nuclear FOXP3. Essas células induzem a supressão das células T efetoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica a antígenos próprios e não-próprios por diversos mecanismos (MELO e CARVALHO, 2009).

O primeiro mecanismo descrito das Treg está no consumo do IL-2, uma citocina responsável pela proliferação celular. A alta expressão do receptor CD25 promove o consumo do IL-2 disponível no microambiente, diminuindo dessa forma a proliferação de células efetoras e favorecendo o desenvolvimento de células Treg (SHEVACH, 2009).

Em adição, as células Treg apresentam a regulação a partir de receptores específicos como PD-1 e CTLA-4 que caracterizam o contato célula-célula. O CTLA-4 é uma molécula que apresenta alta afinidade de ligação aos receptores B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Devido à alta afinidade de ligação, essa molécula se sobrepõe à atividade do receptor CD28, antagonizando, dessa forma, o segundo sinal mediado por esse receptor e anulando assim o sinal de ativação das células T efetoras (KAUFFMAN et al., 2007 e RUDD et al., 2009). O PD-1, por sua vez, é

expresso em diversas células T ativadas e ao realizar ligação nos receptores PD-L1 e PD-L2 presente em diversos leucócitos como linfócitos e monócitos, promove anergia, apoptose e exaustão celular (CURRAN et al., 2010).

A produção de grânulos e citocinas também são mecanismos utilizados pela Treg para promover imunomodulação. A IL-10 é uma citocina de supressão geral que apresenta papéis importantes na regulação de respostas imune contra infecções, especialmente relacionados à inibição de ativação de células apresentadoras de antígeno (MESCOUTO e CARVALHO, 2009). Já o TGF- $\beta$  é uma citocina de papel pleiotrópico em múltiplos tipos celulares afetando diversos processos biológicos, incluindo respostas imunes. Essa molécula promove a regulação de células T, além de garantir a manutenção de células Treg periféricas (LI et al., 2008).

Granzima B e perforina são enzimas presentes nos grânulos sintetizados por diversos tipos celulares, incluindo as células Treg, sendo utilizadas pelas mesmas como um mecanismo de regulação através da indução de apoptose em células específicas (LORDE et al., 2003).

Além desses mecanismos, as células Treg expressam em sua superfície moléculas responsáveis pela clivagem de ATP extracelular, as Ntpdases como o CD39, além de enzimas de clivagem de mediadores purinérgicos como as ectonucleotidases CD73. Juntas elas promovem a formação de adenosina (MELO; CARVALHO, 2009). Esta, por sua vez, induz a diferenciação de células Treg a partir da ligação em receptores A2, além de promover efeitos supressores em células T efetoras. Dessa forma, a adenosina atua como uma molécula anti-inflamatória mediadora de supressão (HASKÓ et al., 2008; GREGORI; GOUDY; RONCAROLO, 2012).

Diante do exposto, o trabalho avaliou células Treg e seus mecanismos nas infecções aguda e crônica causada pelo vírus da Chikungunya, em pacientes provenientes do Hospital Universitário Lauro Wanderley e da Unidade de Pronto atendimento do Cais do Cristo (PB/Brasil).

**OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas de células T reguladoras e seus mecanismos de ação em pacientes apresentando as formas aguda e crônica da doença Chikungunya.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o número de células T reguladoras no sangue periférico de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya na fase aguda e crônica da doença, comparado a indivíduos saudáveis;
- Avaliar a expressão das enzimas CD39 e CD73, e dos receptores PD-1 e CTLA-4 em células Treg de pacientes agudos e crônicos;
- Avaliar a produção das citocinas IL-10, TGF- $\beta$  e INF- $\gamma$ , e dos grânulos contendo as enzimas perforina e granzima pelas células Treg de pacientes agudos e crônicos.

**METODOLOGIA**

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Considerações Éticas

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em pesquisa- CONEP (CAAE: 59833416.6.0000.5183), estando enquadrada no projeto intitulado “Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue” (ANEXO 1), e todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste estudo foram esclarecidos sobre a importância do trabalho e participaram voluntariamente da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO 2).

### 4.2 Seleção de casos agudos crônicos e controles

Indivíduos apresentando sinais e sintomas compatíveis com infecção por Chikungunya, com até 5 dias do início da sintomatologia, provenientes do Estado da Paraíba (PB-Brasil) foram selecionados para participar do projeto, sendo enquadrados no grupo CHIKV A (n=7). Além disso, pacientes apresentando infecção prévia por CHIKV (n=6), no mínimo 6 meses após o início dos sintomas, e apresentando sintomatologia característica de Chikungunya crônica foram recrutados e enquadrados no grupo CHIKV C. Indivíduos saudáveis (n=7), sem infecções prévias por ZIKV, DENV ou CHIKV e sem doenças crônicas ou uso recente de medicamentos foram selecionados e enquadrados no grupo CTL.

### 4.3 Amostras clínicas

As amostras sanguíneas utilizadas nesse estudo foram provenientes do hospital Hospital Materno Infantil Joao Marsicano - Bayeux e da Unidade de Pronto Atendimento do Cristo Redentor (UPA-Cristo), sendo coletadas e processadas para obtenção de soro e sangue total no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (João pessoa – PB/Brasil) visando a tipagem viral por métodos moleculares (qRT-PCR) em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (RN-Brasil). Essas amostras foram coletadas em tubos heparinizados e sem anti-coagulante e, em fluxo

estéril, sendo 1mL de amostras de soro (Tubo sem anti-coagulante) e sangue total (tubo heparinizado) transferidas para eppendorfs e congelados em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*, seguido do freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  no dia posterior, sendo assim mantidas até o momento de sua utilização. Todas as amostras foram associadas a fichas de identificação e dados de coleta em relação ao início da doença e características clínicas dos pacientes. Em adição, amostras de sangue periférico desses pacientes foram coletadas para realização de análises de células Treg e seus fenótipos pela técnica de citometria de fluxo.

#### 4.4 Controles Virais

Os controles positivos (pacientes infectados e confirmados) CHIKV foram previamente isolados de pacientes infectados no Estado da Paraíba e do Rio Grande do Norte, pelos Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas da Universidade Federal da Paraíba e pelo Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

#### 4.5 Extração do RNA viral e Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya

O RNA viral das amostras de soro e sangue foi extraído através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, para a realização da técnica de q-PCR. O protocolo da PCR em tempo real utilizava a sonda TaqMan<sup>®</sup> para a identificação do vírus da chikungunya, baseado no protocolo proposto por Lanciotti et al., 2007. Para tal, uma mistura de reagentes descritos na tabela 1 foi utilizado, sendo obtido um volume final de 20 $\mu\text{l}$ , do mix dos reagentes e RNA, por tubo. Esses tubos foram transferidos para o termociclador de qPCR e a placa foi submetida aos parâmetros de termociclagem: (95 $^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos)- transcrição reversa; (95 $^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos)- Inativação da transcriptase reversa; (95 $^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos)- desnaturação do DNA; (60 $^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos)- Anelamento, por 40 ciclos subsequentes.

**Tabela 1. Reagentes e sequência para realização da transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya.**

Reagentes	Sequência	µl/tubo
TaqMan FAST Virus 1 Step Master Mix		2,5
Primer CHIKV 6856 F	5' TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA 3'	0,4
Primer CHIKV 6981 R	5' TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC 3'	0,4
Sonda CHIKV 6919 P	FAM 5' AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG 3'	0,4
dH <sub>2</sub> O		11,3
RNA		5

Fonte: Gomes, 2017

#### 4.6 Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos de Imunofluorescência visando a avaliação de células T reguladora através da expressão de marcadores de superfície e intracelulares

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue periférico em tubos vacutainer contendo heparina de indivíduos saudáveis não infectados (Controles – n=7), Pacientes Chikungunya agudos (CHIKV A- n=7) e paciente Chikungunya crônicos (CHIKV C – n=6). Os Leucócitos foram obtidos através de lise de hemácias (Solução de Lise, BD) e as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS 1x), sendo centrifugadas a 200 x g, 4°C, 10 min. Os leucócitos obtidos foram ressuspensos em um volume de 1 mL e utilizados para análises biológicas.

Utilizando-se placa estéril de 96 poços, 25 µL de suspensão de células em uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  foram adicionadas aos poços com 175 µL de RPMI suplementado. Em seguida, foi adicionada aos poços brefeldina A (1mg/ml), a qual durante as 4 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, agiu sobre a estrutura do complexo de Golgi impedindo exportação de proteínas para o meio extracelular. Ao final das quatro horas, a placa foi submetida a centrifugação por 10 minutos (200 x g, 4°C) e o sobrenadante foi desprezado, sendo as células suspensas por agitação. Em seguida foram adicionados os anticorpos de superfície, já diluídos, conforme titulação padronizada na fase de padronização dos reagentes, em um volume final de 40µL. Após adição dos anticorpos, a placa foi incubada a 4°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Ao fim da incubação, as células foram lavadas utilizando 150 µL de PBS gelado em cada poço. A placa foi novamente submetida à centrifugação por 10 minutos (200 x g, 4°C), seguida da retirada do sobrenadante e suspensão de células por agitação. 100µL de PBS e 100µL de solução de formaldeído 4% foram utilizadas para a fixação por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após remover a solução de fixação por centrifugação e lavar as células com 150µL de PBS, a permeabilização celular foi realizada utilizando solução de saponina 0,5% à temperatura ambiente em incubação por 10 minutos. A placa foi então centrifugada por 10 minutos (200 x g, 4°C), seguida de retirada do sobrenadante e adição de 40µL da solução de anticorpos intracelulares adequadamente diluídos em solução de saponina 0,5%. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas, por centrifugação adicionando a cada poço, 150µL da solução de saponina. Esta operação foi repetida duas vezes, e por último as células foram lavadas em tampão Wash B (PBS/BSA). Finalmente, após desprezar o sobrenadante e agitar a placa, as células foram diluídas em wash B. O volume final de 200µL de solução contendo as células marcadas será transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo FACSCANTOII (Becton & Dickinson). As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até a leitura no citômetro. Durante a aquisição dos dados foram coletados 70.000 eventos por tubo. Os dados coletados foram analisados utilizando o programa de computador Flowjo (Tree Star).

#### 4.7 Anticorpos monoclonais (Mabs)

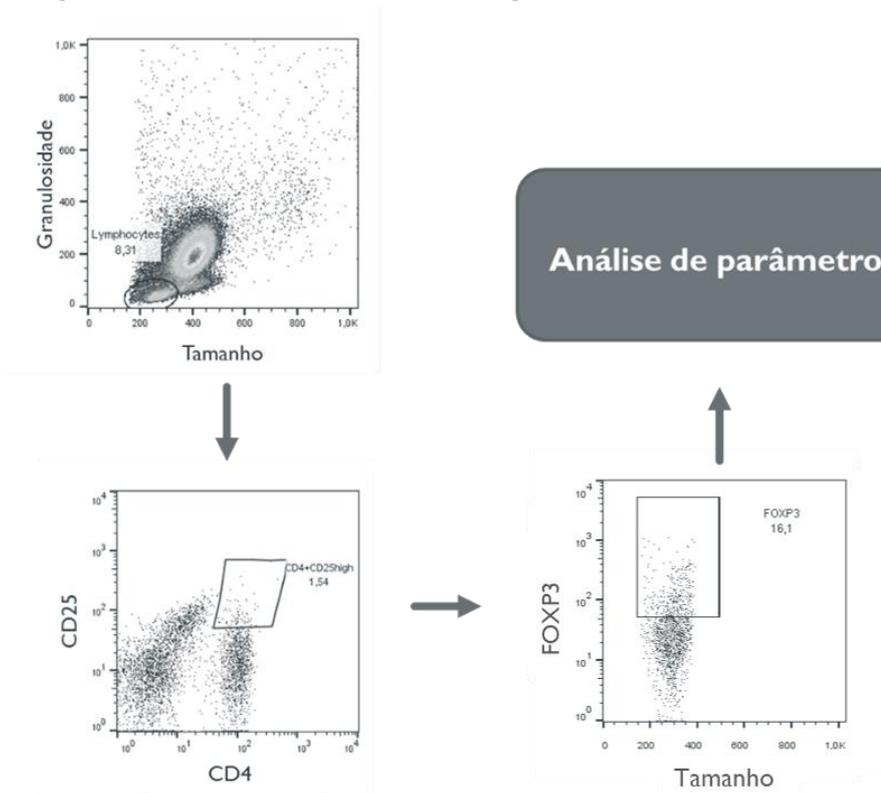
Os anticorpos utilizados para a marcação de moléculas de superfície foram: controles de Isotipo marcados (FITC, PE), anti-CD4, anti-CD25, anti-CD39, anti-CD73, anti-PD-1 e anti-LAP. Para efetuarmos as marcações intracelulares os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-FOXP3, anti-CTLA-4, anti-IL-10, anti-INF- $\gamma$ , anti-granzima B e anti-perforina. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos das companhias BD Pharmigen™ (CA, USA) ou Ebioscience (San Diego, CA, USA).

