

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

PEDRO HENRIQUE DE SOUSA PALMEIRA

**AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DE CÉLULAS T CD4 EM HUMANOS
INFECTADOS COM O VÍRUS DA CHIKUNGUNYA**

João Pessoa - PB
2020

PEDRO HENRIQUE DE SOUSA PALMEIRA

**AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DE CÉLULAS T CD4 EM HUMANOS
INFECTADOS COM O VÍRUS DA CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências para
a obtenção do grau de bacharel em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatjana Keesen de Souza Lima

JOÃO PESSOA - PB
2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P172a Palmeira, Pedro Henrique de Sousa.
AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DE CÉLULAS T CD4 EM HUMANOS
INFECTADOS COM O VÍRUS DA CHIKUNGUNYA / Pedro Henrique
de Sousa Palmeira. - João Pessoa, 2020.
94 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.
Monografia (Graduação) - UFPB/Biotecnologia.

1. CITOCINA. 2. CD73. 3. CTLA-4. I. Lima, Tatjana
Keesen de Souza. II. Título.

UFPB/BC

João Pessoa, 18 de março de 2020.

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dezoito dias do mês de março de 2020, às 10:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo(a) Professor(a) Dr(a). Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente (DBCM/CBIOTEC/UFPB) e composta pelo(a)s avaliadore(a)s: 1. Prof(a). Dr(a). Márcia Regina Piuvezam (UFPB); 2. M.e Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva (PGPNSB/UFPB), o(a) discente Pedro Henrique de Sousa Palmeira, matrícula 11507473, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: “**AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS DE CÉLULAS T CD4 EM HUMANOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA *Chikungunya***”, 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(ao) 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, pelo(a)s demais avaliadore(a)s e pelo(a) discente.

Tatjana Keesen de Souza Lima

Presidente da Banca Examinadora

Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva

Avaliador(a) 2

Márcia Regina Piuvezam

Avaliador(a) 1

Pedro Henrique de Sousa Palmeira

Discente

Dedico este trabalho a DEUS e aos meus pais e irmãos por sempre me tranquilizarem e acreditarem em mim quando eu mesmo não acreditava.

AGRADECIMENTOS

DEUS, sou profundamente grato por toda experiência vivida ao longo desses pouco mais de 4 anos. Sei que não merecia nem mereço tantas bênçãos e conquistas, porém, muito obrigado pelo Vosso amor bem como por vossa presença em minha vida e de toda minha família! A Nossa Senhora e mãe, também dirijo minha gratidão por toda proteção, amor e interseção ao longo de minha existência.

Aos meus pais, Iran Palmeira e Maria Belarmino, obrigado por nunca medirem esforços para proporcionar a mim e meus irmãos uma educação de qualidade. Obrigado por todo amor e carinho e por sempre nos educarem nos caminhos de DEUS. Sou grato por toda calma transmitida ao longo de toda a graduação e por sempre acreditarem em mim, quando eu mesmo não acreditei. Quero que saibam que os amo demais e que vocês, minha família, são aquilo que eu tenho de mais precioso.

Tia Lourdes e família, quero deixar claro o quão importante vocês são em minha vida. Obrigado por todo apoio financeiro durante todos esses anos. Obrigado por toda confiança e, principalmente, por serem exemplo de honestidade, doação e bondade. Amo muito vocês.

Agradeço também a todos os integrantes do LABIDIC. No entanto, destaco alguns amigos que foram essenciais para o meu crescimento como pessoa e estudante. Tat, nossa mãe científica, obrigado pela confiança e paciência e por todas as oportunidades a mim proporcionadas. Sou extremamente grato a senhora por me acolher e permitir conhecer pessoas especiais que, sinceramente, considero minha família fora de casa. Aprecio muito a maneira como a senhora nos conduz, sempre prezando pelo trabalho em equipe e pelo respeito. Espero, um dia, poder retribuir tudo aquilo que fez por mim.

Cinthia, você foi a primeira pessoa do lab que fiz contato. Saiba que mesmo no início de minha caminhada no laboratório, não me sentia isolado, pois você assim como a receptividade que tive de cada um, não permitiram me sentir assim. Obrigado por todos os ensinamentos. Fany e Bruna, vocês me ajudaram a tomar coragem para enfrentar minhas inseguranças através de atitudes que apenas verdadeiros amigos são capazes de fazer. Obrigado por cada palavra, por cada

ajuda, por cada risada e por tornar os momentos finais da graduação menos exaustivos.

Fany (mais uma vez) e Nanda, atualmente vocês são uma das razões que fazem esse final de curso valer a pena. Obrigado por toda ajuda e por todos os ensinamentos. Agradeço também pela confiança de partilhar comigo seus momentos bons e ruins. Fico feliz em saber que confiam em mim. Saibam que o sentimento é recíproco.

Fátima, a senhora foi e é nossa salvação durante vários momentos. Uma excelente profissional além de ser uma pessoa de muita luz. Agradeço por muitas vezes nos ajudar em nossos experimentos e em momentos que as condições da Universidade não ajudaram. Desejo tudo o que há de melhor para a senhora. Obrigado, mais uma vez!

Aos meus amigos de turma principalmente Emmely, Matias, Lua, Ray, Anchieta, Rodrigo, Natan e Hércules, vocês foram essenciais para minha adaptação em João Pessoa. Will, Karol, Eveline, Lucas, Jacielle e Juliana muito obrigado pelos bons momentos, principalmente durante as refeições no RU. Obrigado pelos conselhos ao longo do curso.

Por fim, agradeço imensamente a todos os voluntários que cederam parte de seu tempo para que pudéssemos realizar a coleta das amostras para execução da pesquisa. Também expresso minha gratidão ao CNPq pelo fornecimento de bolsas relacionadas ao programa de Iniciação Científica bem como à UFPB pelo aporte financeiro em outras áreas que foram essenciais para meu estabelecimento em João Pessoa.

RESUMO

A febre da Chikungunya (CHIKF) é uma doença aguda seguida de artralgia grave sendo o vírus (CHIKV) transmitido por fêmeas de mosquitos dípteros do gênero *Aedes*. Composto de RNA de fita simples, o genoma viral codifica um total de 10 proteínas sendo 4 não estruturais e 6 estruturais. Desde que foi isolado em 1952, surtos da doença foram confirmados em diversos países gerando transtornos sociais e econômicos. Embora avanços tenham sido realizados ao longo dos anos sobre a participação da imunidade inata e adaptativa na doença, ainda são necessárias pesquisas objetivando um melhor entendimento acerca das respostas do sistema imune nas fases aguda e crônica. Assim, visando melhor compreensão acerca dos mecanismos imunológicos envolvidos com o estabelecimento da infecção pelo CHIKV, foram analisadas a frequência populacional de linfócitos T CD4, além da síntese das citocinas interleucina 10 (IL-10), Fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e interferon- γ (IFN- γ), e a expressão das ectoenzimas CD39 e CD73 e dos receptores inibitórios proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) e proteína de morte celular programada 1 (PD-1) nas fases aguda e crônica da doença. Para isso, foram coletadas amostras sanguíneas de 7 pacientes acometidos com a Chikungunya na fase aguda (CHIK.A), 4 pacientes acometidos com a Chikungunya em fase crônica (CHIK.C), bem como 7 voluntários saudáveis compondo o grupo controle (CTL). Para caracterização fenotípica das células T CD4 bem como análise da produção de citocinas, enzimas e receptores, as amostras foram submetidas a lise de hemácias e, posteriormente, adquiridas em citômetro de fluxo. A análise dos dados revelou redução na frequência populacional de linfócitos T CD4 durante a fase aguda. Quanto a produção das citocinas IL-10 e IFN- γ , observou-se aumento na fase aguda, seguida de diminuição no estágio crônico. No entanto, a produção da TGF β se mostrou inalterada em ambas as fases, resultado também observado para a expressão de CD39. Por outro lado, a ectonucleotidase CD73 se mostrou reduzida nos grupos agudo e crônico enquanto que a co-expressão CD39/CD73 apresentou redução em fase crônica. Quanto ao PD-1, não foram reveladas diferenças estatísticas significativas enquanto que a fase aguda apresentou aumento na produção do CTLA-4. No grupo crônico, por sua vez, não houve diferença estatística significativa quanto à produção deste receptor. Sugere-se, portanto, que o estabelecimento da fase crônica poderia ser facilitado pelo aumento de ações imunossupressoras observadas no estágio agudo. Neste, por sua vez, a maior produção de IFN- γ assim como redução na expressão de CD73, auxiliaria em um quadro pró-inflamatório o qual contribuiria com o desenvolvimento de alguns sinais clínicos.

Palavras-Chave: Citocina. CD73. CTLA-4.

ABSTRACT

Chikungunya fever (CHIKF) is an acute illness followed by severe arthralgia. The virus (CHIKV) is transmitted by female *Aedes* dipterous mosquitoes. Composed of single-stranded RNA, the viral genome encodes a total of 10 proteins, 4 non-structural and 6 structural. Since it was isolated in 1952, outbreaks of the disease have been confirmed in several countries, generating social and economic disorders. Although advances have been made over the years on the role of innate and adaptive immunity in the disease, research is still needed in order to better understand the responses of the immune system in the acute and chronic phases. Thus, aiming a better understanding of the immunological mechanisms involved with the establishment of CHIKV infection, the population frequency of CD4 T lymphocytes was analyzed, along to the synthesis of cytokines interleukin 10 (IL-10), Growth Transformation Factor β (TGF- β) and Interferon- γ (IFN- γ), the expression of ectoenzymes CD39 and CD73 and inhibitory receptors Protein Associated with Cytotoxic T Lymphocytes 4 (CTLA-4) and Programmed Cell Death Protein 1 (PD-1) in the acute phases and chronic. For this purpose, blood samples were collected from 7 patients affected with Chikungunya in the acute phase (CHIK.A), 4 patients affected with Chikungunya in the chronic phase (CHIK.C) and 7 healthy volunteers composing the control group (CTL). For phenotypic characterization of CD4 T cells as well as analysis of the production of cytokines, enzymes and receptors, the red blood cells were lysed and leukocytes acquired in a Flow Cytometer. Data analysis revealed a reduction in the population frequency of CD4 T lymphocytes during the acute phase. The production of the cytokines IL-10 and IFN- γ increased in the acute phase returning to basal levels in the chronic stage. However, the production of TGF β was unchanged in both phases, a result also observed for the expression of CD39 and coexpression of CD39 / CD73. On the other hand, CD73 ectonucleotidase was shown to be reduced in the acute and chronic groups. As for PD-1, statistically significant differences were not observed while the acute phase showed an increase in CTLA-4 production. In the chronic group there was no statistically significant difference regarding the production of this receptor. It is suggested, therefore, that the establishment of the chronic phase could be facilitated by the increase in immunosuppressive actions observed in the acute stage. The greater production of IFN- γ as well as a reduction in CD73 expression in acute phase, would assist in a development of pro-inflammatory microenvironment which would contribute with some clinical signs.

Keywords: Cytokine. CD73. CTLA-4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstração esquemática da estrutura do CHIKV	28
Figura 2. Representação esquemática do RNA do CHIKV	29
Figura 3. Representação esquemática da replicação do CHIKV.....	32
Figura 4. Estratégia de análise para seleção dos linfócitos T CD4+	49
Figura 5. Representação das alterações imunológicas entre os grupos controle, agudo e crônico.....	69
Figura 6. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	90
Figura 7. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de casos suspeitos no Brasil, região Nordeste e estado da Paraíba.....	26
Gráfico 2. Análise comparativa entre o estado da Paraíba com os demais estados da região Nordeste.....	27
Gráfico 3. Proporção sintomatológica de indivíduos acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase aguda utilizados no projeto.....	53
Gráfico 4. Proporção sintomatológica de indivíduos acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase crônica utilizados no projeto.....	54
Gráfico 5. Frequência de células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya em fase aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	55
Gráfico 6. Produção de IL-10 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	56
Gráfico 7. Produção de TGF β pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	56
Gráfico 8. Produção de INF- γ pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	57
Gráfico 9. Expressão de CD39 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	58
Gráfico 10. Expressão de CD73 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	58
Gráfico 11. Co-expressão de CD39/CD73 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	59
Gráfico 12. Expressão de PD-1 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	60
Gráfico 13. Produção da CTLA-4 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização de indivíduos integrantes do grupo controle por idade e gênero.	51
Tabela 2. Caracterização por idade, gênero, tempo de coleta de amostras e sintomatologia de pacientes acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase aguda.	52
Tabela 3. Caracterização por idade, gênero, tempo de coleta de amostras e sintomatologia de pacientes acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase crônica.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.	<i>Aedes</i>
Ad	Adenosina
AR	Artrite Reumatóide
ATP	Adenosina Trifosfato
CCL2	<i>C-C Motif Chemokine Ligand 2</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CD39	<i>Cluster of Differentiation 39</i>
CD73	<i>Cluster of Differentiation 73</i>
CD80	<i>Cluster of Differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of Differentiation 86</i>
CD94	<i>Cluster of Differentiation 94</i>
CD95	<i>Cluster of Differentiation 95</i>
cDNA	DNA complementar
CHIKF	Febre da Chikungunya
CHIKV	Vírus da Chikungunya
CHIKVA	Chikungunya Fase Aguda
CHIKVC	Chikungunya Fase Crônica
CG	Complexo de Golgi
CONEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CTL	Grupo Controle
CTLA-4	Antígeno Associado a Linfócito T Citotóxico 4