#### 4.8 Estratégia de análise

Para a estratégia de análise, foi utilizada a metodologia proposta por Hoffman e colaboradores (2006), no qual foi realizado um gate para seleção de linfócitos no gráfico de tamanho e granulosidade. Dentro dos linfócitos, células TCD4+CD25<sup>high</sup> foram selecionadas. Dentro dessa população a seleção de células FOXP3+ foi realizada, sendo obtidas dessa forma as células Treg. Dentro da população CD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3+, as células foram avaliadas quanto aos marcadores CD39,

CD73, Perforina, Granzima, PD-1, CTLA-4, INF- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ , como demonstrado na figura 4.

**Figura 4. Estratégia de análise de células Treg. Avaliação de células Treg a partir de Gate na região de linfócitos, CD4+, CD25high e FOXP3+.**



Fonte: Própria

#### 4.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Graphpad Prism (Versão 5.01, Graphpad Software, Inc) (SAS Institute Inc.). Para análise comparativa entre os diferentes grupos foram utilizados o teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T pareado. Os dados avaliados foram normalizados e o intervalo de confiança foi de 95% e os valores serão considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

**RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características dos pacientes avaliados

Avaliando as características dos pacientes e controles envolvidos na pesquisa, foi observada uma média de idade de 37 anos (27-57 anos) e razão de 3:4 (Mulheres:Homens) para os pacientes apresentando a forma aguda da doença (Tabela 2) e 38 anos (21-50 anos) e razão 5:1 (Mulheres:Homens) para os pacientes apresentando a forma crônica (Tabela 3), já os controles apresentavam média de idade 36,28 anos (25-51 anos) e razão 6:1 (Mulheres:Homens) (Tabela 4). Os pacientes agudos relataram a presença de sintomas como febre alta (39°C), artralgia, mialgia intensa, dor retro orbital, cefaleia, exantema, e em alguns casos vômito e diarreia. Os pacientes crônicos descreveram a presença de edema nas articulações, mialgia intensa, e em muitos casos prurido e fraqueza nos membros.

**Tabela 2. Descrição de dados do grupo Chikungunya Aguda.**

Código	Idade	Gênero	Tempo de início dos sintomas (Dias)	Sinais e Sintomas
<i>DENG 26</i>	57 anos	F	3	Cefaleia, febre (38°C), artralgia, dor retro orbital
<i>DENG 39</i>	28 anos	M	2	Exantema, febre (38,5°), mialgia
<i>DENG 41</i>	43 anos	M	1	Edema leve, exantema, febre (38°C), cefaleia, dor retro orbital e mialgia
<i>ARBO03</i>	30 anos	F	2	Febre (39.8°C), artralgia, edema leve, dor retro orbital, cefaleia, mialgia
<i>ARBO12</i>	Não Informado	M	5	Febre (39.2°C), cefaleia, vômito, exantema, mialgia e artralgia
<i>ARBO 35</i>	27 anos	M	2	Febre(39.5°C), artralgia, cefaleia, hipertrofia ganglionar, dor retro orbital
<i>ARBO 38</i>	Não informado	F	5	Febre (40°C); mialgia, artralgia, cefaleia, hipertrofia ganglionar
Média	37	(3 F : 4M)	2,85	

Fonte: Própria. A tabela demonstra a idade, o gênero, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o gênero Feminino e M o gênero Masculino.

**Tabela 3. Descrição de dados do grupo Chikungunya Crônica.**

Código	Idade	Gênero	Tempo de início dos sintomas (Meses)	Sinais e Sintomas
<i>ARBO21</i>	47	F	6	Artralgia, edema, prurido, mialgia
<i>ARBO22</i>	36	F	12	Artralgia, cefaleia, dor retro orbital, prurido, edema
<i>ARBO27</i>	21	M	8	Artralgia e edema
<i>ARBO28</i>	41	F	12	Cefaleia, exantema, edema, prurido, dor retro orbital
<i>ARBO 37</i>	50	F	9	Artralgia, edema, cefaleia e mialgia
<i>ARBO18</i>	33	F	10	Edema, artralgia, dor retro orbital
Média	38	(5 F : 1 M)	9,5	

Fonte: Própria. A tabela demonstra a idade, o gênero, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o gênero Feminino e M o gênero Masculino.

**Tabela 4. Descrição de dados do grupo controle.**

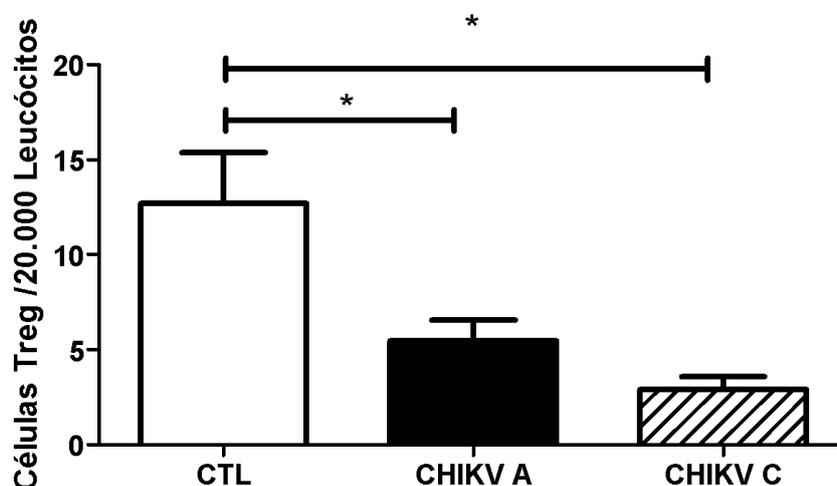
Código	Idade	Gênero	Tempo de início dos sintomas	Sinais e Sintomas
<i>CTL 1</i>	50	F	-	Indivíduo Saudável
<i>CTL 2</i>	51	F	-	Indivíduo Saudável
<i>CTL 3</i>	20	F	-	Indivíduo Saudável
<i>CTL 4</i>	51	F	-	Indivíduo Saudável
<i>CTL 5</i>	31	M	-	Indivíduo Saudável
<i>CTL 6</i>	25	F	-	Indivíduo Saudável
<i>CTL 7</i>	26	F	-	Indivíduo Saudável
Média	36,28	(6 F : 1 M)	-	

Fonte: Própria. A tabela demonstra a idade, o gênero, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o gênero Feminino e M o gênero Masculino.

## 5.2. Número de células T reguladoras circulantes em pacientes agudos, crônicos e controles

As análises por citometria de fluxo das células T reguladoras do grupo controle, paciente CHIKV agudos e CHIKV crônico demonstraram que o grupo controle apresenta maior média de células T reguladoras por leucócitos circulantes (12,71 Treg /20.000 leucócitos) em comparação aos grupos de pacientes CHIKV A (5,46 /20.000 leucócitos) e CHIKV C (2,91 /20.000 leucócitos) (Figura 5).

**Figura 5. Número de células T reguladoras circulantes nos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico.**



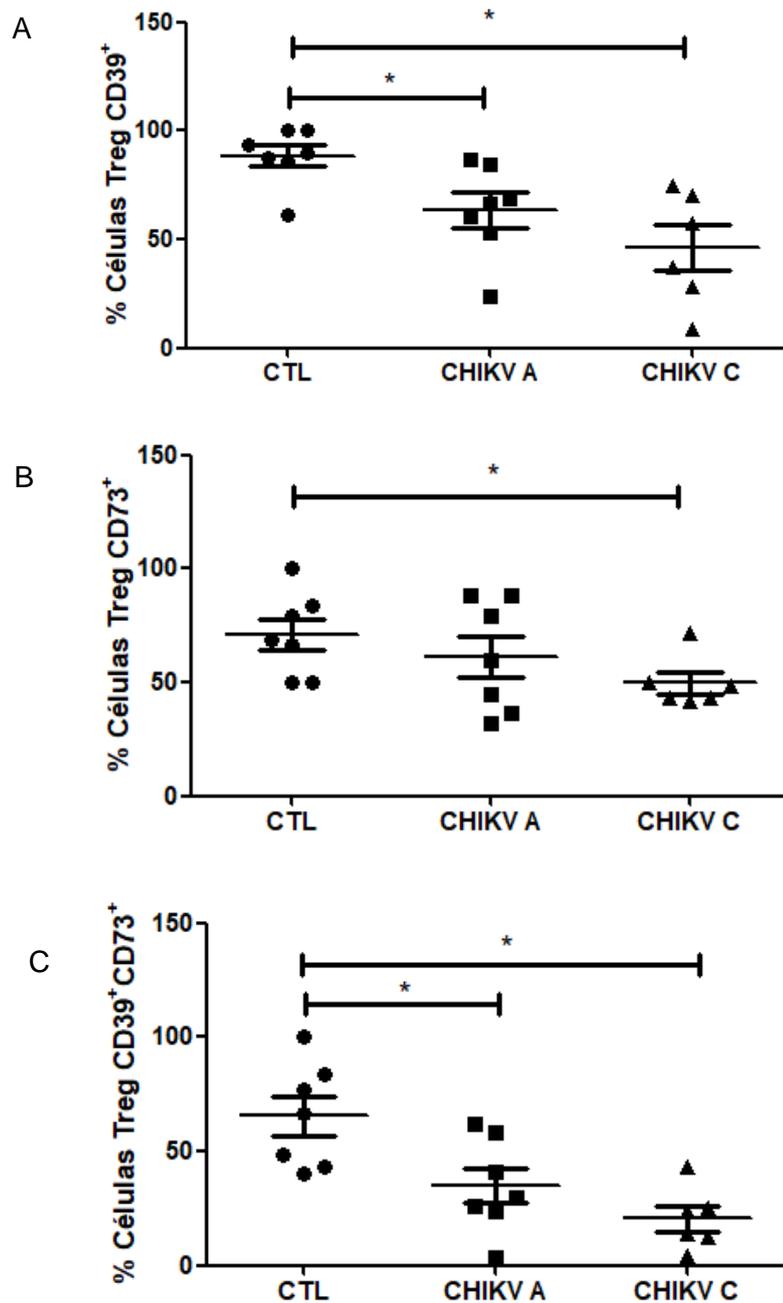
Fonte: Própria. Número de células T reguladoras por 20.000 leucócitos circulantes dos grupos controle (CTL), CHIKV agudo (CHIKV A) e CHIKV crônico (CHIKV C). O símbolo \* representa diferença estatística com  $p < 0,05$ ; Barras indicam desvio padrão médio.

## 5.3. Avaliação de enzimas de clivagem purinérgica de células Treg em pacientes agudos, crônicos e controles

Ao avaliar marcadores imunológicos de mecanismos de ação característicos de Treg, foi demonstrada a diminuição da expressão de ectoenzimas relacionadas à ruptura metabólica de ATP extracelular em Treg de pacientes apresentando CHIKV A e CHIKV C em comparação aos controles. Células Treg de pacientes CHIKV A e CHIKV C apresentaram diminuição da expressão da ectoenzima CD39 em comparação ao controle (Figura 6A), enquanto somente pacientes CHIKV C apresentaram diminuição na expressão do CD73 em comparação ao controle (Figura 6B). Avaliando a co-expressão das ectoenzimas CD39/CD73 na superfície

de células Treg, é observada a diminuição da frequência de co-expressão dessas moléculas nas células de pacientes CHIKV A e CHIKV C em comparação ao controle (Figura 6C).

**Figura 6. Frequência de células T reguladoras expressando CD39, CD73 e CD39/73 dos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico.**

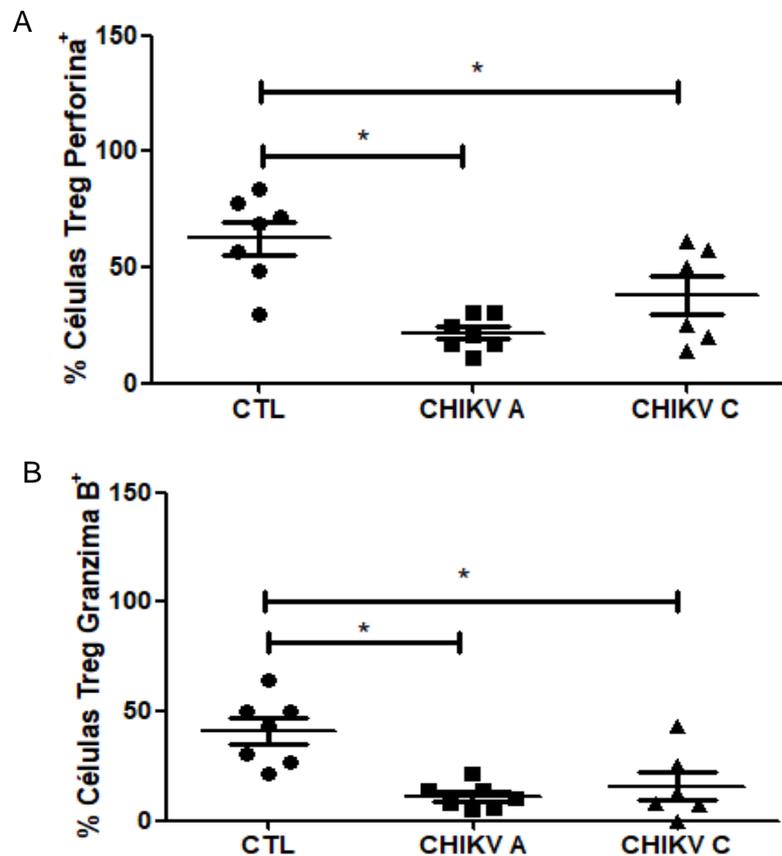


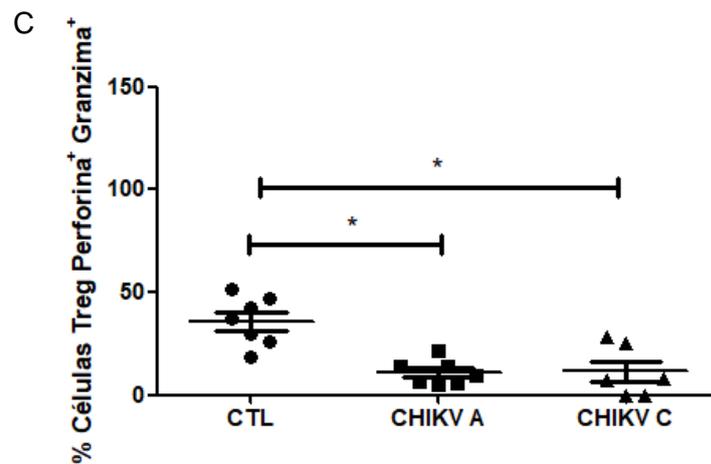
Fonte: Própria. Frequência de células T reguladoras expressando CD39 (A), CD73 (B) e CD39/73 (C) dos grupos controle (CTL), CHIKV agudo (CHIKV A) e CHIKV crônico (CHIKV C). O símbolo \* representa diferença estatística com  $p < 0,05$ ; Barras indicam desvio padrão médio.

#### 5.4. Avaliação do perfil de produção de grânulos pelas células Treg de pacientes agudos, crônicos e controles

A produção de grânulos pelas Treg também foi avaliada demonstrando que pacientes CHIKV A e CHIKV C apresentam diminuição significativa na produção de perforina (Figura 7A) e granzima (Figura 7B) pelas células Treg em comparados ao grupo controle, bem como, foi observada a diminuição da co-produção desses grânulos pelas Treg de pacientes CHIKV A e CHIKV C (Figura 7C).

**Figura 7. Frequência de células T reguladoras expressando Perforina, Granzima B e Perforina/Granzima B dos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico.**



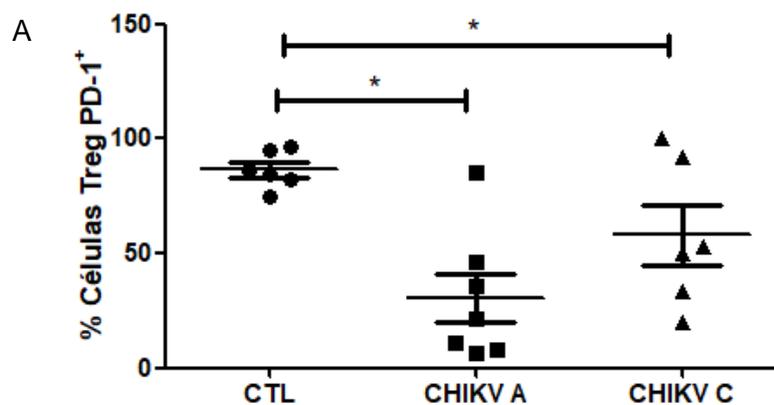


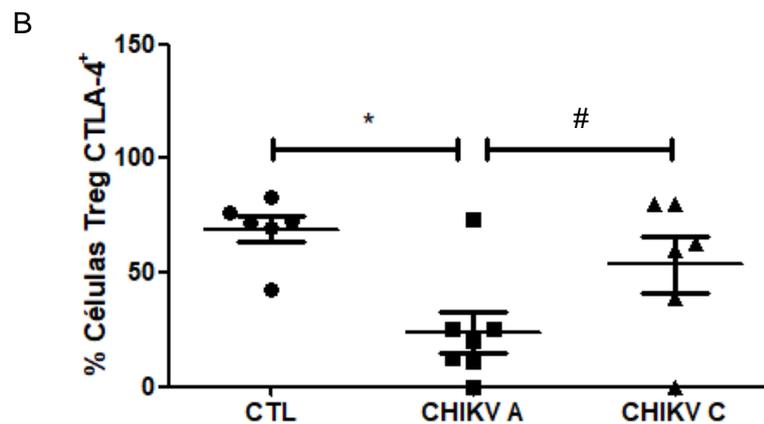
Fonte: Própria. Frequência de células T reguladoras expressando Perforina (A), Granzima B (B) e Perforina/Granzima B (C) dos grupos controle (CTL), CHIKV agudo (CHIKV A) e CHIKV crônico (CHIKV C). O símbolo \* representa diferença estatística com  $p < 0,05$ ; Barra indicam desvio padrão médio.

### 5.5. Avaliação da expressão de receptores de regulação em células Treg de pacientes agudos, crônicos e controles

A expressão do receptor PD-1 nas células Treg de pacientes CHIKV A e CHIKV C apresentou uma diminuição em comparação às células Treg dos controles (Figura 8A). Além disso, a avaliação do receptor CTLA-4 intracelular em células Treg demonstrou diminuição de expressão em pacientes CHIKV A comparado ao controle e ao grupo CHIKV C (Figura 8B).

**Figura 8. Frequência de células T reguladoras expressando PD-1 e CTLA-4 dos grupos control, CHIKV agudo e CHIKV crônico.**



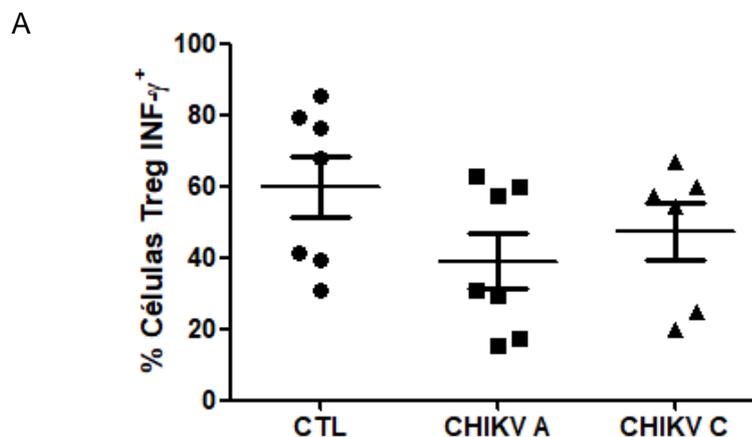


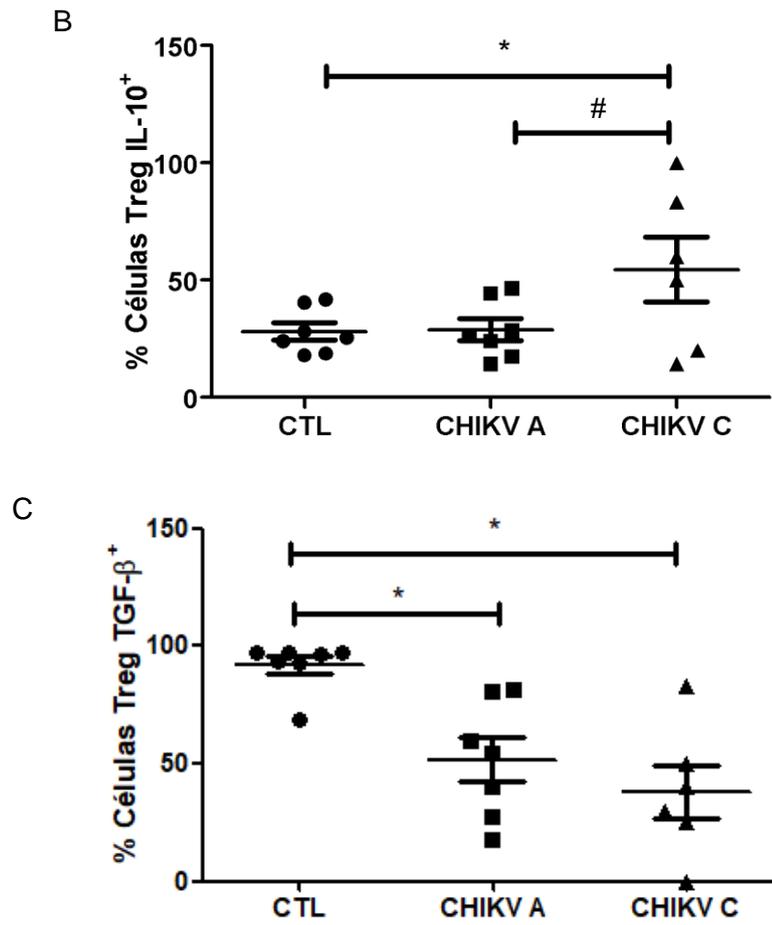
Fonte: Própria. Frequência de células T reguladoras expressando PD-1 (A) e CTLA-4 (B) dos grupos controle (CTL), CHIKV agudo (CHIKV A) e CHIKV crônico (CHIKV C). Os símbolos \*,# representam diferença estatística com  $p < 0,05$ ; Barras indicam desvio padrão médio.

### 5.6. Avaliação da produção de citocinas pelas células Treg de controles e pacientes agudos e crônicos

As análises de citometria também incluíram a avaliação de citocinas produzidas pelas células Treg como INF- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$ . Não existem diferenças na produção de INF- $\gamma$  pelas células de Treg de pacientes e controles (Figura 9A). Contudo, as células Treg de pacientes CHIKV crônicos apresentaram maior produção de IL-10 em comparação aos pacientes CHIKV agudos e controles (Figura 9B). A avaliação da expressão de TGF- $\beta$  demonstrou que células Treg de pacientes CHIKV A e CHIKV C apresentam produção dessa citocina diminuída quando comparado a células de voluntários saudáveis (Figura 9C).

**Figura 9. Frequência de células T reguladoras expressando INF- $\gamma$ , IL-10 e TGF- $\beta$  dos grupos controle, CHIKV agudo e CHIKV crônico.**





Fonte: Própria. Frequência de células T reguladoras expressando INF- $\gamma$  (A), IL-10 (B) e TGF- $\beta$  (C) dos grupos controle (CTL), CHIKV agudo (CHIKV A) e CHIKV crônico (CHIKV C). Os símbolos \*,# representam diferença estatística com  $p < 0,05$ ; Barras indicam desvio padrão médio.

**DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

A Chikungunya é uma doença de sintomatologia intensa e incapacitante, que leva a manifestações clínicas características tanto em fases agudas quanto crônicas da doença. Nesse estudo os pacientes na fase aguda apresentaram sintomas semelhantes àqueles descritos em epidemias como a da Tanzânia e La Reunión (MASON e HADDOW, 1957; STAPLES et al., 2009; SCHILTE et al., 2013). Além disso, a evolução dos pacientes para estágios crônicos da doença meses após a infecção foi relatado por Schilte e colaboradores (2013), com sintomatologia equivalente às relatadas no presente estudo como artralgia e edema.

As células T reguladoras são constantemente associadas a evolução clínica dos pacientes devido ao seu envolvimento em resolução de inflamações e manutenção da homeostase dos tecidos, especialmente em processos infecciosos, através de diversos mecanismos (LAIDLAW et al., 2015), contudo, seu papel em infecções virais crônicas ainda são pouco elucidados (PARK ET AL., 2015). Pela primeira vez na literatura científica células Treg foram avaliadas em pacientes com Chikungunya, comparando suas formas clínicas aguda e crônica com indivíduos saudáveis. No presente estudo foi demonstrado que os voluntários do grupo controle apresentaram maior número de células T reguladoras por leucócitos circulantes em comparação aos grupos de pacientes apresentando infecção aguda por Chikungunya e pacientes Chikungunya crônicos.