DC	Célula Dendrítica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECSA	Leste/Central/Sul Africano
FSC	<i>Forward Scatter</i>
IFN γ	Interferon γ
IgG	Imunoglobulina G
IgG3	Imunoglobulina de subclasse G3
IgM	Imunoglobulina M
IL6	Interleucina 6
IL8	Interleucina 8
IL10	Interleucina 10
iTreg	Célula T reguladora Induzida
LABIDIC	Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas
LCVM	Vírus da Coriomeningite Linfocitária
MCP1	Proteína de quimioatratadores de Monócitos-1
NK	Natural Killer
Nm	Nanômetro
nsP	Proteína Não Estrutural
nTreg	Células T reguladoras Naturais
OA	Oeste Africano
ORF	Janela de Leitura Aberta
PB	<i>Permeabilization Buffer</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PC	Proteínas do Capsídeo

PD1	Proteína de Morte Celular Programada 1
PPE	Poliproteína Estrutural
PHB	Proibitina
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Transcriptase Reversa -Reação de Cadeia Polimerase
SDA	Solução Diluidora de Anticorpos
SSC	<i>Side Scatter</i>
SSF	Sinoviócitos Semelhantes a Sibroblastos
SSM	Células Sinoviais semelhantes a Sacrófagos
ST	Sangue Total
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de Célula T
TF	Transfame
TGF β	Fator de Transformação do Crescimento β
Th	<i>T helper</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
Treg	T regulador
UPA	Unidade de Pronto Atendimento

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1	EPIDEMIOLOGIA.....	24
2.3	REPLICAÇÃO VIRAL.....	30
2.5	SINAIS E SINTOMAS	34
2.6	IMUNOLOGIA DA CHIKUNGUNYA.....	35
2.6.1	Imunidade Inata.....	35
2.6.2	Imunidade Adaptativa.....	36
3.	OBJETIVOS.....	42
3.1	OBJETIVO GERAL	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	44
4.2	SELEÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE, AGUDO E CONTROLE	44
4.3	AMOSTRAS CLÍNICAS.....	44
4.4	CONTROLE VIRAL.....	45
4.5	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL	45
4.6	TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (qRT-PCR) PARA DETECÇÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA.....	45
4.7	OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	45
4.7.1	Lise de hemácias.....	45
4.7.2	Plaqueamento celular	46
4.7.3	Marcação de parâmetros extra e intracelulares.....	46
4.8	ANTICORPOS MONOCLONAIS (MABS)	47
4.9	AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE DADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	48
4.10	ESTRATÉGIA DE ANÁLISE	48
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5.	RESULTADOS	51
5.1	ANÁLISE SINTOMATOLÓGICA NOS GRUPOS AGUDO E CRÔNICO.....	51

5.2	FREQUÊNCIA POPULACIONAL DE LINFÓCITOS T CD4	55
5.3	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS LINFÓCITOS T CD4 DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM HUMANOS. 55	
5.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES CD39 E CD73 PELOS LINFÓCITOS T CD4 DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM HUMANOS.	57
5.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR PD-1 E DA PRODUÇÃO DO RECEPTOR CTLA-4 PELOS LINFÓCITOS T CD4 DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM HUMANOS.	59
6.	DISCUSSÃO.....	62
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
8.	REFERÊNCIAS	73
9.	GLOSSÁRIO.....	88
10	ANEXOS	90

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O vírus da Chikungunya (CHIKV), pertencente ao gênero *Alphavirus* e à família *Togaviridae*, teve origem no continente africano. Seu nome, derivado da língua Makonde, província da região da Tanzânia, significa “Aquele que se curva” em virtude das fortes dores articulares que acometem parte dos infectados (ZELLER, BORTEL e SUDRE, 2016). Após algumas décadas do seu isolamento, em 1952, casos da doença foram notificados em todos os continentes ocasionando transtornos sociais e econômicos (VAIRO et al., 2019). No Brasil, em 2018, 76.742 registros foram inseridos no contexto de casos prováveis para a doença, aumentando para mais de 100.000 casos em 2019 (BRASIL, 2019).

A disseminação viral ocorre, principalmente, através do repasto sanguíneo de mosquitos do gênero *Aedes* (A.). Na região africana, caracterizada pelo ciclo de transmissão silvestre, as espécies *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. dalzieli*, *A. luteocephalus*, *A. vittatus* e *A. cordellier* são responsáveis pela infecção de animais não sendo observadas, no entanto, manifestações clínicas (WALDOCK et al., 2016; ZELLER, BORTEL e SUDRE, 2016). Por outro lado, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* se enquadram como os principais vetores envolvidos no ciclo de transmissão urbana (TSETSARKIN et al., 2011).

Em humanos, após o período de incubação que varia de 2 a 12 dias, manifestações clínicas podem surgir. Estas, de acordo com a extensão e duração dos sinais clínicos, dividem-se em três estágios. Na fase aguda, tem-se febre alta acima de 39°C, poliartralgia, mialgia, cefaleia, fotofobia, erupções cutâneas, vômito, diarreia e dores abdominais (PETITDEMANGE, WAUQUIER e VIEILLARD, 2015; CUNHA E TRINTA, 2017). Após 21 dias, dores articulares intensas podem permanecer, o que caracteriza a fase pós-aguda (MCCARTHY, DAVENPORT e MORRISON, 2018). Já a cronicidade da doença caracteriza-se pela persistência no quadro de poliartralgia por meses ou anos, apresentando menor intensidade quando comparado às primeiras semanas da doença (PETITDEMANGE, WAUQUIER e VIEILLARD, 2015; PAIXÃO et al., 2018).

Acerca dos mecanismos imunológicos estimulados pela infecção do CHIKV, pesquisas em modelos animais revelaram que macrófagos/monócitos auxiliam na imunopatologia da Chikungunya através de sua capacidade migratória para regiões infectadas, contribuindo com o desenvolvimento de características clínicas edemas articulares e perda de massa óssea (MICHLMAIR et al., 2018). Ademais, ao atuarem como reservatórios virais, auxiliam na disseminação e persistência do vírus (PETITDEMANGE, WAUQUIER e VIEILLARD, 2015).

As células Natural Killers (NK), por sua vez, desempenham ação fundamental no início da doença, contribuindo com um eficiente papel protetor poucos dias após a inoculação do vírus. (MAUCOURANT et al., 2019). Através de mecanismos citotóxicos e produção de citocinas, as NKs auxiliam no controle da doença, principalmente através da eliminação de células infectadas (THANAPATI et al., 2015). No entanto, ao apresentarem capacidade migratória para regiões articulares, as NKs contribuem com a criação de um microambiente pró-inflamatório auxiliando, assim, na inflamação articular (MAUCOURANT et al., 2019).

A resposta adaptativa também se mostra essencial no estabelecimento e desenvolvimento das características da doença. Assim, cita-se a atuação dos linfócitos B no controle da infecção através da síntese de anticorpos (LONG e HEISE, 2016), com a consequente opsonização de estruturas patogênicas e ativação do sistema complemento (PETITDEMANGE, WAUQUIER e VIEILLARD, 2015). Além disso, a produção do isotipo IgG3 nos momentos iniciais da doença parece estar relacionados não apenas com o clearance viral, mas também com menor risco de persistência dos sintomas (KAM et al., 2012).

Enquanto os linfócitos T CD8+ parecem não contribuir com a imunopatologia ou clearance viral durante a fase aguda, as células T CD4+ efetoras exibem capacidade de migração para regiões sinoviais auxiliando nos sinais clínicos da doença (FOX; DIAMOND, 2017). Além disso, pesquisas em modelos animais demonstram a ação das células T auxiliaadoras como uma das principais mediadoras da inflamação, formação de edemas e danos teciduais na doença (TEO et al., 2013).

Nessa conjuntura, destaca-se a participação de determinadas subpopulações de linfócitos T CD4+, como as Th17, presente não apenas em infecções causadas por *alphavirus*, mas também em determinadas doenças autoimunes como artrite

reumatoide (LEE et al., 2015). Citocinas características da subpopulação Th1 também se mostraram elevadas em tecidos inflamados e soro de camundongos infectados com o CHIKV (TEO et al., 2013). Além disso, estudos mostram a ação de células T reguladoras (Treg) na atenuação de respostas pró-inflamatórias, contribuindo assim, com a diminuição da gravidade sintomatológica (LEE et al., 2015).

Assim, cientes da importância dos linfócitos T CD4+ na imunopatologia da Chikungunya, torna-se notório a necessidade de maiores estudos acerca dos mecanismos envolvidos nas fases aguda e crônica da doença. Nessa conjuntura, o presente estudo objetivou avaliar as respostas de tais células em pacientes infectados pelo vírus, visando corroborar com achados presentes no campo das arboviroses. Além disso, ao traçarmos parte do perfil imunológico dos linfócitos T auxiliares envolvidos na infecção pelo CHIKV, esperamos contribuir com a descoberta de potenciais alvos terapêuticos que possam proporcionar uma melhor qualidade de vida aos que sofrem com as consequências da doença.

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA

A febre da Chikungunya é uma doença causada por um vírus de mesmo nome com origem no continente africano. Isolado inicialmente na região da Tanzânia, em 1952, o termo Chikungunya deriva da língua Makonde cujo significado, “aquele que se curva”, remete as fortes dores articulares e debilitantes sofridas por parte dos acometidos (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015). O CHIKV, que pertence à família *Togaviridae*, faz parte do gênero *Alphavirus*, grupo este que engloba 31 viroses, sendo 7 responsáveis por desencadear dores articulares. (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Estudos sugerem que os primeiros casos da Chikungunya tenham ocorrido no século 18 nas regiões do Egito, África, Arábia Saudita e Sudeste asiático. Na segunda metade do século 19, acredita-se que uma epidemia no arquipélago de Zanzibar, África, foi disseminada para regiões asiáticas e americanas (HLASTEAD, 2015). No entanto, o primeiro surto comprovado da doença em humanos ocorreu em 1952 na região da Tanzânia, onde o vírus foi isolado pela primeira vez (SILVA; DERMODI, 2018).

A partir de 1952 ocorrências de proporções variadas foram notificadas, com destaque para o continente asiático. Entre as décadas de 50 e 60, a população tailandesa foi acometida por diversos surtos que resultaram em 31% da sociedade soropositiva para o vírus. Em Mandras, por sua vez, 40% da população foi acometida pelo CHIKV entre 1962 e 1964, enquanto que no ano de 1973 em Barsi, Índia, a taxa de infecção populacional atingiu cerca de 37% (PETERSEN; POWERS, 2016).

Os surtos mais recentes da Chikungunya tiveram início em 2004, sendo os genótipos ECSA e asiático os principais responsáveis pelos casos em regiões tropicais e subtropicais (PETERSEN; POWERS, 2016). No mesmo ano, uma epidemia no Kenya se disseminou para as regiões africanas de Mayotte, Comores, Madagascar e ilha de La Reunion (SHARMA et al, 2017).

Nas ilhas de La Reunion, em 2005, um limitado número de casos foi notificado devido à baixa frequência populacional do mosquito *Aedes aegypti*. No

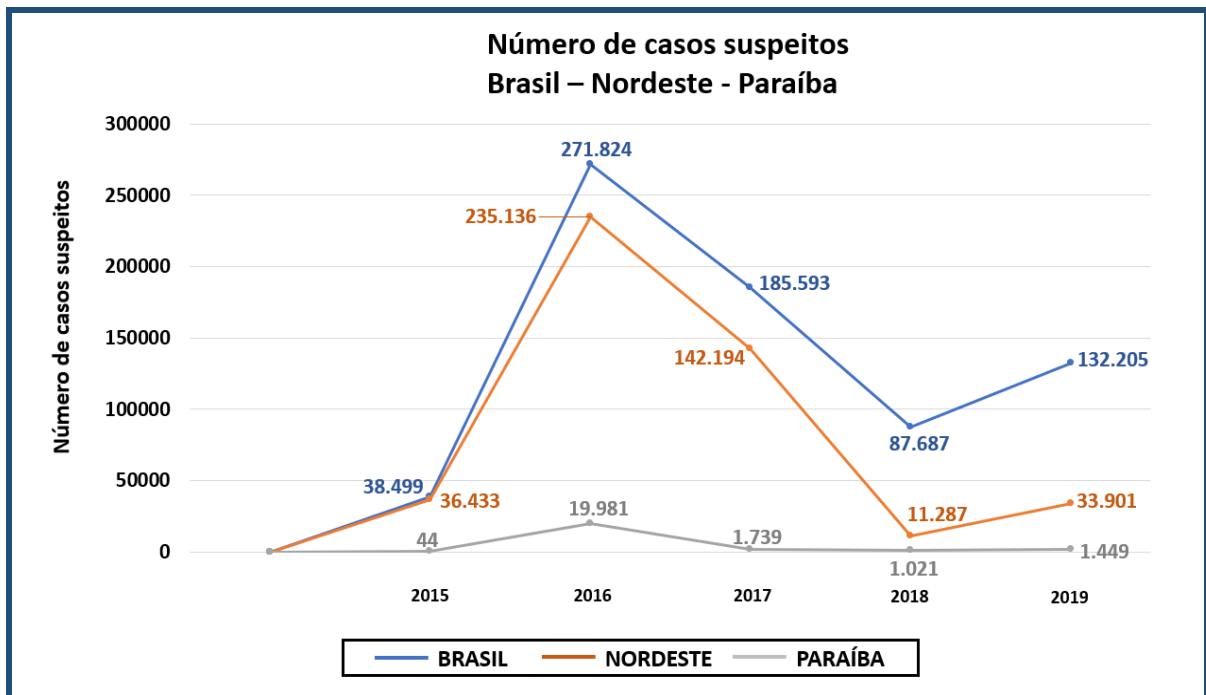
entanto, mutações em compostos estruturais do vírus facilitaram sua adaptação à espécie *Aedes albopictus*, resultando em um terço da população humana infectada (PETERSEN; POWERS, 2016), visto a elevada densidade populacional do inseto na região (JR et al, 2018). Além disso, essa adaptação facilitou a disseminação do vírus para a Índia (PETERSEN; POWERS, 2016), onde, em 2006, cerca de 1.4 milhão de pessoas foram acometidas pela doença (SHARMA et al, 2017).