A Chikungunya é uma doença caracterizada pela presença de células pró-inflamatórias e seus moduladores (BAUD et al., 2016), e a associação entre o balanço de células T reguladoras e células efetoras são chaves no entendimento da imunomodulação da patologia acarretada pela infecção. A presença de elevados números células T reguladoras circulantes em infecções virais já foi relacionada à capacidade de buffer de respostas pro-inflamatórias em humanos. Liang et al. (2014) demonstraram em estudos com pacientes apresentando falha crônica hepática derivada de infecções pelo o vírus da Hepatite B, que o aumento de células T reguladoras no sangue periférico dos pacientes apresentava relação inversamente proporcional com a presença de células e mediadores pro-inflamatórios, especialmente células de perfil Th17. Além disso, pesquisadores demonstraram menores níveis de células Treg no sangue periférico de pacientes infectados com o vírus da Hepatite B, e dessa forma, os pacientes apresentaram altos níveis de

células pro-inflamatórias (Chen et al., 2014), assim como acontece na Chikungunya aguda e crônica. Dessa forma, é proposto que a diminuição de células T reguladoras circulantes em pacientes CHIKV A e CHIKV C podem estar associados ao perfil pro-inflamatório evidente nas duas formas da doença, e inclusive contribuir para a imunopatologia da doença crônica.

Além disso, uma discussão recente relacionada à capacidade de células do sistema imune em adquirir fenótipos diferenciados dependentes do microambiente em que estão inseridos vem sendo levantada. Em situações patológicas, como em infecções virais, células Treg (CD4+CD25+FOXP3+) podem sofrer modificações epigenéticas em regiões gênicas específicas do FOXP3 acarretando em um fenômeno denominado plasticidade celular. As modificações epigenéticas silenciam a expressão gênica do FOXP3, descaracterizando a célula Treg e qualificando-a como uma célula ex-treg (BHELA et al., 2017). Pesquisadores demonstraram que em doenças acarretadas por vírus, como HSV-1, a participação de células ex-Treg plásticas na produção de citocinas características de células de eixo TH1, como INF- $\gamma$  podem contribuir para o estabelecimento de microambientes patológicos altamente inflamados pela diminuição de células reguladoras, bem como pela produção de citocinas inflamatórias (BHELA et al., 2017).

Interessantemente, levando em consideração as características clínicas dos pacientes infectados com o vírus da Chikungunya, tanto em fases agudas quanto crônicas, observam-se sintomatologias graves e incapacitantes, especialmente àquelas relacionadas a dor e inchaço. Estudos envolvendo pacientes infectados com Vírus do oeste do Nilo (WNV) indicaram correlação entre altas frequências de células Treg e a diminuição de infecções sintomáticas do WNV (LANTERI et al., 2009). Levando em consideração essas informações, isso nos direciona ao fato de que a baixa frequência de células Treg em pacientes CHIKV agudos e crônicos, pode ser relacionada às características de sintomas de fortes dores observadas nos pacientes.

Além da diminuição de números de células Treg de pacientes CHIKV A e CHIKV C, alguns mecanismos relacionados a atividade dessas células parecem alteradas nesses grupos. A avaliação das enzimas de disrupção metabólica do ATP demonstrou diminuição da expressão da Ntpdase CD39 na superfície de células Treg de pacientes agudos e crônicos em comparação ao controle. Essa enzima é responsável pela clivagem imediata do ATP extracelular presente no microambiente

produzindo o mediador intermediário AMPc (DOU et al., 2017). A clivagem do ATP extracelular garante a diminuição do sinal de perigo gerado pelo ATP, além de influenciar em respostas específicas da imunidade, isso porque, o ATP é conhecido por amplificar a ativação a partir do receptor TCR de células T, por aumentar a produção de IL-2 e também por inibir a diferenciação e função de células Treg, (SCHENK et al., 2011; YIP et al., 2009; FAAS et al., 2017), enquanto estimula a diferenciação de células pro-inflamatórias (FAAS, 2017). Dessa forma, a diminuição dessa enzima na superfície de células Treg em pacientes agudos e crônicos pode acarretar em déficits na eliminação de ATP extracelular favorecendo um perfil pro-inflamatório e de inibição da proliferação de células Treg, bem como, pode estar associado com o favorecimento da permanência de sintomas articulares, uma vez que a presença de ATP em líquidos sinoviais foram associados à inflamação e influxo de células locais (LABASI et al., 2002; MCINNES et al., 2014).

Outra enzima associada com metabolismo purinérgico é o CD73, que realiza a hidrólise de nucleosídeos monofosfatados extracelulares em nucleosídeos intermediários bioativos, como por exemplo, a adenosina, que por sua vez atua em receptores A2a, expressos em uma grande variedade celular promovendo imunorregulação (COLGAN et al., 2006). Foi demonstrada uma diminuição na expressão da ectoenzima CD73 em Treg de pacientes CHIKV C em comparação ao controle. Isso indica que a formação de adenosina a partir dessa enzima parece prejudicada em pacientes crônicos, enquanto que para os pacientes agudos esse mecanismo parece inalterado. A baixa expressão desta ectoenzima pode promover um déficit da modulação por adenosina, o que a nível celular induz a diminuição da ativação de células Treg e aumento de respostas inflamatórias por células T efetoras, garantindo por sua vez um ambiente favorável para o desenvolvimento da inflamação em pacientes crônicos.

A diminuição de adenosina na artrite reumatoide parece estar envolvida com a patogênese articular da doença (FORREST et al., 2005), isso porque estudos in vitro em cultura de células do sangue total e em modelos murinos demonstraram que o estímulo de receptores A1, A2 e A3 promovem diminuição da liberação de TNF- $\alpha$ , sugerindo a inibição de monócitos (FORREST et al., 2005), além da diminuição de infiltrados de células mononucleadas e de manifestações clínicas características da doença (MONTES et al., 2016). Sabe-se que a doença da Chikungunya crônica compartilha semelhanças fisiológicas e imunes com a artrite

reumatoide (AMDEKAR et al., 2017). Dessa forma, a diminuição de ectonucleotidases como o CD73, parece estar intimamente relacionado com a diminuição de adenosina, que como na patologia da artrite reumatoide pode estar associada ao desenvolvimento das manifestações clínicas ligadas a produção de citocinas como IL-17, TNF- $\alpha$  e IL-15, bem como o favorecimento de infiltração de células, levando ao desenvolvimento da patologia articular.

A co-expressão das moléculas CD39 e CD73 também foram avaliadas nas células Treg, uma vez que a ação conjunta dessas enzimas para conversão de ATP em adenosina é característica de células T reguladoras. Foi demonstrada a diminuição da frequência de co-expressão dessas moléculas nas células de pacientes CHIKV A e CHIKV C em comparação ao controle. Essa diminuição pode indicar disfunção da atividade em cadeia para clivagem de ATP e formação de adenosina, o que favorece o desenvolvimento de microambientes de inflamação por permanência de ATP extracelular e diminuição da ação de adenosina. Esse perfil também é observado em estudos envolvendo infecção por *Salmonella* em C57BL/6, no qual a *down* regulação de CD39/CD73 promove diminuição de produção de adenosina como um mecanismo de células do hospedeiro de favorecer a produção de inflamação na busca de eliminação do patógeno (ALAM et al., 2014).

Além dos mecanismos de regulação a partir de enzimas, as células T reguladoras apresentam a produção de grânulos como granzimas e perforinas como arsenal de regulação. No presente trabalho foi observada a diminuição da produção de granzima B e perforina pelas células Treg de pacientes CHIKV A e CHIKV C em comparação ao controle. Esses grânulos vêm sendo apontados como importantes mediadores regulatórios das células Treg através da indução de apoptose em células alvo (GONDEK et al., 2004). Estudos envolvendo transferência adotiva de células Treg de camundongos *wild type* para camundongos nocauteados na produção de granzima B (*Gzmb*), restauraram a capacidade de desenvolvimento de tumores através da inibição de células como NK (CAO et al., 2007), indicando a importância da produção de grânulos na regulação de células do sistema imunológico. Além disso, estudos envolvendo infecção com o vírus sincicial respiratório em camundongos quimeras depletados de células Treg foram realizados indicando que a expressão de *Gzmb* por células Treg possuem um papel fundamental na regulação da gravidade da doença durante a infecção viral aguda, de forma que os camundongos *Gzmb* - / - Tregs apresentavam doenças mais

graves que os Gzmb + / + Tregs (LOEBBERMANN et al., 2011). Levando em consideração essas informações, infere-se que além dos mecanismos observados anteriormente, a diminuição de produção de grânulos por células Treg podem estar associados às características de agravo observadas na Chikungunya aguda e crônica.

As células Treg apresentam mecanismos de regulação, que incluem a expressão de receptores que definem interações célula-célula de modulação. Os mecanismos de contato celular avaliados nas células Treg dos grupos indicaram a diminuição do receptor PD-1 nas células Treg de pacientes agudos e crônicos. Esse receptor em células Treg são associados à modulação negativa de células com atividades efectoras. Wang e colaboradores (2009) demonstraram que o bloqueio de PD-1 promoveu a geração de células antígeno-específicas, favorecendo a formação e resistência de células CD8+ à supressão das Treg. Além disso, a molécula de PD-1 é associada a mudança de eixos de polarização, de forma que a ligação dessa molécula a receptores PDL-1 acarreta na diminuição da produção de citocinas do eixo Th1/Th17 (MCALEES et al., 2015). Dessa forma, esses dados corroboram com o perfil de favorecimento da produção de citocinas características da doença aguda e crônica da Chikungunya, através da diminuição de receptores PD-1, demonstrando mais uma vez a possível participação das células Treg na patogenia da doença.

O CTLA-4, por sua vez, é uma molécula expressa de forma constitutiva em células Treg, e através das ligações em receptores específicos podem mediar a supressão de células alvo (KAUFMANN et al., 2007), caracterizando um mecanismo de contato. Nesse estudo foi observada a diminuição da expressão de CTLA-4 pelas células Treg de pacientes agudos e o restabelecimento da expressão dessa molécula em pacientes crônicos. Isso demonstra que um mecanismo característico e constitutivo de células Treg por contato célula-célula (CTLA-4) é modulado negativamente na fase aguda da chikungunya, provavelmente relacionado à tentativa da eliminação viral em fases agudas da doença. Já em estágios crônicos da doença, a expressão de CTLA-4 retorna a níveis semelhantes ao do controle, em que já não existe a necessidade de eliminação de vírus circulantes.

Na fase crônica da doença da Chikungunya, muito especula-se acerca da modulação viral do sistema imune do hospedeiro, sabe-se que em fases crônicas, a carga de vírus circulantes é nula (JAFFAR-BANDJEE, 2009), o que justifica o restabelecimento da expressão de CTLA-4 nas células Treg circulantes. Por outro

lado, caso ocorra migração dessas células circulantes para sítios de persistência viral, um favorecimento da cronicidade da infecção através da inibição dependente de CTLA-4 da apresentação antigênica por células APC pode vir a ocorrer (Walker et al., 2015). Por exemplo, em infecções com *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*, a persistência do microrganismo em estágios crônicos da doença é clara e constantemente associada aos mecanismos do CTLA-4 favorecendo o defeito do clearance do patógeno (KAUFMANN et al., 2007).

Além disso, a participação de citocinas na modulação por células Treg através da modificação do microambiente e ligação a receptores específicos já são bem estabelecidos. A produção de INF- $\gamma$  não é característica comum no repertório de mecanismos das células Treg, uma vez que a expressão do FOXP3 favorece a supressão de genes relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias (FONTENOTE e RUDENKI, 2005). Ao avaliarmos a expressão desta citocina nas células Treg de pacientes CHIKV A e CHIKV C, não existem alterações na produção dessa molécula, indicando a permanência da tendência de baixa atividade de produção dessa molécula por essas células.

A IL-10 é uma citocina de supressão geral que apresenta papéis importantes na regulação de respostas imune contra infecções, além disso, apresentam papel na sinalização que contribui para a exaustão de células T durante infecções virais crônicas (TIAN et al., 2016). Dessa forma, assim como observado nos estudos de *Parish e colaboradores* (2014), nenhuma alteração ocorre na expressão de IL-10 pelas células Treg de pacientes agudos, enquanto há maior produção dessa citocina em pacientes crônicos. O estudo descrito utiliza camundongos quimeras infectados com LCMV para a avaliação da produção de IL-10 por diversos tipos celulares de linhagens linfoides e mieloides, incluindo células Treg, e demonstram a similaridade da produção de IL-10 entre células Treg do grupo controle e de fase aguda, e o aumento da produção dessa citocina em fases crônicas da doença. Esses dados indicam a possível participação de células Treg na manutenção de células infectadas em fases crônicas da Chikungunya a partir de mecanismos de regulação promovidos pela IL-10.

Além disso, outras citocinas descritas pela atividade de repressão de respostas efectoras são atribuídas à produção por células Treg, como é o caso do TGF- $\beta$ . Estudos com citocinas regulatórias na Chikungunya demonstram a importância dessas moléculas no estabelecimento da patologia. O fator de

transformação de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) é um supressor de diferenciação de eixos Th1 e Th2 e leva à conversão de células T àquelas com fenótipos regulatórios (Li e Flavell, 2008). A realidade da imunopatogenia da Chikungunya é a presença de elevados níveis de TGF- $\beta$  em pacientes apresentando a doença, sendo essa molécula, inclusive, alvo de tratamentos em pacientes idosos infectados (Uhrlaub et al., 2016). Curiosamente, o que é observado nas células Treg periféricas de pacientes agudos e crônicos é a diminuição da produção de TGF- $\beta$  por essas células, o que demonstra que a participação da produção dessa citocina na patologia não é dependente de células T reguladoras, apesar de em condições de homeostase as células Treg serem consideradas a maior fonte de produção de LAP (TGF- $\beta$  de superfície) (YOSHIMURA et al., 2010).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dessa forma, esses achados sugerem que a depleção de células T reguladoras e disfunção de seus mecanismos na doença, podem contribuir para o favorecimento do *clearance* viral, uma vez que mecanismos de controle de respostas inflamatórias encontram-se diminuídos nessas células, como a produção de grânulos, disfunção metabólica e expressão do receptor PD-1. Por sua vez, a inflamação característica da doença promove danos celulares e relaciona-se com características clínicas mais graves da doença. Apesar da realização do *clearance* de vírus circulantes, a presença de formas virais latentes é observada em pacientes crônicos. A supressão mediada por células Treg na fase crônica apresenta-se também insuficiente, de fato, a liberação de citocinas como IL-10 por essas células parecem promover o favorecimento da cronicidade da infecção e por outro lado, outros mecanismos associados às células Treg parecem não ser capazes de suprimir respostas inflamatórias patogênicas, como o receptor CTLA-4, favorecendo respostas clínicas observadas em pacientes crônicos. Isso indica que células Treg apresentam papel essencial no desenrolar imunológico da patogenia da doença, especialmente relacionado a estágios crônicos, no qual as células T reguladoras demonstram falhas no processo de regulação do processo inflamatório, favorecendo a manutenção da inflamação característica da patogenia. Esclarece-se, dessa forma, pela primeira vez o perfil dessa célula em infecções crônicas e agudas da Chikungunya.

## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS

1. ALAM, M. Samiul et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates host inflammatory responses and exacerbates murine salmonellosis. *Scientific reports*, v. 4, p. 4486, 2014.
2. AMARAL, J. Kennedy; SUTARIA, Ravi; SCHOEN, Robert T. Treatment of chronic chikungunya arthritis with methotrexate: a systematic review. *Arthritis care & research*, 2018.
3. AMDEKAR, Sarika; PARASHAR, Deepti; ALAGARASU, Kalichamy. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. *Viral immunology*, v. 30, n. 10, p. 691-702, 2017.
4. ARROYO-ÁVILA, Mariangeli; VILÁ, Luis M. Rheumatic manifestations in patients with chikungunya infection. *Puerto Rico health sciences journal*, v. 34, n. 2, 2015.
5. BAUD, David et al. Clinical management of pregnant women exposed to Zika virus. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 5, p. 523, 2016.
6. BAUTISTA-REYES, Eduardo et al. Chikungunya: Molecular Aspects, Clinical Outcomes and Pathogenesis. **Revista de Investigación Clínica**, v. 69, n. 6, p. 299-307, 2018.
7. BELKAID, Yasmine. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 11, p. 875, 2007.
8. BHELA, Siddheshvar et al. The plasticity and stability of regulatory T cells during viral-induced inflammatory lesions. *The Journal of Immunology*, v. 199, n. 4, p. 1342-1352, 2017.
9. BURT, Felicity J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. *The Lancet*, v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012

10. CAO, Xuefang et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, v. 27, n. 4, p. 635-646, 2007.
11. CDC. Notes from the Field: Chikungunya Virus Spreads in the America-Caribbean and South America, 2013–2014. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6322a5.htm>>Acessado em: 13/10/17
12. CHANG, Lee-Jah et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, v. 384, n. 9959, p. 2046-2052, 2014
13. CHEN, Yi et al. Effects of the Treg/Th17 cell balance and their associated cytokines in patients with hepatitis B infection. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 9, n. 2, p. 573-578, 2015.
14. COLGAN, Sean P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic signalling*, v. 2, n. 2, p. 351, 2006.
15. COUDERC, Thérèse et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS pathogens*, v. 4, n. 2, p. e29, 2008.
16. COUDERC, Thérèse et al. Chikungunya virus infection of corneal grafts. *The Journal of infectious diseases*, v. 206, n. 6, p. 851-859, 2012.
17. CURRAN, Michael A. et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 9, p. 4275-4280, 2010.

18. DELISLE, E. et al. chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill*, v. 20, n. 17, p. 21108, 2015.
19. DHAENZE, Tessa et al. Humoral autoimmunity: a failure of regulatory T cells?. *Autoimmunity reviews*, v. 14, n. 8, p. 735-741, 2015.
20. DOU, Lei et al. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. *Clinical Immunology*, 2017.
21. DUPUIS-MAGUIRAGA, Laurence et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.
22. FAAS, M. M.; SÁEZ, T.; DE VOS, P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?. *Molecular aspects of medicine*, v. 55, p. 9-19, 2017.
23. FONTENOT, Jason D.; RUDENSKY, Alexander Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature immunology*, v. 6, n. 4, p. 331, 2005.
24. FORREST, C. M. et al. Modulation of cytokine release by purine receptors in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, v. 23, n. 1, p. 89-92, 2005.
25. FROS, Jelke J.; PIJLMAN, Gorben P. Alphavirus infection: host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. *Viruses*, v. 8, n. 6, p. 166, 2016.
26. FULTON, Ross B.; MEYERHOLZ, David K.; VARGA, Steven M. Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *The Journal of Immunology*, v. 185, n. 4, p. 2382-2392, 2010.

27. GAO, Yinjie et al. Circulating FoxP3+ regulatory T and Interleukin17-producing Th17 cells actively influence HBV clearance in De Novo Hepatitis B Virus infected patients after orthotopic Liver Transplantation. *PloS one*, v. 10, n. 9, p. e0137881, 2015.
28. GOMES, Isabel Cristina Guerra et al. Caracterização molecular dos sorotipos da dengue e correlação dos índices pluviométricos e dos casos de dengue na Paraíba, no período de 2007-2015. 2016.
29. GONDEK, David C. et al. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+ CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *The Journal of Immunology*, v. 174, n. 4, p. 1783-1786, 2005.
30. GREGORI, Silvia; GOUDY, Kevin S.; RONCAROLO, Maria Grazia. The cellular and molecular mechanisms of immuno-suppression by human type 1 regulatory T cells. *Frontiers in immunology*, v. 3, p. 30, 2012.
31. HASKO, G., Linden, J., Cronstein, B. & Pacher, P. 2008. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases, *Nat Rev Drug Discov.*, 7(9), 759-70.
32. HOARAU, Jean-Jacques et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.
33. HOFFMANN, Petra et al. Only the CD45RA+ subpopulation of CD4+ CD25high T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood*, v. 108, n. 13, p. 4260-4267, 2006.

34. HONÓRIO, Nildimar Alves et al. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. *Cadernos de saude publica*, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.
35. HUNSPERGER, Elizabeth A. et al. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 8, n. 10, p. e3171, 2014.
36. JAFFAR-BANDJEE, Marie Christine et al. Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. *Microbes and infection*, v. 11, n. 14-15, p. 1206-1218, 2009.
37. KAM, Yiu-Wing et al. Early neutralizing IgG response to Chikungunya virus in infected patients targets a dominant linear epitope on the E2 glycoprotein. *EMBO molecular medicine*, v. 4, n. 4, p. 330-343, 2012.
38. KAM, Yiu-Wing et al. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. *Microbes and infection*, v. 11, n. 14-15, p. 1186-1196, 2009.
39. KAUFMANN, Daniel E. et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nature immunology*, v. 8, n. 11, p. 1246, 2007.
40. KOGA, Rosemary de Carvalho Rocha et al. ASPECTOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS DE INDIVÍDUOS COM SINAIS E SINTOMAS DE FEBRE CHIKUNGUNYA. 2017.
41. LABASI, Jeffrey M. et al. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 12, p. 6436-6445, 2002.

42. LAIDLAW, Brian J. et al. Production of IL-10 by CD4<sup>+</sup> regulatory T cells during the resolution of infection promotes the maturation of memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature immunology*, v. 16, n. 8, p. 871, 2015.
43. LANCIOTTI, Robert S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 764, 2007.
44. LANTERI, Marion C. et al. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*, v. 119, n. 11, p. 3266-3277, 2009.
45. LEE, Regina Ching Hua et al. Mosquito cellular factors and functions in mediating the infectious entry of chikungunya virus. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 2, p. e2050, 2013
46. LI, Ming O.; FLAVELL, Richard A. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-10. *Immunity*, v. 28, n. 4, p. 468-476, 2008.
47. LIANG, Xue-Song et al. Changes in circulating Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells and interleukin-17-producing T helper cells during HBV-related acute-on-chronic liver failure. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 26, p. 8558, 2014.
48. LOEBBERMANN, Jens et al. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal immunology*, v. 5, n. 2, p. 161, 2012.
49. LORD, Sarah J. et al. Granzyme B: a natural born killer. *Immunological reviews*, v. 193, n. 1, p. 31-38, 2003.
50. MANIMUNDA, Sathya Prakash et al. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology

- as revealed by imaging. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 104, n. 6, p. 392-399, 2010.
51. MARDEKIAN, Stacey K.; ROBERTS, Amity L. Diagnostic options and challenges for dengue and chikungunya viruses. *BioMed research international*, v. 2015, 2015
52. MASON, P. J. et al. An Epidemic of Yirus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. An Additional Note on Chikungunya Yirus Isolations and Serum Antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 51, n. 3, p. 238-40, 1957.
53. MCALEES, Jaclyn W. et al. Differential control of CD4+ T-cell subsets by the PD-1/PD-L1 axis in a mouse model of allergic asthma. *European journal of immunology*, v. 45, n. 4, p. 1019-1029, 2015.
54. MCCARTHY, Mary K.; MORRISON, Thomas E. Chronic chikungunya virus musculoskeletal disease: what are the underlying mechanisms? *Future microbiology*, 2016.
55. MCINNES, I. B. et al. Targeting the P2X7 receptor in rheumatoid arthritis: biological rationale for P2X7 antagonism. *Clinical and experimental rheumatology*, v. 32, n. 6, p. 878-882, 2014.
56. MELO, Karina Mescouto; CARVALHO, Beatriz Tavares Costa. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Rev Bras Alergia Imunopatol*, v. 32, n. 5, p. 184-8, 2009.
57. MONTES, Guilherme Carneiro et al. Treatment with adenosine receptor agonist ameliorates pain induced by acute and chronic inflammation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 358, n. 2, p. 315-323, 2016.

58. MORRISON, Clayton R.; PLANTE, Kenneth S.; HEISE, Mark T. Chikungunya Virus: Current Perspectives on a Reemerging Virus. *Microbiology spectrum*, v. 4, n. 3, 2016.
59. NASCI, Roger S. Movement of chikungunya virus into the Western hemisphere. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 8, p. 1394, 2014.
60. NG, Lisa FP. Immunopathology of Chikungunya Virus infection: Lessons learned from patients and animal models. *Annual review of virology*, v. 4, p. 413-427, 2017.
61. PAL, Pankaj. Molecular Characterization of a Novel, Highly Protective Combination Monoclonal Antibody Therapy against Chikungunya Virus. Washington University in St. Louis, 2015.
62. PARISH, Ian A. et al. Chronic viral infection promotes sustained Th1-derived immunoregulatory IL-10 via BLIMP-1. *The Journal of clinical investigation*, v. 124, n. 8, p. 3455-3468, 2014.
63. PARK, Hyo Jin et al. PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8+ T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8+ T cells. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 12, p. 5801-5811, 2015.
64. PETERSEN, Lyle R. et al. Zika virus. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 16, p. 1552-1563, 2016
65. PETITDEMANGE, Caroline et al. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS pathogens*, v. 7, n. 9, p. e1002268, 2011.