Em 2007, o vírus alcançou o norte da Itália, levado, possivelmente, por um viajante indiano. Emilia Romagna correspondeu a região mais afetada, com cerca de 200 casos confirmados (POLLETTI et al, 2018). Três anos depois, casos autóctones foram notificados na França. No mesmo ano, Indonésia, Myanmar, Tailândia, Maldivas e Ilha de La Reunion registraram casos da doença (JR et al, 2018). Em outubro de 2013, as primeiras ocorrências de Chikungunya foram relatadas no continente americano, mais especificamente no Caribe, sendo o genótipo asiático a linhagem prevalente (SILVA et al, 2018).

No Brasil, em setembro de 2014, foram registrados os dois primeiros casos de transmissão autóctone (de origem no próprio país), sendo em Oiapoque, Amapá, identificada a linhagem asiática e em Feira de Santana, Bahia, o genótipo ECSA (SILVA et al, 2018). Em 2015, dos 38.499 casos suspeitos distribuídos em 704 cidades, 17.971 obtiveram confirmação no qual 14 óbitos pela doença foram relatados nos estados de Pernambuco (7), Bahia (5) e Sergipe (2) (BRASIL, 2017).

Entre os anos de 2015 e 2016, a região Nordeste concentrou o maior número de notificações com 36.433 (94,63%) e 235.136 (86,5%) casos suspeitos, respectivamente. Nesse período, o Estado da Paraíba apresentou 44 e 19.981 casos prováveis (BRASIL, 2017). Por outro lado, observou-se uma redução considerável na frequência de prováveis infecções pelo CHIKV nos anos de 2017 (1.739) e 2018 (1.021) com pequeno aumento em 2019 (1.449) em relação ao ano anterior (BRASIL, 2019; BRASIL, 2020) (Gráfico 1).

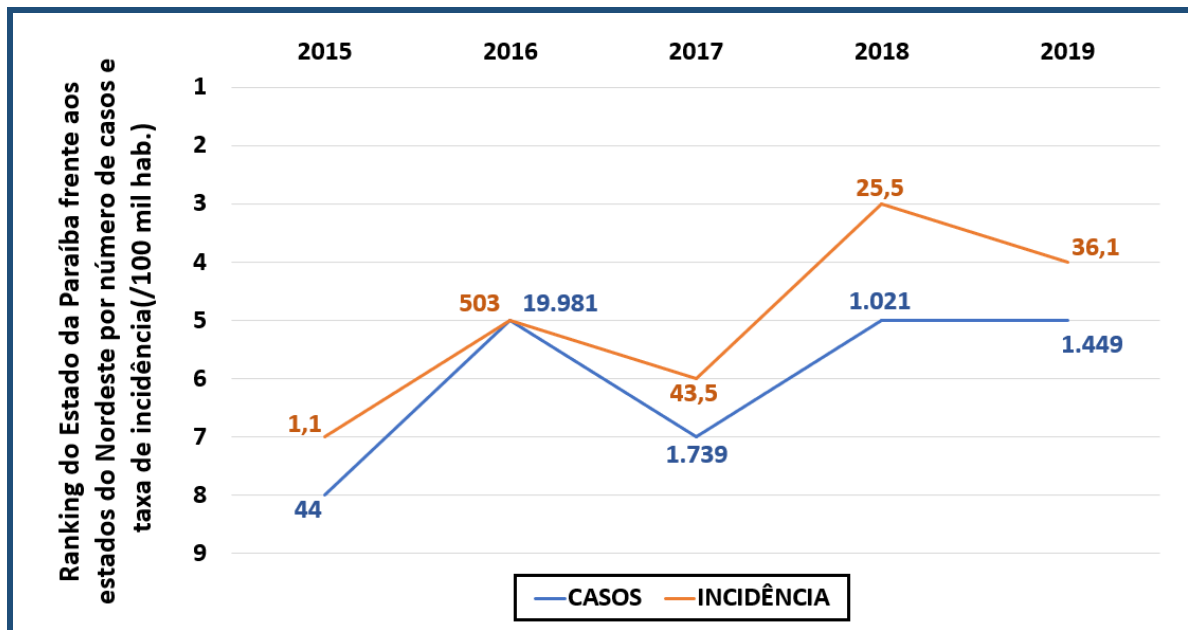
Gráfico 1. Número de casos suspeitos no Brasil, região Nordeste e estado da Paraíba.



Fonte: Adaptado de dados divulgados pela Secretaria de Saúde entre os anos de 2017 e 2020. A imagem mostra as oscilações quanto ao número de casos suspeitos no país entre os anos de 2015 e 2019.

A análise comparativa do número de casos suspeitos entre os estados do Nordeste revela que a Paraíba não se configurou entre os 3 mais acometidos. No entanto, ao se avaliar a taxa de incidência/100.000 habitantes o estado, nos anos de 2018 e 2019 alcançou, respectivamente, a 3° e 4° posição sendo, portanto, um dos mais afetados da região (Gráfico 2). Até a quarta semana epidemiológica (SE4) de 2020, 14 possíveis casos foram contabilizados na Paraíba (BRASIL, 2020).

Gráfico 2. Análise comparativa entre o estado da Paraíba com os demais estados da região Nordeste

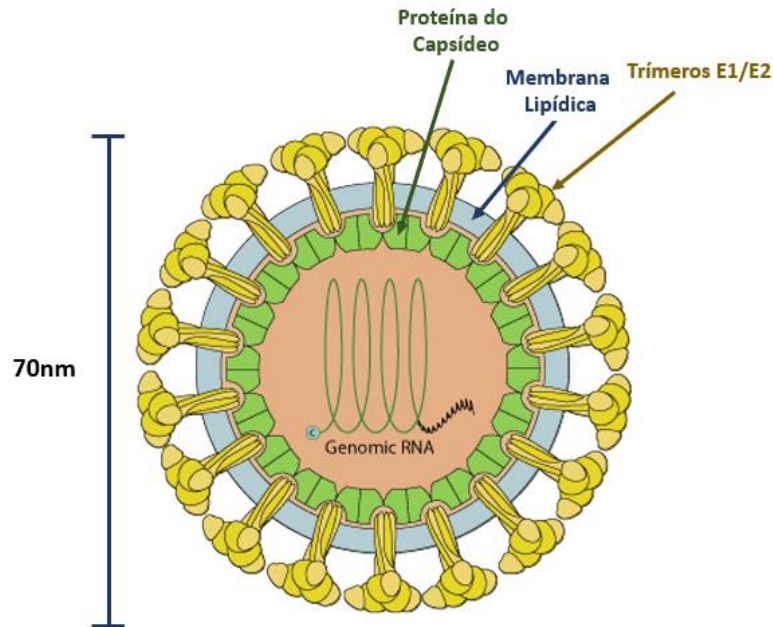


Fonte: Adaptado de dados divulgados pela Secretaria de Saúde entre os anos de 2017 e 2020. A imagem mostra oscilações quanto a posição da Paraíba frente ao número de casos suspeitos bem como a taxa de incidência por 100.000 habitantes.

2.2 ESTRUTURA VIRAL

O vírus da Chikungunya possui formato esférico, com cerca de 60-70 nm de diâmetro. Em seu envelope fosfolipídico, derivado da membrana celular do hospedeiro, (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015), estão incrustadas as glicoproteínas E₁ e E₂ que organizam-se em trímeros heterogêneos com simetria T = 4. O capsídeo viral, por sua vez, é formado por 240 cópias das Proteínas do Capsídeo (PC), que realizam o encapsulamento do material genético (SHARMA et al, 2017) (Figura 1).

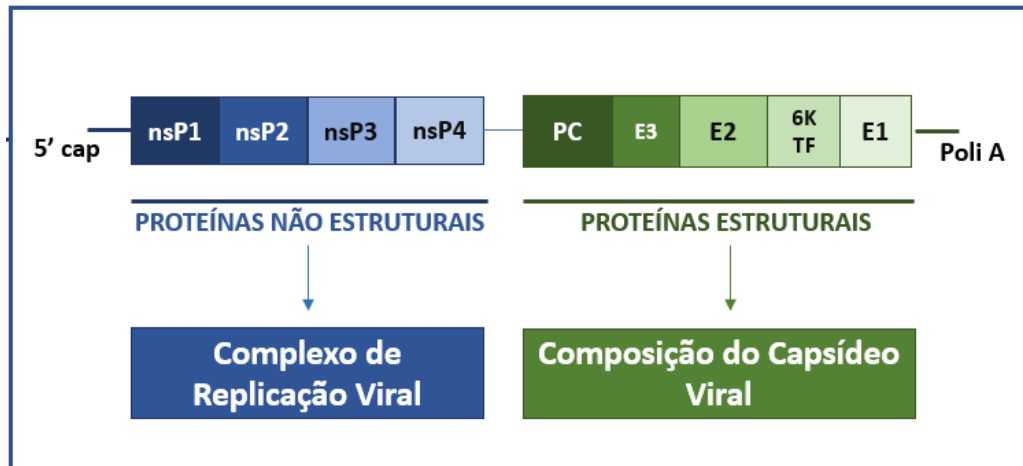
Figura 1. Demonstração esquemática da estrutura do CHIKV



Fonte: Adaptado Nature. A imagem revela os componentes estruturais da esférica partícula viral no qual observa-se as glicoproteínas E₁ e E₂ formando complexos triméricos, além do capsídeo e da bicamada lipídica derivada da membrana de células do hospedeiro.

Formado de RNA de fita simples com aproximadamente 11.8 kb de comprimento, o material genético da Chikungunya apresenta estruturas protetoras semelhantes ao RNA de eucariotos. Assim, nas extremidades 5' e 3' encontram-se a 5'cap (composto de metilguanossina, um derivado de guanossina metilada importante para a síntese de proteína) e a cauda poli(A) (sequências de nucleotídeos de ácido poliadenílico) respectivamente (SHARMA et al, 2017), conferindo resistência gênica viral. Além disso, duas janelas de leitura abertas (ORF) codificam um total de 10 proteínas, 6 estruturais (PC-E₃-E₂-6K/TF-E₁) e 4 não estruturais (nsP1-nsP4) (TANABE et al, 2018) (Figura 2).

Figura 2. Representação esquemática do RNA do CHIKV



Fonte: Própria. Demonstração das ORFs components do RNA do CHIKV. Destacado em azul, observa-se a região codificadora das proteínas não estruturais que se acoplam em um complexo de replicação viral. Sinalizado em verde, tem-se a região codificadora de proteínas estruturais componentes das partículas virais.

Dentre as proteínas estruturais codificadas pelo genoma viral, as glicoproteínas E₁, E₂ e PCs são as que possuem funções melhor estabelecidas. A primeira, formada por 442 aminoácidos, apresenta 3 domínios (I, II e III) (PORTA et al, 2016), responsáveis pela fusão da membrana viral com a membrana lisossomal das células do hospedeiro durante o processo de infecção. A glicoproteína E₂ é constituída de 443 aminoácidos organizados em 3 regiões distintas (A, B e C), com o domínio A responsável pela interação vírus/receptor celular (LI et al, 2010)⁵. As PCs possuem peso molecular de aproximadamente 30 kDa, com 3 regiões (I, II e III) distribuídas ao longo de 261 aminoácidos. A porção III caracteriza-se por possuir atividade de autoclivagem (METZ; PIJLMAN, 2016).

Menos conhecidas, as proteínas E₃, 6K e Transfame (TF) desempenham ações importantes durante o ciclo de vida do CHIKV. A glicoproteína E₃ apresenta aproximadamente 65 aminoácidos e atua no transporte da poliproteína E₃-E₂-6K-E₁ no retículo endoplasmático (SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2013). A importância da proteína 6K, por sua vez, foi demonstrada por MELTON e colaboradores em 2002 ao revelar a participação da mesma na formação de canais seletivos de cátion em células infectadas. SNYDER e sua equipe revelaram em 2013 a ação da proteína Transfame (TF) na sustentação de canais iônicos na célula do hospedeiro. A sua

ausência, no entanto, pareceu não afetar mecanismos importantes de montagem das partículas virais.

As proteínas não estruturais (nsP) formam um complexo de replicação na região citoplasmática das células infectadas, proporcionando mecanismos de montagem da estrutura do vírus. A nsP1 apresenta 535 aminoácidos distribuídos ao longo de 3 domínios (N-terminal, Domínio Médio e C-terminal), cujas principais funções são o capeamento da extremidade 5' (5'cap) do RNA viral e a interação entre o complexo de replicação com a membrana do hospedeiro. (KUMAR et al, 2018). A nsP2, composta de dois domínios (N-terminal e C-terminal), atua como RNA helicase além de cisteína-protease. Este tem importância na clivagem da poliproteína nsP1234 viral (NARWAL et al, 2018). A nsP3 facilita a adaptação do vírus a diferentes células do hospedeiro através de mudanças em regiões hipervariáveis do seu genoma (MESHRAM et al, 2018). Por fim, a enzima nsP4 efetua papel de RNA polimerase sendo, portanto, responsável pela síntese do RNA genômico e subgenômico viral (CHEN et al, 2017).