66. PETITDEMANGE, Caroline; WAUQUIER, Nadia; VIEILLARD, Vincent. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 135, n. 4, p. 846-855, 2015.
67. PRAT, Christine M. et al. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 12, p. 2129, 2014.
68. PRESTI, Alessandra Lo et al. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: an updating review. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 41, p. 270-278, 2016.
69. PUIPROM, Orapim et al. Characterization of chikungunya virus infection of a human keratinocyte cell line: role of mosquito salivary gland protein in suppressing the host immune response. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 17, p. 210-215, 2013.
70. REDDY, Vijayalakshmi et al. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *Journal of medical virology*, v. 84, n. 11, p. 1771-1778, 2012.
71. RUDD, C.E., TAYLOR, A., e SCHNEIDER, H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol.Rev.* v.229, p.12–26, 2009.
72. SANGIONI, Luis Antônio et al. Princípios de biossegurança aplicados aos laboratórios de ensino universitário de microbiologia e parasitologia. *Ciência Rural*, v. 43, n. 1, 2013.
73. SCHILTE, Clémentine et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.

- 74.SCHILTE, Clémentine et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *Journal of Experimental Medicine*, p. jem. 20090851, 2010.
- 75.SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim epidemiológico, v.48, n. 4, 2017
- 76.SERGON, Kibet et al. Seroprevalence of chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 78, n. 2, p. 333-337, 2008.
- 77.SILVA, Laurie A. et al. A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization. *Journal of virology*, v. 88, n. 5, p. 2385-2397, 2014.
- 78.SINAN. Sinan dengue/chikungunya. Disponível em: <<http://portalsinan.saude.gov.br/sinan-dengue-chikungunya>> Acesso em: 13 de Outubro de 2017
- 79.SLAVOV, Svetoslav Nanev et al. Chikungunya Virus (Chikv): General Characteristics and Possible Impact on Hemotherapy. 2015.
- 80.SMITH, Scott A. et al. Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against chikungunya virus. *Cell host & microbe*, v. 18, n. 1, p. 86-95, 2015.
- 81.SOH, Li Ting et al. External quality assessment of dengue and chikungunya diagnostics in the Asia Pacific region, 2015. *Western Pacific surveillance and response journal: WPSAR*, v. 7, n. 2, p. 26, 2016.
- 82.SOKOLOSKI, K. J. et al. Noncapped alphavirus genomic RNAs and their role during infection. *Journal of virology*, v. 89, n. 11, p. 6080-6092, 2015.

83. SPENGLER, Ulrich; NATTERMANN, Jacob. Immunopathogenesis in hepatitis C virus cirrhosis. *Clinical science*, v. 112, n. 3, p. 141-155, 2007.
84. STAPLES, J. Erin; BREIMAN, Robert F.; POWERS, Ann M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clinical infectious diseases*, v. 49, n. 6, p. 942-948, 2009.
85. SUHRBIER, Andreas; JAFFAR-BANDJEE, Marie-Christine; GASQUE, Philippe. Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 8, n. 7, p. 420-429, 2012.
86. TEO, Teck-Hui et al. A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya virus infection in mice. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 1, p. 259-269, 2013.
87. TEO, Teck-Hui et al. Caribbean and La Reunion Chikungunya virus isolates differ in their capacity to induce pro-inflammatory Th1 and NK cell responses and acute joint pathology. *Journal of virology*, p. JVI. 00909-15, 2015.
88. THAA, Bastian et al. Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by Semliki forest and chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. *Journal of virology*, v. 89, n. 22, p. 11420-11437, 2015
89. THIBERVILLE, Simon-Djamel et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral research*, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.
90. TIAN, Yuan et al. IL-10 regulates memory T cell development and the balance between Th1 and follicular Th cell responses during an acute viral infection. *The Journal of Immunology*, v. 197, n. 4, p. 1308-1321, 2016.

91. TSETTSARKIN, Konstantin A. et al. Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nature communications*, v. 5, p. 4084, 2014.
92. UHRLAUB, Jennifer L. et al. Dysregulated TGF- $\beta$  production underlies the age-related vulnerability to Chikungunya virus. *PLoS pathogens*, v. 12, n. 10, p. e1005891, 2016.
93. VEGA-RÚA, Anubis et al. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of virology*, v. 88, n. 11, p. 6294-6306, 2014.
94. VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD, Angelle Desiree. Chikungunya Virus. *Clinics in Laboratory Medicine*, v. 37, n. 2, p. 371-382, 2017
95. WALDOCK, Joanna et al. The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathogens and global health*, v. 107, n. 5, p. 224-241, 2013.
96. WALKER, Lucy SK; SANSOM, David M. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends in immunology*, v. 36, n. 2, p. 63-70, 2015.
97. WAUQUIER, Nadia et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *Journal of Infectious Diseases*, v. 204, n. 1, p. 115-123, 2010.
98. WESULA OLIVIA, Lwande et al. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. *Infection ecology & epidemiology*, v. 5, n. 1, p. 29853, 2015.

99. WICHIT, Sineewanlaya et al. Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 3145, 2017
100. WILDER-SMITH, Annelies et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *The Lancet infectious diseases*, v. 17, n. 3, p. e101-e106, 2017.
101. WIN, M. K. et al. Chikungunya fever in Singapore: acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia. *Journal of Clinical Virology*, v. 49, n. 2, p. 111-114, 2010.
102. YIP, Linda et al. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *The FASEB Journal*, v. 23, n. 6, p. 1685-1693, 2009.
103. YOSHIMURA, Akihiko; WAKABAYASHI, Yu; MORI, Tomoaki. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- $\beta$ . *The journal of biochemistry*, v. 147, n. 6, p. 781-792, 2010.
104. ZEANA, Cosmina et al. Post-chikungunya rheumatic disorders in travelers after return from the Caribbean. *Travel medicine and infectious disease*, v. 14, n. 1, p. 21-25, 2016.



# GLOSSÁRIO

## GLOSSÁRIO

**Clearence viral:** eliminação de vírus;

**Homeostase:** é a condição de relativa estabilidade da qual o organismo necessita para realizar suas funções adequadamente para o equilíbrio do corpo;

**Imunoensaio:** Teste bioquímico que avalia a presença ou concentração de uma macromolécula ou uma pequena molécula em uma solução através do uso de mediadores imunológicos;

**Patógeno:** organismo capaz de desenvolver doenças infecciosas aos hospedeiros;

**Quimeras:** animal que possui duas ou mais populações de células geneticamente distintas com origem de zigotos distintos;

**Repasto sanguíneo:** ato de alimentar-se de sangue realizada pelo inseto;

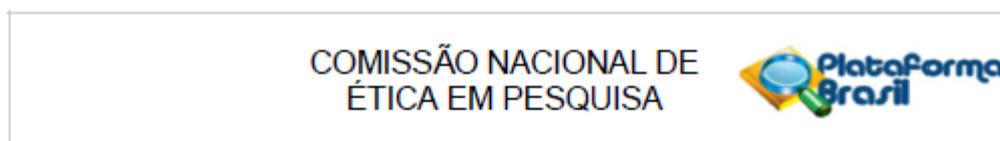
**Viremia:** presença de vírus no sangue;

**Vírião:** partícula viral infecciosa.

**ANEXOS**

## ANEXOS

### Anexo 1- Parecer de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue

**Pesquisador:** Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

**Versão:** 4

**CAAE:** 59833416.6.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

**Patrocinador Principal:** National Institutes of Health (NIH)

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.117.372

##### Apresentação do Projeto:

###### INTRODUÇÃO

Os vírus que causam a Dengue, a Zika e a Chikungunya pertencem ao grupo dos arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, da ordem díptera. São vírus que permanecem na natureza em ciclos complexos envolvendo um ou mais vertebrados-reservatórios, que podem ser humanos ou animais domésticos, e insetos vetores que infectam-se após o repasto sanguíneo do vertebrado virêmico, transmitindo o vírus a outros vertebrados (após período de incubação extrínseca necessária). Dentro desse grupo temos vírus classificados em diferentes grupos (Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae). Os vírus da Dengue (DENV) e da Zika (ZIKV) estão inclusos na família Flaviviridae que é composta por três gêneros: O gênero Flavivírus (no qual estão agrupados os quatro sorotipos dos Vírus Dengue (DENV 1-4), o Zika Vírus, Vírus da Febre Amarela, Vírus do Oeste do Nilo e da Encefalite Japonesa), o gênero Pestevírus na qual inclui-se os vírus da diarreia bovina e da peste suína clássica, e o gênero Hepacivírus, no qual

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## Anexo II- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto:** Avaliação da resposta imune humana inata e adaptativa nas arboviroses: Correlação entre mecanismos celulares e prognóstico na infecção pelos vírus Zika, Chikungunya e dengue

**Pesquisadora:** Tatjana Keesen de Souza Lima

**I. Esclarecimentos**

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre a Zika, Chikungunya e Dengue, que são doenças causadas por um microorganismo (micróbio) transmitido para o ser humano através da picada do mosquito, que se chama *Aedes aegypti*. Nosso objetivo com essa pesquisa é avaliar porque existem pessoas que ficam mais doentes que as outras quando estão com essas doenças e comparar a diferença entre elas; por exemplo, algumas podem ter hemorragia (sangramento intenso) no caso da dengue, dores articulares mais fortes na Chikungunya e manchas avermelhadas parecidas com alergia no caso da zika. Outras pessoas apresentam a doença apenas com sintomas leves como febre, dores musculares, dor de cabeça, entre outros, que podem confundir o diagnóstico, por serem muito parecidas. Para isto, vamos realizar um estudo do seu sistema de defesa (imunológico), no qual serão analisadas as células que são capazes de defender o organismo contra o microorganismo que causa a Zika, a Chikungunya e a dengue.

Caso aceite participar do estudo você fará uma consulta médica e deverá permitir a realização da coleta do seu sangue. Além disto, você deverá autorizar o nosso acesso a sua ficha médica, para que possamos coletar informações sobre o estado atual da sua doença e os resultados dos exames realizados. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la. Esses procedimentos se justificam pelo fato da avaliação médica, as informações acerca do seu estado de saúde e também das informações que constarão no questionário, nos permitir inclui-lo no grupo de pessoas doentes ou saudáveis, visando uma correta distribuição e análise dos resultados obtidos.

Vamos a seguir, explicar a você para que utilizaremos o material biológico e os riscos e desconforto que poderão existir.

Todos os procedimentos estarão de acordo com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde. Com sua permissão serão coletados, por uma pessoa devidamente treinada, aproximadamente 15 mL do seu sangue; utilizando material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderão ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Entretanto iremos minimizar estes riscos com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da coleta através da utilização de álcool e pressionando a região do braço onde foi feita a coleta com algodão por alguns minutos, após a retirada da agulha. Com o sangue coletado iremos realizar um exame das células do seu

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

sangue (hemograma), para determinar se você tem anemia. Uma parte do seu sangue será armazenada a uma temperatura que permita a conservação das células em um equipamento direcionado para esse fim. A outra parte do seu sangue iremos utilizar para estudar seu sistema de defesa (sistema imunológico), como também faremos uma análise para confirmar se você tem Zika, Chikungunya ou Dengue. Além disso, será realizado o estudo farmacológico da riparina, uma substância isolada de uma planta, que quando colocada em contato com o seu sangue poderá atuar de maneira positiva, ativando o seu sistema de defesa a combater melhor a infecção. Essa abordagem permitirá a proposição futura de novas estratégias de diagnóstico e tratamento e associações terapêuticas, visando à melhoria da qualidade de vida dos portadores dessas doenças. Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Com a sua autorização, uma parte do material biológico, o que foi acondicionado de maneira adequada para manutenção das células, será enviada para outro país (Inglaterra), onde os pesquisadores de lá farão estudos de substâncias no sangue que podem influenciar na resposta do seu sistema de defesa (imunológico). Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, para a guarda e utilização do material biológico sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Para erradicar qualquer risco de vazamentos dados dos prontuários e questionários aplicados serão guardados em local seguro, conhecido apenas pela equipe brasileira envolvida na pesquisa. A amostra será armazenada como biorepositório, que é um tipo de armazenamento das suas amostras, somente no tempo de execução deste projeto. Também garantimos que, o seu sangue que irá para Inglaterra, será utilizado apenas para este estudo, em seguida, descartados.

Todos os seus dados serão confidenciais e colocados de maneira anônima por devida codificação dos seus dados (ARBX). Todas as informações do seu prontuário e questionários serão depositadas em um banco de dados (drive), cuja senha só terá acesso os pesquisadores envolvidos. Só após essa codificação é que o seu material biológico será encaminhado à Inglaterra. Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Também é importante assegurar que caso você tenha interesse nos resultados de exames e da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa são que você estará contribuindo para um melhor entendimento da doença, e com estudos que podem trazer a descoberta de novos tratamentos e/ou cura. Dessa maneira, contribuindo com a ciência e a comunidade à sua volta.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto, como por exemplo, com transporte e alimentação, você será ressarcido. Caso sofra algum dano decorrente da pesquisa (direto ou indireto, imediato ou tardio), você terá direito à assistência integral e imediata pelo tempo que for necessário, além do direito de buscar indenização.

Você receberá uma via deste documento devidamente assinada pelo pesquisador e por você e rubricada em todas as páginas por ambos. Toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora D<sup>rs</sup> Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, no Centro de Biotecnologia,

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária-João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7371.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFPB. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que existe nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 2º andar (ao lado da biblioteca) Horário do Expediente: 8:00 às 12:00 hs e 13:00 às 17:00 hs. Campus I-Cidade Universitária-Bairro: Castelo Branco-CEP:58059-900-João Pessoa-PB- FAX (083) 32167522- CNPJ:24098477/007-05- Telefone: (083) 32167964- E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br.

Além do CEP, também existe o CONEP - A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – que é responsável por examinar os aspectos éticos de pesquisas envolvendo seres humanos, nas seguintes áreas: Genética humana, reprodução humana, novos dispositivos para a saúde, pesquisas em populações indígenas, pesquisas conduzidas do exterior e aquelas que envolvam aspectos de biossegurança. Endereço: Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Anexo B. Sala 104B. Brasília-DF, CEP: 70.058-900. Fone: (61) 3315-3821 / 3315-2151 / 3315-3566. e-mail: cns@saude.gov.br

Você, ou alguém que você indique em caso de óbito ou condição incapacitante, terá o acesso gratuito a todas as informações e resultados associados a seu material biológico, inclusive informações genéticas que possam implicar riscos para doenças não preveníveis ou familiares. Quando tiver necessidade você também terá aconselhamento genético gratuito. É importante afirmar que os seus dados genéticos são confidenciais e que não serão repassados a terceiros. Todas as suas informações genéticas serão guardadas de forma anônima de maneira codificada em um banco de dados guardado por senha. Apenas os pesquisadores envolvidos terão acesso a essas informações.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo "Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue" autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

Participante da pesquisa: (assinatura ou impressão datiloscópica):

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Voluntário:

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisador

# APÊNDICES

## **APÊNDICES**

APÊNDICE A – Artigo não relacionado ao TCC, publicado na revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Fator de impacto: 1,161);

APÊNDICE B - Artigo não relacionado ao TCC, publicado na revista Lancet Infectious Diseases (Fator de impacto: 19,864);

APÊNDICE C – Artigo não relacionado ao TCC publicado na revista Scandinavian Journal of Immunology (Fator de impacto: 2,256);

APÊNDICE D – Artigo não relacionado ao TCC submetido a revista Science of the Total Environment (Fator de impacto: 4,900)

APÊNDICE E – Artigo relacionado ao TCC submetido a revista Emergents Microbes and Infections (Fator de impacto: 5,605)

## APÊNDICE A



## Major Article

## Molecular and clinical epidemiological surveillance of dengue virus in Paraíba, Northeast Brazil

Isabel Cristina Guerra-Gomes<sup>[1],[2]</sup>, Bruna Macêdo Gois<sup>[1]</sup>, Rephaney Fonseca Peixoto<sup>[1]</sup>,  
Camila Alves Oliveira<sup>[3]</sup>, Bruna Leal Lima Maciel<sup>[4]</sup>, Maria Izabel Ferreira Sarmento<sup>[5]</sup>,  
Anna Stella Cysneiros Pachá<sup>[5]</sup>, Josélio Maria Galvão Araújo<sup>[3]</sup>, Ian Porto Gurgel Amaral<sup>[2]</sup>  
and Tatjana Souza Lima Keesen<sup>[1],[2],[3]</sup>

[1]. Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil. [3]. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. [4]. Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil. [5]. Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba, PB, Brasil.

### Abstract

**Introduction:** Despite being the most prevalent arboviral disease worldwide, dengue has been neglected lately. However, recent epidemics of arboviruses such as Zika and chikungunya in locations throughout the world have alerted health authorities to these diseases. This study evaluated the incidence pattern of dengue, its clinical characteristics, and co-circulation of serotypes from 2007 to 2015 in Paraíba State, Northeast Brazil. **Methods:** Data on dengue cases from 2007 to 2015 were extracted from clinical reports of the National System for Notifiable Diseases [*Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN)*] of Brazil provided by the Paraíba Health Department. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays for dengue serotypes were carried out on plasma samples obtained from patients with suspected dengue. The data were analysed using descriptive statistics. **Results:** According to clinical features, dengue fever [ $n = 39,083$  (70.2%)] and dengue without warning signs [ $n = 15,365$  (27.7%)] were the most common classifications of dengue. On RT-PCR, DENV 1 was the most commonly identified serotype (80.5%) in all years studied. Co-circulation of all four DENV serotypes was observed in 2013 and 2014. Furthermore, we observed an increase in dengue notifications in 2015, possibly due to the rise of Zika and chikungunya. **Conclusions:** Our findings support the hypothesis that co-circulation of the four DENV serotypes may be a reason for the increased prevalence of severe forms of dengue in the years studied. This study may contribute to directing research, health policy, and financial resources toward reducing poorly controlled epidemic diseases.

**Keywords:** DENV serotypes. Molecular epidemiology. Arboviruses.

### INTRODUCTION

Dengue has been an endemic disease in Brazil for many decades<sup>1</sup>; however, an unparalleled epidemic of diverse arboviruses, such as Zika and chikungunya, emerged as a new public health risk in 2015. Even though these arboviruses have some unique characteristics, they also share several clinical features that make them difficult to diagnose<sup>2</sup>.

Among Brazilian states, Paraíba has a high prevalence of these arboviruses. Until 2015, there were no notification systems able to distinguish dengue from Zika and chikungunya cases. Currently, all cases are notified as suspected dengue and are only correctly classified after laboratory tests<sup>3</sup>. Molecular surveillance to differentiate these arboviruses is therefore

essential and should result in infections being correctly classified and assessment of the effectiveness of public health approaches, especially towards post-infection clinical outcomes.

Dengue virus (DENV) is one of the most common cause of morbidity and mortality<sup>4</sup> and the most prevalent viral hemorrhagic fever in many tropical countries. It infects approximately 100 million people annually, causing epidemics in urban and peri-urban areas<sup>5</sup>. Southeast Asia has a particularly high disease burden; however, in the last two decades, Latin America and the Caribbean have also seen considerable expansion in case numbers<sup>6</sup>.

Dengue virus is a mosquito-borne virus of the Flaviviridae family and *Flavivirus* genus<sup>7</sup>. Its major vectors are *Aedes aegypti*, which prefers resting in sheltered dark areas inside houses<sup>8</sup>, and *Aedes albopictus*, which is not as well adapted to urban domestic environments, preferring the natural environment<sup>9</sup>.

The illness can be caused by any of the four DENV serotypes, DENV 1, DENV 2, DENV 3, and DENV 4<sup>7</sup>, and presents as

**Corresponding author:** Dra. Tatjana Souza Lima Keesen.

**e-mail:** tat.keesen@cbiotec.ufpb.br

**Received** 12 October 2016

**Accepted** 16 January 2017

## APÉNDICE B

## Correspondence

hospitals from September, 2011, to August, 2014. As the authors wrote, 7-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) became commercially available for Japanese children in February, 2010, and it was incorporated into the routine immunisation schedule for children in April, 2013. Subsequently, 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) has replaced PCV7 since November, 2013.

We are concerned whether serotype replacement had been chronologically observed during the study period. Actually, based on the systematic literature review and pooled data analysis,<sup>2</sup> the authors' group reported that serotype replacement occurred in adult pneumococcal pneumonia cases following the vaccination of children with PCV7 in Japan, although there was a significant decrease (-18.1%, 95% CI -24.6 to -11.5,  $p < 0.001$ ) in the proportion of the PCV7-covered serotypes, there were significant increases in the proportions of serotypes covered by PCV13 but not by PCV7 (+9.9%, 3.3-16.4,  $p = 0.003$ ) and serotypes covered by PPV23 but not by PCV7 (+9.4%, 2.6-16.2,  $p = 0.007$ ).

It should be noted that, since June, 2014, the use of PCV13 for adults aged 65 years or older has been approved in Japan. Concerning the use of PCV13, the US Advisory Committee on Immunization Practices has recommended a dose of PCV13 followed by a dose of PPV23 with more than 1-year intervals between PCV13 and PPV23 for adults aged 65 years or older.<sup>3,4</sup> However, Japanese authorities of infectious diseases have not yet adopted this strategy and only the use of PPV23 is recommended, since the introduction of PCV7 and PCV13 in Japan was later than that of the USA and other countries.<sup>5</sup> If chronological serotype replacement in Japan can be predicted to occur in a similar way as with other countries, the Japanese vaccine policy might be amended in the near future. We would be grateful if the authors could provide comments on how PCV13 should be incorporated

into the routine immunisation programme on the basis of their study results, since such an insight might also be useful for other countries.

EK reports personal fees from Daiichi Sankyo outside the submitted work. All other authors declare no competing interests.

\*Tetsuya Tanimoto, Eiji Kusumi, Kazutaka Hosoda, Tamae Hamaki, Kenzo Takahashi  
tetanimoto@yahoo.co.jp

Navitas Clinic, Tokyo, Japan (TT, EK, KH, TH, KT), and Teikyo University Graduate School of Public Health, Tokyo, Japan (KT)

- 1 Suzuki M, Dhouhadol BG, Ishifuji T, et al. Serotype-specific effectiveness of 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumococcal pneumonia in adults aged 65 years or older: a multicentre, prospective, test-negative design study. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: 313-21.
- 2 Katoh S, Suzuki M, Ariyoshi K, Morimoto K. Serotype replacement in adult pneumococcal pneumonia after the introduction of seven-valent pneumococcal conjugate vaccines for children in Japan: a systematic literature review and pooled data analysis. *Jpn J Infect Dis* 2017; published online Mar 28. DOI: 10.7883/jyoken.jiid.2016.311.
- 3 Tomczyk S, Bennett NM, Stoecker C, et al. Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine among adults aged ≥65 years: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014; **63**: 822-25.
- 4 Kobayashi M, Bennett NM, Gierke R, et al. Intervals between PCV13 and PPSV23 vaccines: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2015; **64**: 944-47.
- 5 The Japanese Association for Infectious Diseases. The Guideline for pneumococcal vaccination in adults aged 65 years or older [Japanese]. 2015. <http://www.kansensho.or.jp/guidelines/065shikenV.html> (accessed April 7, 2017).

### Guillain-Barré syndrome and arboviral infection in Brazil

Among the clinical manifestations associated with the recent Zika infection outbreak in South America and elsewhere are rash, conjunctivitis, Guillain-Barré syndrome (GBS) in exposed adults, and in the newborn so-called congenital Zika syndrome, especially microcephaly.<sup>1</sup> After accumulating epidemiological data

from the French Polynesia<sup>2</sup> outbreak, attention has now focused on Zika infection as a trigger of GBS. The case for a specific, causal association between acute Zika infection and subsequent GBS was strongly made: 42 individuals were diagnosed with GBS, of whom all had Zika neutralising antibodies.