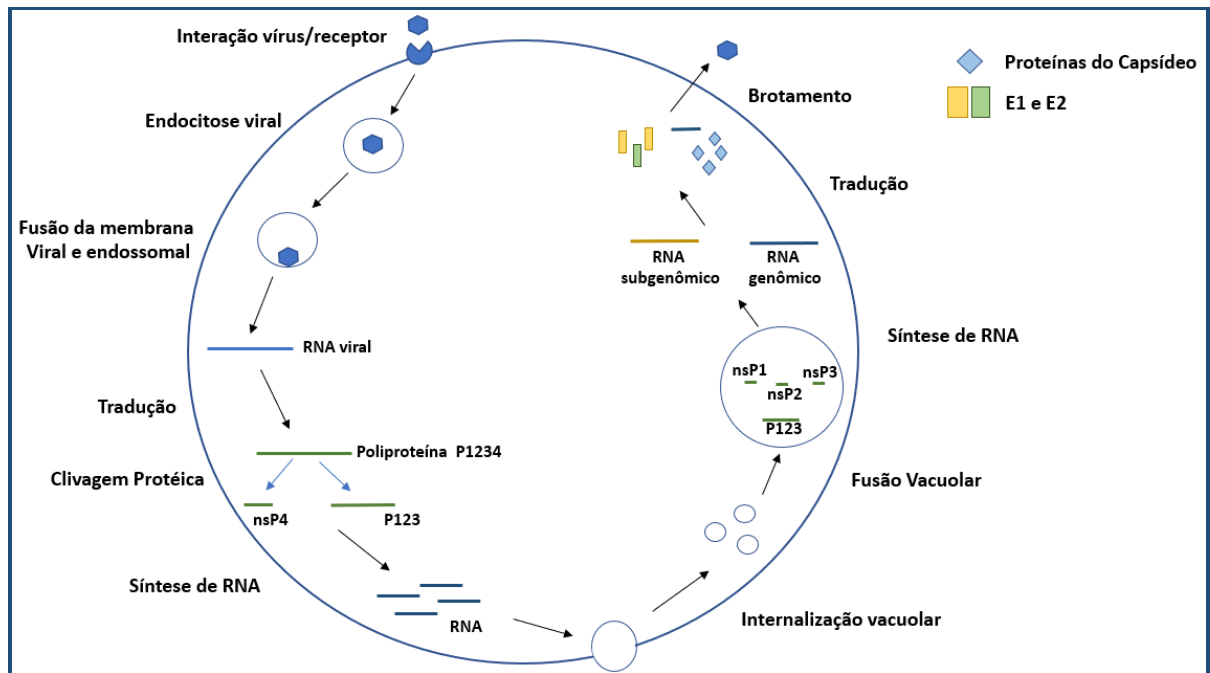
2.3 REPLICAÇÃO VIRAL

Ao realizar o repasto sanguíneo, fêmeas infectadas do mosquito inoculam o vírus que, através das vias intradermais, alcança os capilares subcutâneos, passando a se replicar em células permissivas da pele, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015). O processo de replicação inicia-se com a interação da glicoproteína E₂ com receptores presentes na membrana da célula do hospedeiro (possivelmente proibirina (PHB) I e II; actina gama I; colágeno tipo I - alfa II) (PORTA et al, 2016; SCHNIERLE, 2019) que ativa mecanismos de endocitose, resultando na internalização da partícula viral (SILVA; DERMODY, 2018). O ambiente ácido do endossomo celular desencadeia mudanças conformacionais na glicoproteína E₂, resultando em sua dissociação à glicoproteína E₁. Esta, por sua vez, forma homotrímeros (LI et al, 2010) que possibilitam a fusão entre as membranas viral e endossomal, com a consequente liberação do RNA do CHIKV no ambiente citoplasmático (DUIJL-RICHTER et al, 2015).

Uma vez no citoplasma, o RNA viral passa por mecanismos de tradução, formando a poliproteína P1234 que ao ser clivada pela ação da nsP2 gera as estruturas proteicas P123 e nsP4. A associação entre as nsPs com proteínas do hospedeiro formam, na membrana celular, um complexo de replicação no qual o RNA do CHIKV fica protegido por esferas vesiculares (SILVA; DERMODI, 2018). A internalização e posterior fusão destas originam grandes vacúolos citoplasmáticos onde estão presentes vários complexos de replicação. Assim, um acúmulo das poliproteínas P123 promove sua clivagem completa, resultando no aumento da síntese de RNA genômico, bem como na tradução do RNA subgenômico, gerando a poliproteína estrutural (PPE) PC-E₃-E₂-6K-TF-E₁ (SPUUL et al, 2010).

Devido à sua atividade de autoclivagem (METZ; PIJLMAN, 2016), a PC é liberada da PPE e, através de sua associação com o genoma viral recém formado, se oligomeriza, resultando na formação dos nucleocapsídeos, cada um comportando um RNA viral (SILVA; DERMODI, 2018). Em paralelo, a contínua tradução do RNA subgenômico patogênico forma as poliproteínas E₃-E₂-6K-E₁ e E₃-E₂-TF, cujo direcionamento e processamento no retículo endoplasmático (RE) e complexo de golgi (CG) geram as estruturas TF, 6K, E₁ e pE₂ (E₃-E₂) (FIRTH et al, 2008). As duas últimas, durante sua passagem pelo complexo de golgi (CG), passam por alterações pós-traducionais e, através de vesículas liberadas pelo CG, atingem a membrana plasmática. O recrutamento do nucleocapsídeo a regiões de membrana onde estão presentes as glicoproteínas E₁ e E₂ resulta na montagem e posterior liberação da partícula viral madura para o ambiente extracelular (SILVA; DERMODI, 2018) (Figura 3).

Figura 3. Representação esquemática da replicação do CHIKV



Fonte: Própria. Demonstração esquemática do processo de infecção e replicação viral em células do hospedeiro.

2.4 CICLO DE TRANSMISSÃO

A Chikungunya enquadra-se como um arbovírus uma vez que, em seu ciclo de transmissão, são necessários artrópodes para o processo de disseminação viral (DONALISIO; FREITAS; RUBEN, 2017). No entanto, alguns fatores são essenciais para o sucesso dos mecanismos de transmissão do patógeno. Destes, cita-se a importância não apenas da susceptibilidade do mosquito ao vírus, como também o tempo de vida do vetor, devendo, este, ser suficiente para o processo de replicação viral. Além disso, torna-se importante que os níveis de partículas virais no hospedeiro vertebrado estejam elevados para que, durante o repasto sanguíneo, as chances de infecção do mosquito sejam elevadas (HIGGS; VANLANDINGHAM, 2018).

Mosquitos fêmea do gênero *Aedes* tornaram-se importantes vetores para o CHIKV, tanto em humanos, quanto em animais auxiliados, principalmente, por fatores ambientais (como clima) e populacionais (número de hospedeiros vertebrados e vetores). No entanto, elementos intrínsecos, a exemplo da

composição salivar e tempo de vida do mosquito além da capacidade de replicação viral parecem desempenhar papel fundamental nos mecanismos de adaptação e transmissão do patógeno (MONTEIRO et al., 2019).

O processo de infecção do mosquito ocorre de duas formas: a transmissão vertical e horizontal. A primeira acontece através do repasto sanguíneo. Neste processo há ingestão, por parte do mosquito, de células infectadas do sangue do vertebrado que passam por mecanismos de digestão no intestino do animal. A degradação celular resulta na liberação das partículas virais que, ao adentrarem no sistema circulatório do vetor, atingem suas glândulas salivares onde sofrem replicação e ficam armazenadas (COFFEY; FAILLOUX; WEAVER, 2014).

A transmissão horizontal ocorre através da presença do vírus nos ovos do vetor. No entanto, o CHIKV necessita persistir aos diferentes estágios de desenvolvimento do mosquito para que possa, durante a fase adulta do vetor, ser disseminado (AGARWAL et al., 2014). Embora em menor grau, estudos revelaram que esse mecanismo de transmissão é de extrema importância para a sobrevivência do patógeno durante condições ambientais adversas (MILLER et al., 2000).

Atualmente, são estabelecidos dois ciclos de transmissão para o CHIKV: o urbano e o silvestre. Este ocorre principalmente no continente africano, entre animais como primatas não humanos, roedores e morcegos não havendo nestes manifestações de sinais clínicos (WALDOCK et al., 2016). Diversos mosquitos do gênero *Aedes ssp* parecem estar envolvidos nos mecanismos de transmissão silvestre, sendo o *Aedes furcifer* e o *Aedes africanus* os mais prevalentes (TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2017).

O ciclo urbano, por sua vez, teve início com o estabelecimento de populações humanas em regiões próximas a áreas florestais. Além disso, a preferência dos vetores ancestrais ao sangue humano bem como a realização da postura dos ovos em recipientes de água artificiais foram fundamentais para a adaptação do mosquito a ambientes domésticos sendo a espécie *Aedes aegypti* o principal exemplo de adaptação (TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2017).

O processo de globalização, por sua vez, somados ao comportamento antropológico do vetor contribuíram com a propagação do *Aedes aegypti* para outros

continentes (OLIVEIRA; FAILLOUX, 2017). Além disso, mutações em estruturas proteicas virais favoreceram adaptações do CHIKV a outras espécies de mosquito. Destaca-se a adaptação da linhagem ECSA ao díptero da espécie *Aedes albopictus* em virtude de mutações ocorridas nas glicoproteínas E₁ e posteriormente em E₂. (TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2017).

2.5 SINAIS E SINTOMAS

Após o período de incubação, com duração de 2 a 12 dias (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015), os indivíduos podem apresentar características clínicas com intensidade variável. A princípio tem-se a fase aguda que ocorre nas 3 primeiras semanas sendo acompanhada de febre alta e abrupta acima de 39°C, poliartralgia (atingindo os membros de maneira simétrica e bilateral), muitas vezes intensa e debilitante, cefaleia, fotofobia e manifestações epiteliais (CUNHA; TRINTA, 2017).

Ainda na fase aguda, sintomatologias como vômito, diarreia e dores abdominais podem ocorrer sendo, no entanto, menos recorrentes (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015). Somados a isso, há relatos de rigidez principalmente nas regiões do cotovelo, pulsos e interfalanges das mãos e pés. Embora autolimitante, a Chikungunya pode desencadear sintomas graves que envolvem o sistema nervoso central, respiratório e urinário (CUNHA; TRINTA, 2017) podendo levar ao óbito como registrado em surtos ocorridos na ilha La Reunion e em regiões do continente americano (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015).

Cerca de 50 a 90% dos pacientes apresentam persistência de algumas manifestações clínicas após 21 dias do seu início, caracterizando a fase pós-aguda. Esta possui duração de aproximadamente 3 meses nos quais os indivíduos são afetados por um quadro de poliartralgia e poliartrite, geralmente menos intenso comparado à fase aguda e intercalado por intervalos assintomáticos. Além disso, sinais pouco relacionados à doença, como fadiga crônica, mudanças na tonalidade da pele, queda de cabelo e alterações metabólicas e endócrinas, podem ocorrer (CUNHA; TRINTA, 2017; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015).

Por fim, acometendo entre 40 a 80% dos infectados sintomáticos, a fase crônica caracteriza-se pela persistência de manifestações clínicas após 3 meses de seu início (CUNHA; TRINTA, 2017), apresentando menor intensidade se comparada à fase aguda (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015). Nesse contexto, poliartralgia e poliartrite correspondem aos sinais mais comuns. No entanto, edemas nas regiões articulares acompanhados de formigamentos podem estar presentes em alguns pacientes (MANIMUNDA et al., 2010).

2.6 IMUNOLOGIA DA CHIKUNGUNYA

2.6.1 Imunidade Inata

As células NK constituem a primeira linha de defesa do organismo cuja função é regulada através de receptores de ativação e inibição (TANABE et al., 2018). Petitedemange e colaboradores em 2014⁴⁰ revelaram uma poderosa ação destas células durante a fase aguda tendo sua atividade citotóxica destacada frente a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ .

Durante a cronicidade da doença estudos constataram que as NK apresentaram aumento na expressão de receptores de modulação negativa (NKG2A e CD94) contribuindo com a diminuição de atividades citotóxicas com aumento, porém, da síntese de IFN- γ (PETITDEDEMANGE et al, 2014). Além disso, características clínicas como artralgia foram intensificadas pela capacidade de infiltração de tais células para regiões articulares além do estabelecimento, por parte destas células, de um microambiente pró-inflamatório (MAUCOURANT et al., 2019).

Ainda sobre os mecanismos da imunidade inata na doença, macrófagos e monócitos desempenham papel chave na fisiopatologia da Chikungunya. Sabe-se que as estruturas articulares são revestidas pelo tecido sinovial sendo este, composto por dois tipos principais de células: células sinoviais semelhantes a macrófagos (SSM) e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (SSF) (TANABE et al., 2018).

Phuklia e equipe em 2013 demonstraram que as SSM e SSF apresentam alta susceptibilidade para infecção pela Chikungunya resultando na produção de IL-6, IL-8, RANKL, MCP1 e CCL2. Estas agem no recrutamento de monócitos e na

diferenciação desta em células semelhantes a osteoclastos que passam a produzir IL-6 e TNF- α , citocinas características de doenças artrínogênicas. Além disso, tais células, através da produção de metaloproteinases, não apenas auxiliam na degradação do colágeno mas também na ativação de osteoclastos contribuindo com o desgaste ósseo (COOLES; ISAACS, 2011).

Somados a capacidade de danos ao tecido ósseo, monócitos/macrófagos atuam como reservatórios virais contribuindo com a disseminação do CHIKV para regiões articulares, músculos, tecidos linfóides, fígado e sistema nervoso (LABADIE et al., 2010). Kumar e colegas em 2012 observaram que macrófagos infectados auxiliavam na modulação de respostas inflamatórias através da produção de IFN- α , sendo a concentração desta proporcional a carga viral. Além disso, tais células poderiam contribuir com o balanço entre as subpopulações Th1 e Th2 bem como com as vias de ativação clássica e alternativa dos macrófagos (MAGUIRAGA et al, 2012).

2.6.2 Imunidade Adaptativa

Nos últimos anos, o papel da resposta adaptativa na infecção pela CHIKV vem sendo estudada exaustivamente sendo o mecanismo humoral de extrema importância para o controle da infecção. Anticorpos IgM são detectados em poucos dias do início dos sintomas, diminuindo a partir da segunda semana. A produção de IgG, por sua vez, ocorre após 13 dias do surgimento dos sinais clínicos com persistência durante a fase crônica (LUM et al., 2013). KAM e colaboradores em 2012 demonstraram que o IgG3 é o subtipo prevalente nas fases aguda e crônica sendo sua presença relacionada a condições sintomatológicas mais severas. No entanto, pacientes com alta carga desse anticorpo apresentaram procedimentos de *clearance* viral mais rápidos além de não desenvolverem artralgia persistente.

LUM et al., 2013 demonstraram o papel protetivo dos linfócitos B através do uso de modelos experimentais de camundongos depletados para células T CD4. Nesse estudo, mesmo havendo uma redução da carga de anticorpos, estes se mostraram importantes no controle da infecção em virtude da especificidade destas para a glicoproteína E₂. Por outro lado, a administração de anticorpos em

camundongos knockout para linfócitos T e B foram suficientes para a redução da persistência do vírus de acordo com estudos realizados por HAWMAN et al., 2013.

Além dos linfócitos B, as células T também participam dos mecanismos imunológicos na infecção pelo vírus da Chikungunya. Sabe-se que o local de inoculação viral ocorre inicialmente em regiões epiteliais. Nesse contexto, questionou-se se células T $\gamma\delta$, também presentes em regiões do epitélio e mucosa, poderiam ter participação nos mecanismos imunológicos da doença (HAYDAY, 2000; LATHA et al., 2014). Assim, LONG et al., 2016, realizaram pesquisas com camundongos revelando que a ausência desse subtipo de linfócito T provocou aumento nos sinais clínicos como edemas na região das patas e alterações histopatológicas. Além disso, o mesmo estudo demonstrou a participação destas células no controle de mecanismos pró-inflamatórios como a produção da citocina IFN- γ e migração de células da imunidade inata para sítios de inflamação.

Os linfócitos T CD8, através de seu papel citotóxico, auxiliam nos mecanismos de destruição de células infectadas pelo vírus (TANABE et al., 2018). Pesquisas desenvolvidas por WAUQUIER e colaboradores em 2011 demonstraram que em períodos iniciais da fase aguda, estas células apresentavam maiores taxas de ativação e proliferação podendo, tais níveis, permanecer por semanas em pacientes acometidos com sintomas artritogênicos. Por outro lado, embora modelos animais demonstrem a capacidade de infiltração de tais células nos sítios articulares, postula-se que os linfócitos T CD4 e não as células T CD8 contribuam com a maioria das características clínicas (TEO et al., 2013).

Ao contrário das células T CD8, os linfócitos T CD4 apresentam um aumento em sua frequência populacional em momentos tardios da fase aguda atingindo um pico de proliferação por volta do quarto dia (WAUQUIER et al., 2011). Células T CD4, também nominadas Linfócitos T auxiliares (Th), são importantes células da imunidade adaptativa que apresentam papel central nas funções imunológicas. Dentre os diversos papéis destacam-se o estímulo à produção de anticorpos pelas células B, melhoria e manutenção das funções citotóxicas dos linfócitos T CD8 e regulação das funções dos macrófagos. Sua capacidade em auxiliar nas respostas contra uma gama de micro-organismos patogênicos ocorre em virtude de tais células

se diferenciarem em subpopulações com características fenotípicas distintas (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

Como mencionado, ambos os linfócitos CD4 e CD8 apresentam capacidade de infiltração em regiões sinoviais. No entanto, alguns estudos mostram que as células Th possuem participação mais ativa nas características sintomatológicas da doença. TEO, et al., 2013 utilizando modelos murinos observaram que apenas as células CD4⁺ contribuía com os inchaços nas articulações não possuindo um aparente papel no controle da replicação e disseminação viral. Em 2017, TEO e colaboradores, demonstraram que a transferência de linfócitos T CD4⁺ provenientes de camundongos infectados, para animais também infectados, porém com ausência de receptores TCR, conduzia a um quadro clínico mais grave caracterizado não apenas pelos edemas articulares mas também com extravasamento vascular, necrose do músculo esquelético e edema subcutâneo.

Alguns estudos demonstram a participação de certas subpopulações de linfócitos T CD4 durante a infecção pela Chikungunya. Nesse contexto estão as células T reguladoras. Estas, são de extrema importância na manutenção da tolerância, no controle de respostas inflamatórias exacerbadas e, conseqüentemente, na homeostase durante as respostas inflamatórias (LEE et al., 2015). KULKARNI, et al., 2017 observaram uma redução destas células nas fases aguda e crônica quando comparadas a grupos controle e pacientes recuperados sugerindo seu envolvimento com o progresso ou resolução da doença.

Os linfócitos T CD4 desempenham papel chave durante doenças infecciosas através da produção de citocinas e mecanismos de contato célula-célula. No entanto, um balanço entre mecanismos pró-inflamatórios e imunossupressores torna-se importante para o controle das respostas contra patógenos invasores auxiliando, assim, na redução de danos teciduais que tais respostas poderiam causar no organismo (LIANG et al., 2011).

Dentre os mecanismos de ação dos linfócitos T CD4 estão a produção de citocinas. Como exemplo, cita-se a IL-10 como uma citocina imunossupressora produzida por diversas células da imunidade inata como macrófagos, células dendríticas (DC) e NK e da imunidade adaptativa a exemplo dos linfócitos T CD4, T

CD8 e T $\gamma\delta$. Uma vez ligada ao seu receptor (IL-10R), a IL-10 ativa vias de sinalização que suprimem mecanismos pró-inflamatórios (ROJAS et al., 2017).

A citocina TGF β , por sua vez, desempenha funções no controle da proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração de células T. Esse peptídeo apresenta efeito pleiotrópico por contribuir com mecanismos imunossupressores ou pró-inflamatórios a depender de sua associação à outras citocinas (TRAVIS; SHEPPARD, 2014). O IFN- γ , por fim, consiste em uma importante citocina pró-inflamatória produzida principalmente pelas células T CD4, T CD8 e NKs. Dentre as principais ações, destacam-se a melhora na apresentação antigênica, auxílio na atividade de macrófagos e indução da síntese de proteases antivirais (SCHRODER et al., 2004).

Além de citocinas, a ação de enzimas torna-se importante para o controle das respostas imunológicas. Destaca-se a ação de mecanismos envolvidos com o metabolismo das purinas como as ectonucleotidases CD39 e CD73. Estas, através da conversão da adenosina trifosfato (ATP) extracelular em adenosina (Ad) regulam a duração e magnitude dos sinais purinérgicos que atuam nas células componentes do sistema imunológico (ANTONIOLI et al., 2013). Sendo o ATP e a Ad, no microambiente extracelular, moléculas de ação pró e anti-inflamatórias, respectivamente (FAAS; SÁEZ; VOS, 2017), a ação conjunta de ambas enzimas auxilia no estabelecimento de mecanismos imunossupressores importantes para homeostase imunológica (BEAVIS et al., 2012).

Mecanismos de contato célula-célula também apresentam extrema relevância na homeostase imunológica. Nesse cenário, destaca-se o receptor Antígeno Associado aos Linfócitos T Citotóxicos 4 (CTLA-4). Este, uma vez expresso na membrana celular, auxilia na regulação negativa das funções das células T através de sinais inibitórios e impedimento da interação entre ligantes e receptores importantes para a co-estimulação celular (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). O PD-1, por sua vez, corresponde a um regulador negativo das funções das células T através da inibição de mecanismos de proliferação, produção de citocinas e sobrevivência celular. A elevada expressão dessa estrutura é um importante marcador de exaustão celular e geralmente sua alta produção ocorre em infecções crônicas e câncer (BUCHBINDER; MD; ANUPAM, 2016).

Cientes da participação dos linfócitos T CD4+ no estabelecimento de características clínicas em infecções desencadeadas pelo CHIKV, a hipótese que norteou esse trabalho foi de que células T CD4+, através de marcadores imunológicos moleculares poderiam estar associados com o estabelecimento da cronicidade da doença bem como no envolvimento de determinadas manifestações clínicas observadas nas fases aguda e crônica de pacientes residentes na região metropolitana de João Pessoa, Paraíba, Brasil. O presente trabalho é pioneiro na análise de mecanismos purinérgicos CD39 e CD73 de células T CD4+ totais em infecções desencadeadas pelo CHIKV.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar mecanismos imunológicos desencadeados pelas células T CD4 em pacientes em pacientes residentes na região metropolitana de João Pessoa, Paraíba, Brasil com infecção pelo vírus da CHIKV nas fases aguda e crônica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência populacional de células T CD4 durante as fases aguda e crônica da Chikungunya em humanos;
- Caracterizar a população de células T CD4 quanto aos mecanismos de contato célula-célula de co-estimulação negativa (CTLA-4) e exaustão (PD-1);
- Avaliar a população de células T CD4 quanto a produção das citocinas IL-10, TGF- β e IFN- γ .
- Avaliar o potencial de mecanismos envolvidos no metabolismo purinérgico (CD39 e CD73) em células TCD4.

METODOLOGIA

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa - CONEP (CAAE: 59833416.6.0000.5183) sendo o projeto, denominado “Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue”. Todos os contribuintes da pesquisa foram informados sobre a importância da mesma bem como, via assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), participaram voluntariamente do projeto.

4.2 SELEÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE, AGUDO E CONTROLE

Para os casos de Chikungunya Agudo (CHIKV A) foram selecionados 7 indivíduos (n = 7), no Estado da Paraíba, com sintomas compatíveis com a infecção em até 5 dias do início dos sintomas. O grupo crônico (CHIKV C), por sua vez, foi composto por 4 voluntários (n = 4) com persistência sintomática de pelo menos 6 meses. Com relação ao controle (CTL) (n = 7), foram utilizados como critério de inclusão de pessoas não acometidas por infecções prévias das arboviroses Dengue, Zika e Chikungunya, não apresentando doenças crônicas e não fazendo uso recente de medicamentos. A título de comprovação de não infecção prévia dos indivíduos componentes do grupo controle, teste sorológico foi realizado.

4.3 AMOSTRAS CLÍNICAS

Amostras sanguíneas foram coletadas do sangue periférico de pacientes assistidos na Unidade de Pronto Atendimento do Cristo Redentor (UPA-Cristo) e do Hospital Materno Infantil João Marsicano – Bayeux sendo, posteriormente processadas no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas (LABIDIC), localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. O processamento das amostras objetivou a aquisição do sangue total (ST) para estudo de marcadores imunológicos relacionadas com as células T CD4+ em ambas as fases da doença e do soro visando a tipagem viral via técnica de qRT-PCR. As amostras foram associadas a fichas de identificação bem como dados de coleta contendo informações clínicas a respeito do paciente.

4.4 CONTROLE VIRAL

Os controles para CHIKV foram isolados de pacientes infectados no Estado da Paraíba e do Rio Grande do Norte, pelo 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

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 qRT-PCR.

4.6 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (qRT-PCR) PARA DETECÇÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

Para a realização qRT-PCR, o RNA viral foi extraído das amostras de sangue através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA). A técnica de PCR em tempo real, por sua vez, seguiu o protocolo proposto por Lanciotti et al., 2007 no qual foi utilizada a sonda TaqMan® para a identificação do vírus da Chikungunya.

4.7 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS PARA ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.7.1 Lise de hemácias

Foram coletados, em tubos vacutainer heparinizados, 10 mL de sangue periférico de 7 indivíduos saudáveis não infectados (soro negativos), 7 voluntários em fase aguda da Chikungunya e de 4 pacientes com características clínicas de cronicidade da doença. Todos os voluntários apresentaram idade acima de 18 anos. Na sequência, foram transferidos 2mL do sangue para tubos falcon de 15 mL sendo, posteriormente adicionados 12 mL de solução de lise de células vermelhas,

vortezados e incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos. Após esse período, a amostra foi submetida a centrifugação com programação de 2000 rpm a 25°C durante 5 minutos em uma aceleração 4 e desaceleração 0. Assim, o sobrenadante foi desprezado enquanto e as células leucocitárias lavadas com Solução Fosfato Salina (PBS) por 3 vezes. A cada lavagem, a amostra foi submetida a centrifugação cuja programação correspondeu a mesma utilizada para a solução de lise. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em um volume de 200µL de PBS.

4.7.2 **Plaqueamento celular**

Em câmara de fluxo, foram inseridas 175µL de RPMI suplementado somados a 25µL da amostra de leucócitos (apresentando uma concentração celular próximo a $2,5 \times 10^5$) em placas de 96 poços de fundo U.

4.7.3 **Marcação de parâmetros extra e intracelulares**

Ainda em câmara de fluxo, foram acrescentados 10µL de Brefeldina A (substância que impede o transporte de proteínas para o Complexo de Golgi promovendo, assim, seu acúmulo no citoplasma) aos poços sendo, posteriormente, incubadas em estufa 5% de CO₂ à 37°C durante 4 horas. Após esse período, a placa foi centrifugada durante 8 minutos em temperatura de 4°C a 1300 rpm com aceleração e desaceleração 0 sendo, na etapa seguinte, retirado o sobrenadante e a placa vortezada. Mixes de anticorpos extracelulares, diluídos em Solução Diluidora de Anticorpos (SDA), foram acrescentados em concentrações previamente padronizadas na quantidade de 40µL/poço onde, sequencialmente, a placa foi incubada por 15 minutos em geladeira (4°C). Assim, 150µL de PBS/poço foram adicionados sendo, a placa, posteriormente centrifugada durante 8 minutos a 1300 rpm em temperatura de 4°C com aceleração e desaceleração 0 no qual o sobrenadante foi, posteriormente, removido e as células ressuspensas usando o vórtex. Em seguida, foram adicionados 100µL de PBS e 100µL Formaldeído 4% em cada poço seguida de incubação a temperatura ambiente durante 20 minutos. Após esse intervalo, a placa foi centrifugada em rotação correspondente a 1300 rpm, em

temperatura de 4°C e com aceleração e desaceleração 0 durante 8 minutos. Logo após o descarte do sobrenadante, a placa foi vortezada e 150µL/poço de PBS foram incorporados sendo, na sequência, submetida a centrifugação em rotação de 1300 rpm em temperatura de 4°C com aceleração e desaceleração 0, durante 8 minutos. Após o processo, o sobrenadante foi descartado, a placa vortezada e em cada poço foram adicionados 150µL de Permeabilization Buffer (PB) visando a permeabilização da membrana celular para a marcação de parâmetros intracelulares. A placa foi, então, deixada em repouso por 10 minutos submetendo-a, na sequência, a centrifugação durante 8 minutos em rotação de 1300 rpm em temperatura de 4°C com aceleração e desaceleração 0. Após a remoção do sobrenadante seguida da ressuspensão celular utilizando o vórtex, 40µL de mixes de anticorpos intracelulares diluídos em PB foram adicionados nos poços de interesse. A placa foi então submetida a incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente e na sequência adicionados 150µL/poço de PB. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 8 minutos a 1300 rpm em temperatura de 4°C com aceleração e desaceleração 0. Após esse intervalo, o sobrenadante foi removido e as células ressuspendidas através do vórtex. Finalmente, 200 µL/poço de Wash B (PBS/BSA), foram acrescentadas e as amostras transferidas para tubos de FACS, próprios para leitura em citômetro, e armazenadas a 4°C para evitar que os fluorocromos perdessem a fluorescência até o momento da leitura. Assim, as amostras foram submetidas a análise por citometria de fluxo (modelo FACSCANTO II) onde 50.000 eventos foram adquiridos sendo, os dados, analisados no programa Flowjo.