Annelies Wilder-Smith and colleagues<sup>3</sup> correctly highlight the public health threat posed by arboviral disease transmission beyond just Zika infection: South America shows co-circulation of several aedes mosquito-transmitted diseases, often with overlapping symptoms. In 2016, the National International Health Regulations Focal Point of Brazil notified PAHO and WHO of increased GBS, with 1708 cases registered during 2015. In the context of increased GBS cases in Brazil over the past 18 months, attention has focused on Zika as the driving infection.<sup>4</sup> However, in a country with at least nine circulating pathogenic arboviruses, other viral infections could also be implicated. Previous case reports describe GBS following acute dengue infection.<sup>5</sup> In the Paraíba region, we noted that most neurology-referred GBS cases during the height of the Zika virus crisis of 2016 did not necessarily follow acute Zika infections (table). During 2016, Paraíba experienced 9479 chikungunya and 1223 Zika acute cases, which were clinically notified and PCR-verified. Over this same period, there were 13 characterised GBS cases in the region, ten after chikungunya infection, two after dengue infection, and one after Zika infection. Chikungunya cases tended to show respiratory muscle involvement. Meanwhile in the Sergipe region, neurology referrals included a 72-year-old man with GBS who was diagnosed with acute chikungunya by PCR as well as a 22-year-old man who was PCR-positive for both chikungunya and Zika viruses and presented with ascending flaccid paralysis with encephalitis, sleepiness, and disorientation, with

## Correspondence

Sex	Signs and symptoms during viral infection	Decrease in muscle power	Decreased muscle tone	Respiratory muscle involvement	Facial muscle involvement	Hospitalization	ZIKV PCR	Serology, CHIKV, DENV	Diagnosis	Outcome	
34	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	CHIKV IgM	GBS	Recovered
65	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	YES	YES	NEG	CHIKV IgM	GBS	Died
31	M	Fever, myalgia, disorientation	YES	YES	YES	YES	YES	POS	NEG	GBS	Recovered
37	M	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	YES	YES	NEG	CHIKV IgM	GBS	Recovered
56	F	Fever, myalgia, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	DENV IgM	GBS	Died
7	F	Fever, headache, vomiting	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	CHIKV IgG	GBS	Recovered
27	F	–	YES	YES	YES	NO	NO	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
26	F	Headache, vomiting, backpain	YES	YES	NO	NO	NO	NEG	DENV IgM	GBS	Recovered
56	F	Fever, myalgia, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	NO	YES	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
26	F	Headache, vomiting, backpain	YES	YES	NO	NO	YES	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
73	F	Myalgia, arthralgia	YES	YES	NO	YES	NO	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered
67	F	Fever, pain, exanthema, arthralgia	YES	YES	YES	NO	NO	NEG	CHIKV Ig*	GBS	Recovered

Note that GBS could follow chikungunya (CHIKV), dengue (DENV), or Zika (ZIKV) infection. Chikungunya-related GBS often included respiratory muscle involvement. The time between acute infection and GBS was longer and more variable following CHIKV than has been described for ZIKV. \*Clinic records do not indicate whether ELISA detection was IgM or IgG. GBS=Guillain-Barré syndrome.

**Table: GBS cases in Paraíba, Brazil, after acute arboviral infection, by age in years**

MRI revealing a hyperdense left parietal lesion.

The prevalent model of GBS aetiology is that the initial host antimicrobial response is through an innate, T cell-independent antibody repertoire recognising the glycans on lipooligosaccharides—these antibodies then bind to the glycans on nerve gangliosides, especially GM1 and GD1a gangliosides. Many unknowns remain in elucidating the differential glyco-biology of GBS driven by different pathogens. Disease in this setting offers a window for characterisation of the association between different arbovirus triggers, different cross-reactive targets, and differential patterns of disease.

We declare no competing interests.

Tatjana Souza Lima Keesen,  
Roque P de Almeida,  
Bruna Macêdo Gois,  
Rephany Fonseca Peixoto,  
Anna Stella Cysneiros Pachá,  
Fernanda Carolina Fernandes Vieira,  
Marcelo Paixão, Rodrigo Cazzaniga,  
Rosemary J Boyton,  
\*Daniel M Altmann  
d.altmann@imperial.ac.uk

Immunology of Infectious Diseases Laboratory,  
Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba,  
Brazil (TSLK, BMG, RFP); Laboratório de Biologia

Molecular, Hospital Universitario, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Brazil (RpdA, MP, RC); Secretary of Health of Paraíba State, João Pessoa, Paraíba, Brazil (ASCP, FCFV); and Department of Medicine, Imperial College, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK (RJB, DMA)

- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, et al. Zika virus. *N Engl J Med* 2016; **374**: 1552–63.
- Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, et al. Guillain-Barré syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 2016; **387**: 1531–39.
- Wilder-Smith A, Gubler DJ, Weaver SC, et al. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis* 2017; **17**: e101–06.
- Araújo AQ, Silva MT, Araújo AP. Zika virus-associated neurological disorders: a review. *Brain* 2016; **139**: 2122–30.
- Fragoso YD, Gomes S, Brooks JB, et al. Guillain-Barré syndrome and dengue fever: report on ten new cases in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2016; **74**: 1039–40.

## HPV control and resistance in the Middle East and north Africa

We thank Murat Gültekin and Baki Akgül,<sup>1</sup> and we agree wholeheartedly with the fact that Islamic countries, and countries with more conservative sexual views based on religion in general,

should implement educational projects in government-organised programmes. As we mentioned in our original Correspondence,<sup>2</sup> the organisation of intervention policies based on awareness campaigns can be a very effective first step in the control of cervical cancer caused by HPV. However, a point that we would like to stress once more is that acceptance and implementation of these programmes, and in effect also vaccines, can be faced with difficulties because of stigmatisation that is based on religious and traditional values. One fact to keep in mind, is that using Turkey as a success story and example for the Middle East and north Africa (MENA) region at large can be difficult. For one, Turkey is not a traditional Islamic country, as was described in the letter by Gültekin and Akgül, but rather a secular and stable progressive state in which HPV and its vaccination are becoming a hot medical topic<sup>3</sup> among the younger generation. However, the MENA region is very politically, culturally, and economically diverse and houses countries with the highest per capita incomes in the world while also being home to some of the most severely poverty-stricken

## APÊNDICE C

Received: 7 February 2018 | Accepted: 19 April 2018

DOI: 10.1111/sji.12668

HUMAN IMMUNOLOGY

WILEY  Immunology

## Dual immune effect of iNKT cells considering human cutaneous and visceral leishmaniasis: An example of cell plasticity according to different disease scenarios

B. M. Gois<sup>1</sup> | R. F. Peixoto<sup>1</sup> | B. L. L. Maciel<sup>2</sup> | J. A. S. Gomes<sup>3</sup> |  
 F. L. A. A. de Azevedo<sup>4</sup> | R. C. Veras<sup>4</sup> | I. A. de Medeiros<sup>4</sup> | T. C. S. de Lima Gris<sup>5</sup> |  
 D. A. M. de Araújo<sup>5</sup> | I. P. G. do Amaral<sup>1</sup> | T. S. L. Keesen<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>2</sup>Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

<sup>3</sup>Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>4</sup>Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>5</sup>Department of Biotechnology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

### Correspondence

T. Keesen de Souza Lima, Laboratory of Immunology of Infectious Diseases of the Biotechnology Center of the Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.  
 Email: tat.keesen@cbiotech.ufpb.br

### Abstract

Although the semi-invariant natural killer T cells (iNKT) are a small subpopulation of cells in the peripheral blood, they are presumed to play a role in early stages of infection against various pathogens, including protozoa. This work investigates the activation status and cytokine profile of iNKT cells during human *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* infection. We studied iNKT cells in patients with symptomatic active visceral leishmaniasis (AVL) (n = 8), patients with symptomatic active cutaneous leishmaniasis (ACL) (n = 13), negative endemic controls (NEC) (n = 6) and non-endemic controls (NonEC) (n = 6), with and without total *Leishmania* antigen stimulus (TLA). The number of iNKT cells in the peripheral blood of patients with ACL and AVL unaltered in relation to control groups. Moreover, the iNKT cells from ACL showed a hyperactivation profile compared to patients with AVL. Additionally, TLA induced IFN-gamma production in iNKT cells from patients with ACL, while in iNKT of patients with AVL, TLA induced a decrease in this cytokine. Higher IL-17 and IL-10 production by iNKT cells from patients with ACL were also observed compared to all other groups. There were no changes in iNKT IL-10-producing cells in AVL after TLA stimulation. However, TLA induced increase in IL-10 in iNKT cells in patients with ACL. These findings suggest that, although iNKT cells showed distinct profiles in patients with ACL and AVL, they play a dual role in immune modulation in both *Leishmania* infections.

## 1 | INTRODUCTION

NKT cells constitute a subpopulation of T cells that recognize glycolipid antigens presented by CD1d molecules.<sup>1</sup> Semi-invariant NKT (iNKT) cells are a major subset of those cells and they are effector cells, sharing

features with other conventional T lymphocytes.<sup>2</sup> They are unique in the response to infections because of their rapid release of IL-4, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ <sup>3,4</sup> and because they share features not only with Th1 and Th2 cells but also with Th17 cells.<sup>5-7</sup> Human iNKT cells have been reported in peripheral blood, liver and in the bone marrow. In humans,<sup>2</sup> iNKT cells express a predominantly invariant TCR V $\alpha$ 24 J $\alpha$ 18 preferentially associated with V $\beta$ 11.<sup>1,8</sup>

B. de Gois Macêdo and R. F. Peixoto are contributed equally to this work.

## APÊNDICE D

1

1 **Correlation of dengue incidence and rainfall occurrence using wavelet transform for João Pessoa**  
2 **City**

3  
4 Celso Augusto Guimarães Santos<sup>1\*</sup>, Isabel Cristina Guerra-Gomes<sup>2</sup>, Bruna Macêdo Gois<sup>2</sup>, Rephany  
5 Fonseca Peixoto<sup>2</sup>, Tatjana de Souza Lima Keesen<sup>2</sup>, Richarde Marques da Silva<sup>3</sup>

6  
7 <sup>1</sup>Federal University of Paraíba, Department of Civil and Environmental Engineering, 58051-900 João Pessoa, PB,  
8 Brazil

9 <sup>2</sup>Federal University of Paraíba, Department of Molecular and Cellular Biology 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

10 <sup>3</sup>Federal University of Paraíba, Department of Geosciences, 58051-900 João Pessoa, PB, Brazil

11 \*Corresponding author: [celso@ct.ufpb.br](mailto:celso@ct.ufpb.br)

12

13 **Abstract** Dengue, a reemerging disease, is one of the most important viral diseases transmitted by  
14 mosquitoes. Climate is considered a key factor in the temporal and spatial distribution of vector-transmitted  
15 diseases. Thus, this study analyzed the relationship between rainfall occurrence and dengue incidences  
16 reported from 2007 to 2015 in João Pessoa City, Paraíba State, Brazil, by means of wavelet transform, when  
17 the frequency analysis of both rainfall and dengue incidence signals were performed. In order to identify  
18 the influence of rainfall on the dengue cases, different distribution lag models using negative binomial  
19 distribution were considered. In this study, 55,680 cases of dengue between 2007 and 2015 were reported,  
20 with peaks in 2015, 2011 and 2013. The correlation between rainfall and the occurrence of dengue cases  
21 showed that the cases increased in the first months after the rainy season. Occurrence of dengue cases was  
22 observed during all the study period, and the rainfall-lag per three months showed a positive correlation  
23 with the number of dengue cases, whereas the sector with significant common power where both time series  
24 were in phase were revealed by the cross-wavelet analysis. Thus, this approach to analyze surveillance data  
25 might be useful to future health politics for dengue prevention and control.

26 **Keywords** Dengue, Brazil, GIS, rainfall, TRMM, wavelet

1

## APÊNDICE E

1

### **Regulatory T cells during acute arboviral infection: Treg expansion is a feature of acute Zika but not Chikungunya infection**

Bruna Macêdo Gois <sup>1, #</sup>, Isabel Cristina Guerra-Gomes<sup>2</sup>, Cíntia Nóbrega de Sousa Dias<sup>4</sup>,  
Josélio Maria Galvão Araújo<sup>3</sup>, Demétrius Antônio Machado Araújo<sup>4</sup>, Robson Cavalcante  
Veras<sup>4</sup>, Isac Araújo Medeiros<sup>4</sup>, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo<sup>4</sup>, Rosemary  
J Boyton<sup>5</sup>, Danniell M Altmann<sup>5, #</sup>, Tatjana Souza Lima Keesen<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup> Immunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology;

<sup>2</sup> Post-graduation Program in Biotechnology, Center of Biotechnology of Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB;

<sup>3</sup> Molecular Biology of Cancer and Infectious Diseases Laboratory of Post-Graduation Program on Parasite Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN;

<sup>4</sup> Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

<sup>5</sup> Department of Medicine, Imperial College, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK (RJB, DMA)

# These authors contributed equally to this work

**Key words:** Zika virus; Dengue virus; Chikungunya virus; T cell immunity; regulatory T cell

**Running Title:** Treg cells during arboviral infection

**\*Corresponding author:** Tatjana Keesen de Souza Lima; Tel: +55 83 32167173; E-mail: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br. Department of Cellular and Molecular Biology - Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, state of Paraíba, 58051-900, Brazil.

**Abstract Word Count:** 50

**Text Word Count:** 1534