4.8 ANTICORPOS MONOCLONAIS (MABS)

Os anticorpos utilizados para marcação de moléculas de superfície foram: controles de Isotipo marcados (FITC e PE), anti-CD4, anti-PD1, anti-CD39 e anti-CD73. Para efetuarmos as marcações intracelulares foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CTLA-4, anti-IL10, anti-TGFβ e anti-IFNγ. Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos das companhias BD Phamigen™ (CA, USA) ou Ebioscience (San Diego, CA, USA).

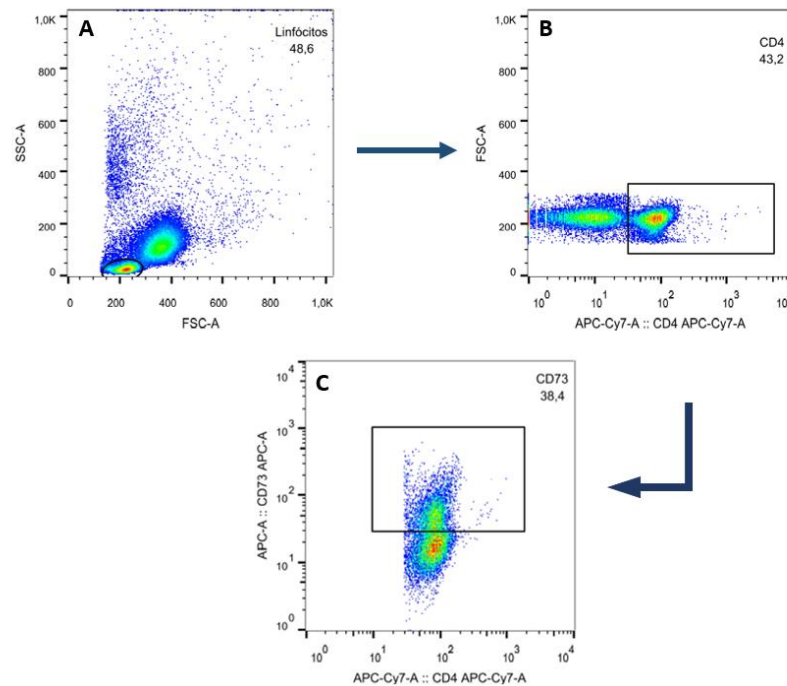
4.9 AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE DADOS POR CITOMETRIA DE FLUXO

As preparações celulares marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo modelo FACSCANTO II (Becton & Dickinson). Durante a aquisição dos dados foram coletados 50.000 eventos. Os dados coletados foram analisados utilizando o programa de computador *Flowjo* (Tree Star).

4.10 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE

A análise da frequência populacional de células T CD4 bem como a produção das citocinas IL-10, TGF β e IFN γ , das enzimas CD39 e CD73 e dos receptores CTLA-4 e PD-1 foram realizadas através do software FlowJo (V10.0.7). Para isso, foi feito um gate na região correspondente aos linfócitos, visualizados pelas características de tamanho-FSC e granulosidade-SSC (Figura 4A). Posteriormente, objetivando a seleção das células T CD4, os parâmetros FSC (eixo X) e CD4 (eixo Y) foram selecionados (Figura 4B). Na sequência, dentro da população de CD4, foram observados a produção de IL-10, TGF β , IFN γ , CD39, CD73 e co-expressão, CTLA-4 e PD-1 (Figura 4C).

Figura 4. Estratégia de análise para seleção dos linfócitos T CD4+



Fonte: Própria. O gráfico A demonstra a seleção de linfócitos através das características de tamanho (FSC – Forward Scatter) e granulosidade (SSC – Side Scatter) celular. O gráfico B demonstra a seleção das células T CD4+. O gráfico C retrata a seleção de células T CD4+ que expressam o parâmetro em estudo (representada pela expressão da ectoenzima CD73).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Através do software Graphpad Prism (Versão 5.01) (SAS Institute Inc) foram realizadas as análises estatísticas. As análises comparativas foram geradas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado cujas diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE SINTOMATOLÓGICA NOS GRUPOS AGUDO E CRÔNICO

Durante a vigência do projeto, as amostras de sangue periférico foram inseridas em tubos de coleta heparinizados. As coletas ocorreram em voluntários localizados no Hospital Materno infantil João Marsicano – Bayeux e na Unidade de Pronto Atendimento (UPA) do bairro Cristo Redentor, João Pessoa. Para a realização do estudo, foram estabelecidos os grupos Controle (CTL), Chikungunya agudo (CHIKV.A) e Chikungunya crônica (CHIKV.C).

O grupo controle foi composto por 7 indivíduos saudáveis, não acometidos por infecções prévias pelas arboviroses Dengue, Zika e Chikungunya, não afetados por doenças crônicas bem como não faziam uso recente de medicamentos. A média de idade para o grupo foi de 36,28[±]13,82. A proporção entre indivíduos do sexo masculino (M) e feminino (F) foi de 1M:6F (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização de indivíduos integrantes do grupo controle por idade e gênero.

CÓDIGO	IDADE	GÊNERO	TEMPO DE COLETA	SINAIS E SINTOMAS
CONTROLE 1	50	F	N.I.	N.P.S.
CONTROLE 2	51	F	N.I.	N.P.S.
CONTROLE 3	20	F	N.I.	N.P.S.
CONTROLE 4	51	F	N.I.	N.P.S.
CONTROLE 5	31	M	N.I.	N.P.S.
CONTROLE 6	25	F	N.I.	N.P.S.
CONTROLE 7	26	F	N.I.	N.P.S.
MÉDIA/ PROPORÇÃO	36.28	1M : 6F	N.I.	

Fonte: Própria. F representa o gênero feminino e M representa o gênero masculino. N.I. corresponde a dado Não Informado. N.P.S.- Não Possuem Sintomas. Trata-se de indivíduos saudáveis.

O grupo correspondente a fase aguda (CHIKV.A) compreendeu sete voluntários com as características clínicas da doença cujo diagnóstico foi confirmado pela técnica de biologia molecular Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A média de idade para o grupo foi de 36,28 anos^{+/-}11,00. A proporção entre indivíduos do sexo masculino (M) e feminino (F), por sua vez, foi de 4M:3F (Tabela 2). Dentre os sintomas apresentados pelos acometidos durante a fase aguda estão; vômito, edema, artralgia, cefaléia, mialgia, exantema, febre, dores orbitais e hipertrofia ganglionar (Gráfico 3).

Tabela 2. Caracterização por idade, gênero, tempo de coleta de amostras e sintomatologia de pacientes acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase aguda.

CÓDIGO	IDADE	GÊNERO	DIAS DE COLETA	SINTOMAS
DENG 26	57	F	3	Cefaléia, febre (38°C), artralgia, dor retro-orbicular
DENG 39	58	M	2	Exantema, febre (38,5°), Mialgia
DENG 41	43	M	1	Edema, exantema, febre (38°C), cefaleia, Mialgia, Dor Orbicular
ARB 03	30	F	2	Febre (39.8°C), Artralgia, Edema, Dor Orbicular, Cefaléia, Mialgia
ARB 12	N/I	M	5	Febre (39.2°C), cefaleia, artralgia, vômito, exantema mialgia
ARB 35	37	M	2	Febre (39.5°C), Exantema, Artralgia, Cefaléia, hipertrofia ganglionar e dor retro-orbital
				Febre (40°C), Mialgia, Artralgia, Cefaléia, hipertrofia

ARB 38	N/I	F	5	ganglionar
MÉDIA/ PROPORÇÃO	36.28	4M:3F	2.85	

Fonte: Própria. N/I corresponde idade não informada. M representa o gênero masculino e F o gênero feminino.

Gráfico 3. Proporção sintomatológica de indivíduos acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase aguda utilizados no projeto.



Fonte: Própria. Frequência de sinais clínicos em indivíduos acometidos pela fase aguda da Chikungunya. Os valores localizados no eixo Y do gráfico representam o número de pacientes que manifestaram a sintomatologia em um total de 7 voluntários inseridos no grupo agudo (CHIKV.A).

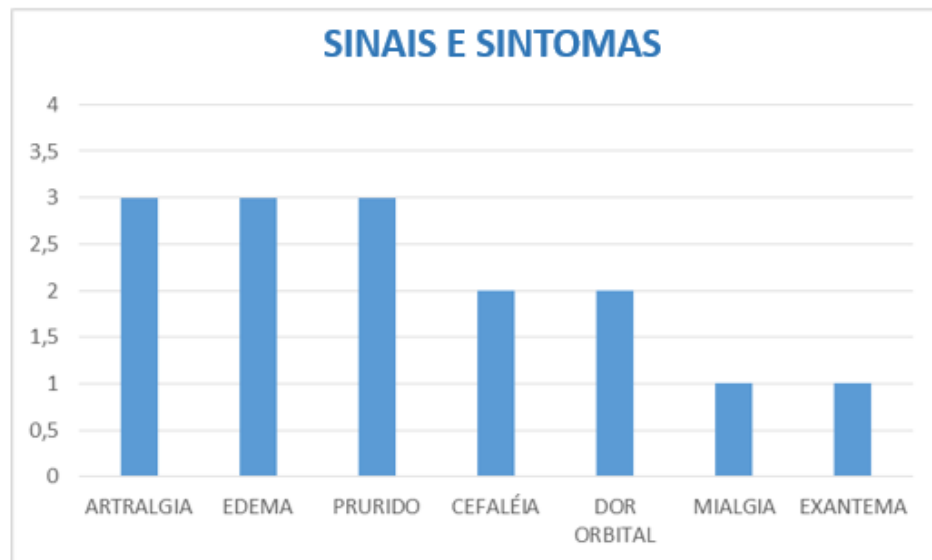
O grupo composto pelos acometidos na fase crônica (CHIKV.C) compreendeu 4 indivíduos com as características clínicas da doença cujo diagnóstico também foi confirmado pela técnica de biologia molecular PCR. A média de idade para o grupo foi de 37,25 anos[±]9,62. A proporção entre indivíduos do sexo masculino (M) e feminino (F) foi de 1M:3F (Tabela 3). Artralgia, edema, prurido, cefaleia, dor orbital, mialgia e exantema foram os sintomas observados nos componentes do referido grupo (Gráfico 4).

Tabela 3. Caracterização por idade, gênero, tempo de coleta de amostras e sintomatologia de pacientes acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase crônica.

CÓDIGO	IDADE	GÊNERO	DIAS DE COLETA	SINTOMAS
ARB 21	48	F	7Me e 2D	Artralgia, edema, prurido, mialgia
ARB 22	37	F	12Me e 12D	Artralgia, cefaleia, dor retro orbital, prurido, edema
ARB 27	22	M	7Me e 25D	Artralgia e edema
ABR 28	42	F	13Me	Cefaleia, exantema, edema, prurido, dor retro orbital
MÉDIA/ PROPORÇÃO	37,25	1M:3F	≈ 10Me	

Fonte: Fonte própria. Na tabela, M representa o gênero masculino e F o gênero feminino. Me corresponde a meses e D representa dias.

Gráfico 4. Proporção sintomatológica de indivíduos acometidos pelo vírus da Chikungunya em fase crônica utilizados no projeto.

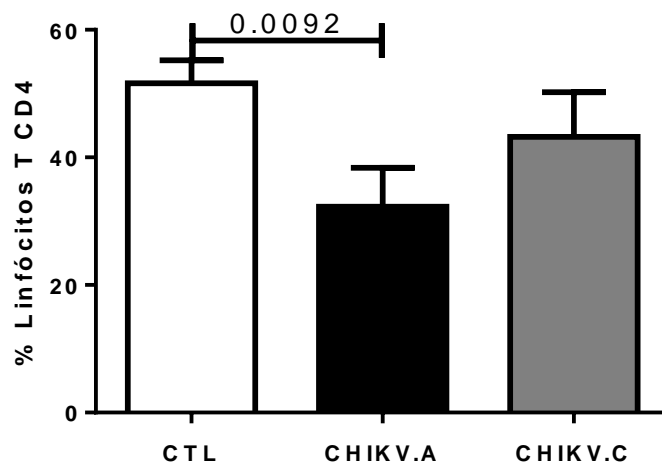


Fonte: Própria. Frequência de sinais clínicos em indivíduos acometidos pela cronicidade da Chikungunya, Os valores localizados no eixo Y do gráfico representam o número de pacientes que manifestaram a sintomatologia em um total de 4 voluntários inseridos no grupo crônico (CHIKV.C).

5.2 FREQUÊNCIA POPULACIONAL DE LINFÓCITOS T CD4

Foi avaliada, inicialmente, a frequência (%) populacional de linfócitos T CD4 em sangue periférico dos voluntários componentes de cada grupo. As análises comparativas entre os grupos de estudo revelaram redução no número destas células em pacientes apresentando a fase aguda (CHIKV.A) da doença. Em fase crônica, porém, não observamos diferença significativa (Gráfico 5).

Gráfico 5. Frequência de células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya em fase aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).



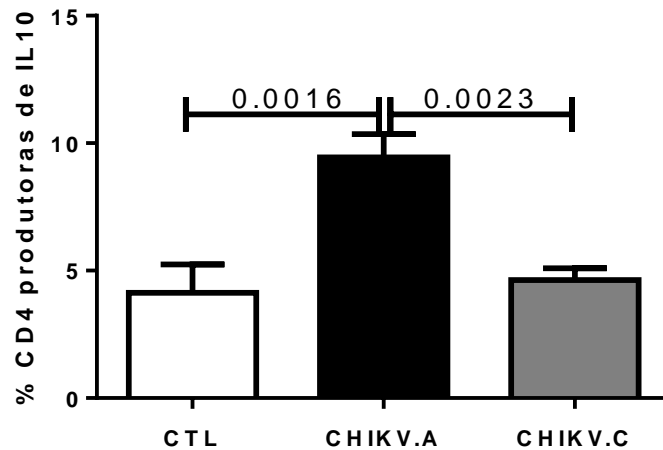
Fonte: Fonte própria. Frequência de células T CD4+ por 50.000 leucócitos circulantes dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). Os valores situados acima do gráfico em barras representam diferença significativa com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

5.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS LINFÓCITOS T CD4 DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM HUMANOS.

A produção de citocinas pelos linfócitos T CD4 é essencial para mecanismos de regulação da imunidade inata e adaptativa. Nesse sentido, investigamos a frequência de células T CD4 produtoras das citocinas IL-10, TGF- β e INF- γ pelas células T auxiliaadoras. Os resultados revelaram um aumento na produção da IL-10 durante a fase aguda da doença. Não foram observados, por outro lado, diferenças significativas entre os grupos controle e crônico. Porém, confrontando os grupos agudo e crônico, observou-se uma redução significativa com um possível retorno

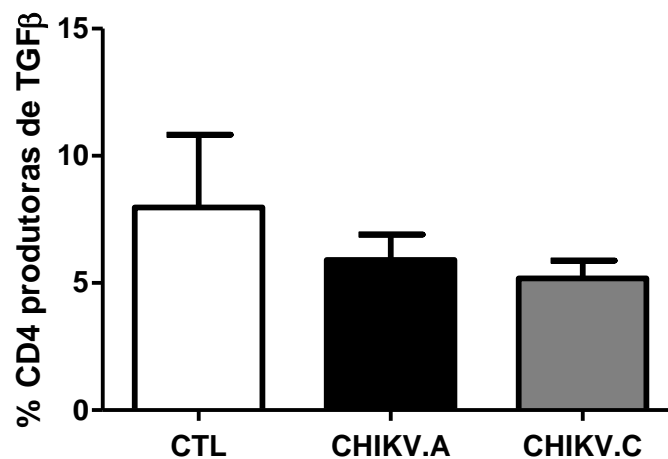
aos níveis basais (Gráfico 6). Quanto a produção da citocina TGF β , não foram observadas alterações significativas nas fases aguda e crônica (Gráfico 7)

Gráfico 6. Produção de IL-10 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).



Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que expressam IL-10 dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). Os valores situados acima do gráfico em barras representam diferença significativa com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

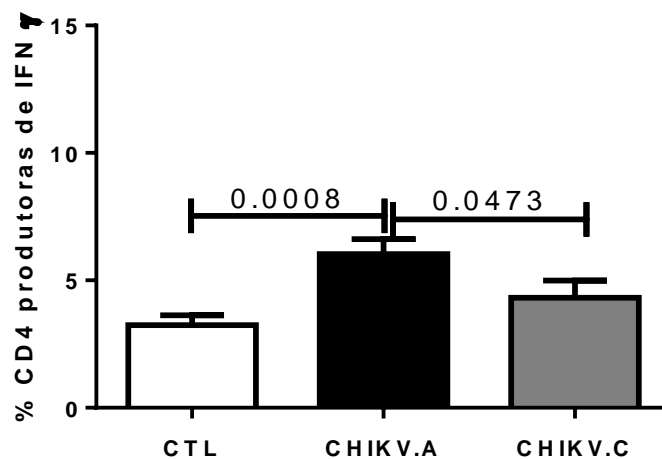
Gráfico 7. Produção de TGF β pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).



Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que expressam TGF- β dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). A ausência de valores acima do gráfico de barras revela a ausência de alterações significativas com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

O IFN- γ , semelhante ao IL-10, apresentou um aumento de produção na fase aguda da Chikungunya. Por outro lado, embora alterações significativas não tenham sido observadas entre os grupos controle e crônico, visualizou-se redução na produção desta citocina em pacientes com Chikungunya crônica quando comparadas a voluntários em fase aguda da doença (Gráfico 8).

Gráfico 8. Produção de IFN- γ pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).

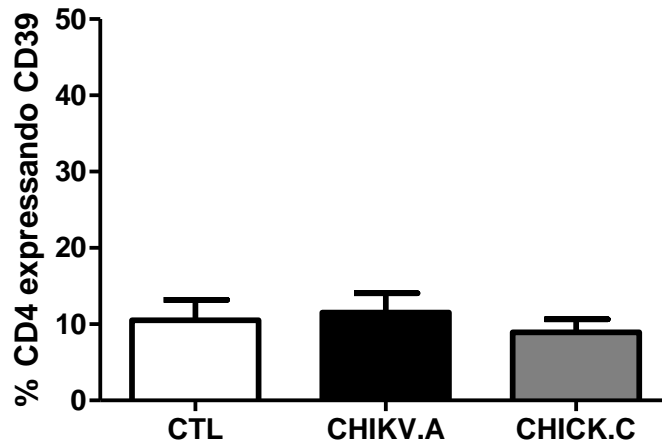


Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que expressam IFN- γ dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). Os valores situados acima do gráfico em barras representam diferença significativa com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ECTONUCLEOTIDASES CD39 E CD73 PELOS LINFÓCITOS T CD4 DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM HUMANOS.

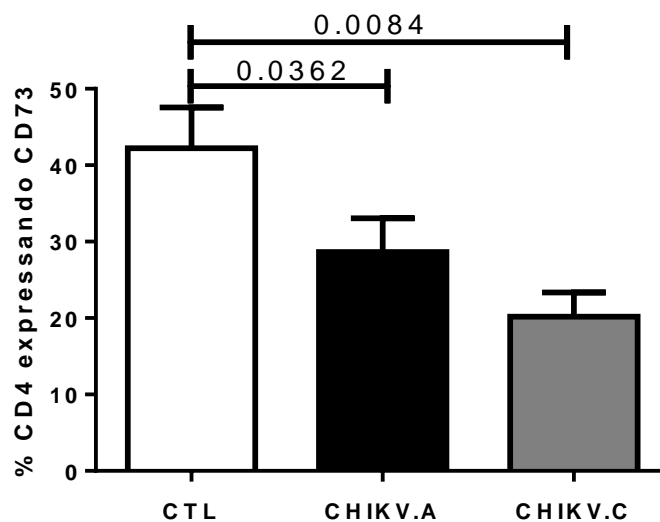
Ao analisarmos a expressão da ectoenzima CD39 pelos linfócitos T CD4, não observamos diferenças significativas entre os grupos avaliados (Gráfico 9). Por outro lado, células T CD4 de pacientes acometidos pelas fases aguda e crônica da Chikungunya apresentaram redução na expressão da CD73 comparados aos voluntários saudáveis (Gráfico 10). Com relação a co-expressão CD39/CD73, o grupo agudo não apresentou alterações significativas porém, a cadeia purinérgica se mostrou diminuída em fase crônica comparada ao grupo controle (Gráfico 11).

Gráfico 9. Expressão de CD39 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).



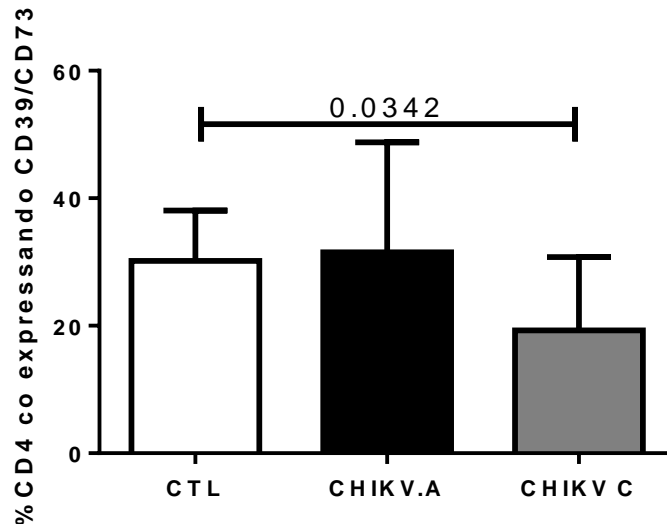
Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que expressam CD39 dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). A inexistência de valores acima do gráfico de barras revela a ausência de alterações significativas com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

Gráfico 10. Expressão de CD73 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).



Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que expressam CD73 dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). Os valores situados acima do gráfico em barras representam diferença significativa com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

Gráfico 11. Co-expressão de CD39/CD73 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).

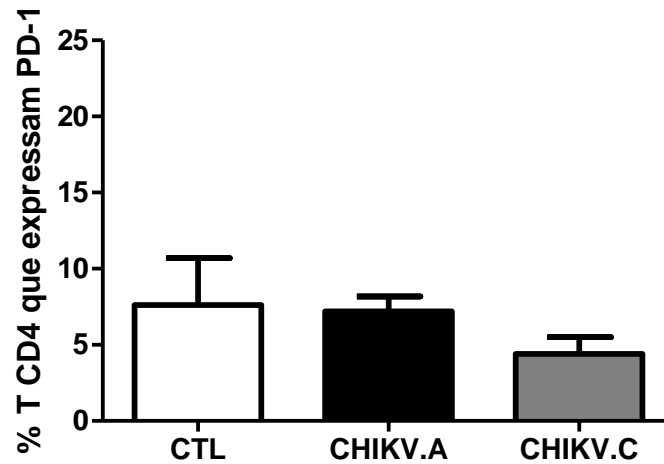


Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que co-expressam CD39 e CD73 dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). A inexistência de valores acima do gráfico de barras revela a ausência de alterações significativas com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR PD-1 E DA PRODUÇÃO DO RECEPTOR CTLA-4 PELOS LINFÓCITOS T CD4 DURANTE AS FASES AGUDA E CRÔNICA DA CHIKUNGUNYA EM HUMANOS.

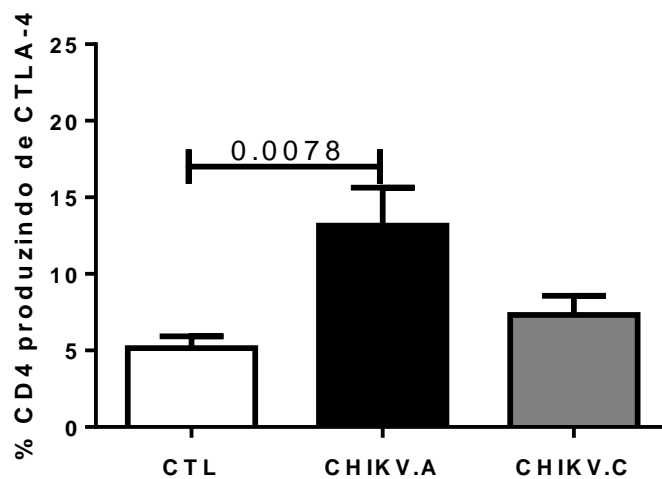
Quanto a expressão do PD-1, a análise comparativa entre os grupos de estudo não demonstraram diferenças significativas em ambas as fases quanto a expressão da PD-1 (Gráfico 12). A produção do receptor CTLA-4 também foi avaliada. Ao analisarmos os grupos em estudo, observou-se um aumento na produção deste receptor pelas células T CD4 de indivíduos em fase aguda da doença. Porém, a avaliação do grupo CHIKV.C não demonstrou diferença significativa comparadas com grupos CTL e CHIKV.A (Gráfico 13).

Gráfico 12. Expressão de PD-1 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).



Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que expressam PD-1 dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). A inexistência de valores acima do gráfico de barras revela a ausência de alterações significativas com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

Gráfico 13. Produção da CTLA-4 pelas células T CD4 de pacientes infectados com o vírus da Chikungunya nas fases aguda (CHIKV.A), crônica (CHIKV.C) e do grupo controle (CTL).



Fonte: Própria. Frequência de células T CD4+ que produzem CTLA-4 dos grupos controle (n=7), agudo (n=7) e crônico (n=4). Os valores situados acima do gráfico em barras representam diferença significativa com $p < 0.05$. As análises comparativas foram realizadas através do teste não paramétrico Mann-Whitney e teste T não pareado.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As células T CD4⁺ apresentam participação central nas respostas imunológicas. Dentre os diversos papéis destacam-se o estímulo à produção de anticorpos pelas células B, manutenção e melhoria das funções citotóxicas dos linfócitos T CD8⁺ e regulação das ações de leucócitos componentes da imunidade inata. Sua capacidade em auxiliar nas respostas contra uma gama de microorganismos patogênicos ocorre em virtude de sua diferenciação em subpopulações com características distintas (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Esta é desencadeada por um microambiente composto por rede de citocinas que, através da ativação de fatores de transcrição, direcionam os linfócitos T CD4 a um determinado perfil fenotípico (LUCKHEERAM et al., 2012).

A análise em citômetro de fluxo do sangue periférico de voluntários, revelou que pacientes em fase aguda apresentaram redução na frequência populacional das células T CD4. Estudos realizados em pacientes acometidos pela doença demonstraram um quadro de linfopenia (redução no número de linfócitos) cujo retorno aos níveis basais ocorreu após cerca de 2 meses (PETITDEMANGE et al., 2015). Wauquier e colegas em 2015 observaram que no início da fase aguda houve maior ativação das células T CD8⁺ enquanto que os linfócitos T CD4⁺ sofreram apoptose mediada por CD95 (receptor de morte mediador de apoptose celular) (PETER et al., 2015) nos primeiros dois dias após o início dos sintomas. Assim, nossos resultados em estágio agudo corroboram com dados revelados em outras pesquisas. No entanto, apenas a análise quantitativa de linfócitos T CD4⁺ são insuficientes para compreensão do papel destas células na imunopatologia da Chikungunya.

Objetivando elucidar a correlação do papel das células em estudos com algumas manifestações clínicas, a produção de citocinas foi analisada. Estas correspondem a pequenas proteínas, importantes na modulação das respostas imunológicas através de mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos (ZHANG; AN, 2007). Nesse cenário, tem-se o IFN- γ , apresentando papel fundamental nas funções fagocíticas dos macrófagos, na síntese de citocinas pró-inflamatórias e compostos antimicrobianos e na apresentação antigênica pela indução da síntese de MHC classe I e classe II (ABBAS, 8^o ed, 2015).

LABADIE, GRAND e ROQUES, 2010, ao analisarem mecanismos desencadeados pela CHIKV durante a fase aguda em modelos primatas não humanos, observaram uma correlação entre a produção de determinadas citocinas e a carga viral. O interferon- γ se mostrou aumentado a partir do segundo dia após o início dos sintomas que, em conjunto com outras citocinas pró-inflamatórias, não foram capazes de prevenir o estabelecimento da doença. No entanto, SOURISSEAU e colaboradores, em 2007, demonstraram a sensibilidade do vírus aos IFN- α , IFN- β e IFN- γ , no que concerne seus mecanismos de replicação em células HeLa infectadas. Assim, sugere-se que o aumento na produção do IFN- γ pelas células T CD4 estejam relacionadas com a tentativa do organismo em promover o controle da carga viral sendo, porém, insuficiente no impedimento da disseminação do patógeno no organismo.

Sabe-se que as células T CD4⁺ possuem potencial migratório para regiões articulares (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015). Assim, supõe-se que durante a fase aguda, poderiam contribuir com o desenvolvimento das características artritogênicas na doença por meio de um microambiente pró-inflamatório auxiliado pelo IFN- γ . Porém, sua ineficiência nos mecanismos de clearance do patógeno justificariam, em parte, a persistência de antígenos e RNA viral facilitando, conseqüentemente, o estabelecimento da cronicidade da doença. Nesta, sugere-se que a redução na síntese de IFN- γ , como revelado no presente trabalho, estaria envolvida na persistência de partículas virais bem como na atenuação dos sinais clínicos quando comparados à fase aguda.

A TGF β é uma citocina cujo precursor inativo necessita passar por processamento no interior celular para que, ao ser expresso, desempenhe funções imunomoduladoras. Em células T CD4⁺, este peptídeo atua inibindo a diferenciação nos subtipos pró-inflamatórios Th1 e Th2 além de auxiliar na diferenciação do perfil Th17. Por outro lado, ao induzir a expressão do fator de transcrição Foxp3, a TGF β diferencia linfócitos T CD4⁺ naíve em células T reguladoras induzíveis (iTreg) além de contribuir com a sobrevivência de células T reguladoras naturais (nTreg) (TRAVIS; SHEPPARD 2014). Quanto a produção desta citocina, nossos resultados não mostraram diferença estatística significativa entre os grupos avaliados. Vale ressaltar que o presente estudo avalia as células T CD4 totais não caracterizando

fenotipicamente subpopulações específicas. Assim, o resultado não reflete na produção desta citocina no comportamento das diferentes subpopulações de CD4+ na doença.

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina produzida por células da imunidade inata e adaptativa, atuando como um dos principais moduladores negativos da magnitude das respostas pró-inflamatórias (ROJAS et al., 2017). Nossos resultados revelaram aumento na produção da IL-10 em pacientes na fase aguda da Chikungunya, com retorno aos níveis basais durante a fase crônica. Estudos realizados por Brooks e colaboradores em 2006, observaram que camundongos infectados com uma variante do vírus da Coriomeningite Linfocitária (LCMV), incapazes de expressarem esta interleucina, apresentaram resposta robusta das células T pró-inflamatórias efetoras com um rápido mecanismo de *clearance* viral. Somados a isso, o bloqueio de receptores IL-10R em murinos C57BL/6 infectados pela variante viral não apenas proporcionou o aumento e manutenção de mecanismos desenvolvidos pelos linfócitos T como reduziu rapidamente a carga viral desse modelo animal. Assim, sugere-se que o aumento da IL-10 na fase aguda contribua com a redução de mecanismos pró-inflamatórios robustos desencadeados pela CHIKV atenuando, assim, os danos teciduais consequentes.

No entanto, a redução das respostas pró-inflamatórias poderia comprometer mecanismos de *clearance* das partículas virais contribuindo com sua persistência no organismo e facilitando o estabelecimento da fase crônica. Por outro lado, o retorno aos níveis basais desta citocina meses após o início da infecção, auxiliaria na eliminação de estruturas virais remanescentes. Resultados semelhantes, porém em células T CD8+ presentes em sangue periférico dos mesmos pacientes introduzidos no presente trabalho foram revelados em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa. Nesse contexto, houve aumento de IL-10 durante a fase aguda e crônica comparados com o grupo controle. No entanto, observou-se redução dessa citocina em estágio crônico quando comparado com o grupo agudo (DIAS et al., 2018). Assim, a redução de mecanismos imunossupressores podem contribuir com a persistência dos sintomas desencadeadas, principalmente, por respostas pró-inflamatórias frente a antígenos virais persistentes em sítios imunoprivilegiados.

Dentre as funções da IL-10, destaca-se a capacidade de modulação negativa das respostas desencadeadas pelas células Th1 principalmente através da inibição de síntese de INF- γ (ABBAS 8° ed. 2015). Como demonstrado, observa-se que durante a fase aguda, ambas as citocinas analisadas apresentaram um aumento em sua produção. Yamana e colegas, em 2004, relataram que linfócitos T CD4+ de pacientes com artrite reumatoide em sua fase ativa possuíam resistência a ação inibitória da IL-10 no que concerne a produção de IFN- γ . Em paralelo, as células T CD8+ apresentaram aumento na produção da interleucina-10, auxiliando no desenvolvimento de um possível micro ambiente imunossupressor (DIAS et al., 2018). Sabendo que a artrite reumatoide e a Chikungunya compartilham características imunológicas e sintomatológicas (AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017) sugere-se que em fase aguda os linfócitos T CD4+ apresentem vias de sinalização alternativas para a síntese do IFN- γ que não sejam bloqueadas ou dificultadas pelos mecanismos inibitórios da IL-10.

Somadas à produção de citocinas, a expressão das ectoenzimas CD39 e CD73 foram analisadas. Estas são ectonucleotidases relacionadas com o controle da duração, magnitude e natureza química dos sinais purinérgicos através da conversão da adenosina trifosfato (ATP), molécula de caráter pró-inflamatório, em adenosina, de papel imunossupressor. A CD39 consiste em uma enzima integral de membrana que fosfohidroliza o ATP em adenosina monofosfato (AMP) contribuindo com a redução dessa molécula no ambiente extracelular (ANTONIOLI et al., 2013). Nossos estudos revelaram que a CD39, comparada com o grupo controle, não apresentou diferença estatística significativa em ambas as fases da doença, sugerindo uma não modulação deste parâmetro pelas células T CD4+.

O segundo passo no metabolismo das purinas ocorre através da CD73 que realiza a desfosforilação do AMP gerando adenosina (ANTONIOLI et al., 2013). No âmbito imunológico, e em meio extracelular, esta molécula atua através dos receptores A₂A e A₂B sendo, estes, expressos em várias células do sistema imune. (CEKIC; LINDEN, 2016). A análise dos linfócitos T CD4 revelaram diminuição na expressão da CD73 em ambas as fases, sendo, no estágio crônico mais acentuada. Sugere-se, portanto, que a redução dessa enzima auxiliaria na diminuição da adenosina extracelular no microambiente. Além disso, com a manutenção na

expressão da CD39, um possível desbalanço entre as vias pró-inflamatórias, desencadeadas pelo ATP e imunossupressoras, estimuladas pela adenosina, contribuiriam com os mecanismos de *clearance* viral. Por outro lado, infere-se que a redução desta enzima na fase crônica seria uma resposta do organismo no combate as partículas virais remanescentes a exemplo do RNA e peptídeos.

De fato, *Smith e colaboradores (2015)* avaliaram a expressão dessa enzima em linfócitos T CD8 de pacientes acometidos pela Artrite Idiopática Juvenil em suas fases branda e grave. No primeiro grupo, observou-se maior presença da CD73 no fluído sinovial com conseqüente aumento dos níveis extracelulares de adenosina comparado a voluntários com sintomatologia grave. *Chrobak et al., 2015*, por sua vez, relataram que modelo de camundongos com artrite colágeno-induzida (utilizado para o estudo de artrite reumatoide) deficientes na expressão de CD73 apresentaram maior produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento das respostas Th1, bem como destruição nas regiões articulares apresentando, assim, maior susceptibilidade para a doença. Sabendo que Chikungunya e artrite reumatoide compartilham similaridades sintomatológicas e respostas imunológicas (*AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017*) e que os linfócitos T CD4 apresentam capacidade de migração para regiões sinoviais na doença (*MORRISON et al., 2011*), sugere-se que alterações na homeostase purinérgica caracterizada por uma menor produção de adenosina e possível manutenção dos níveis de ATP extracelular, poderia auxiliar nas características clínicas articulares.

Regateiro e colaboradores (2011) demonstraram a capacidade da TGF- β em induzir a expressão da CD73 em linfócitos T CD4. No entanto, este mecanismo se mostrou prejudicado através da ação das citocinas IL-10 e IFN- γ . Como revelado acima, durante a fase aguda as células T auxiliaadoras apresentaram um aumento na produção de ambas as proteínas, retornando, porém, aos níveis basais em estágio crônico. Quanto a síntese do TGF β , nossos estudos não demonstraram diferenças estatísticas significativas em ambas as fases. Em paralelo, estudos com sangue periférico dos mesmos pacientes citados neste trabalho, revelaram que a produção desta citocina pelos linfócitos T reguladores diminuiu no estágio agudo e de maneira mais acentuada em fase crônica (*Macêdo, 2018, p. 46*). Assim, supõe-se que o

microambiente observado no sangue periférico em nossas pesquisas poderia contribuir com a redução da expressão da CD73 observada em células T CD4+.

A coexpressão da CD39/CD73 pelos linfócitos T CD4+ também foi analisada, revelando redução em fase crônica quando comparado ao grupo controle. Diante do exposto, sugere-se que a redução na coexpressão da cadeia enzimática envolvida no metabolismo purinérgico pelas células T CD4+ auxiliariam em aumento da concentração extracelular de ATP em paralelo com redução quantitativa de adenosina. Como consequência, tem-se possível estabelecimento de um microambiente pro-inflamatório que contribuiria com danos teciduais em algumas regiões do organismo. Assim, somado a capacidade de infiltração de linfócitos T CD4+ para regiões articulares (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015) infere-se que estas poderiam ser acometidas pela destruição tecidual resultando em sinais clínicos como artralgia durante o estágio crônico. Por outro lado, o desbalanço purinérgico favorável ao aumento de ATP, poderia contribuir com o clearance de partículas virais remanescentes.

A produção do receptor CTLA-4 também foi avaliada. Conhecida por CD152, esta glicoproteína transmembrana atua na regulação negativa de ativação dos linfócitos T (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). Este necessita, além do reconhecimento antigênico, de sinais coestimuladores proporcionados, principalmente, pela proteína CD28. Através da interação desta com receptores CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), expressos em células apresentadoras de antígenos (APC), diversas vias de sinalização são desencadeadas resultando, assim, no início responsivo das células T (ABBAS, 8º ed, 2015). Nesse contexto, o CTLA-4 exerce suas funções inibitórias através de 3 mecanismos principais: competição entre sinais inibitórios e estimuladores, sinalização negativa direta e remoção das moléculas B7 da superfície de APCs (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006).

Nossos resultados revelaram uma maior produção de CTLA-4 no grupo agudo quando comparado a indivíduos saudáveis o que poderia resultar num aumento competitivo entre os mecanismos de sinalização desencadeados pelo CTLA-4 e CD28. Sabe-se que a sinalização proporcionada por este último conduz a proliferação, sobrevivência, diferenciação e aumento enérgico dos processos metabólicos celulares (BUCHBINDER; MD; ANUPAM, 2016). Assim, sugere-se que

um aumento na produção de CTLA-4 pelos linfócitos T CD4 estariam envolvidos na redução da frequência populacional de tais células contribuindo, assim, com o quadro de linfopenia descrito em literatura.

Ao avaliar, na Chikungunya aguda, substâncias com potencial terapêutico na AR, Miner et al., 2017 demonstrou que certos compostos de ativação do CTLA-4 proporcionaram melhora do quadro inflamatório assim como na redução dos edemas articulares. A diminuição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias com a consequentemente redução da frequência de infiltração de células do sistema imunológico contribuíram com a melhora do quadro. Nesse contexto, sugere-se que o aumento da produção do CTLA-4 na fase aguda contribua com a atenuação da severidade das respostas pró-inflamatórias bem como das características clínicas da doença além de auxiliar na evasão do CHIKV no organismo facilitando, assim, estabelecimento da fase crônica.

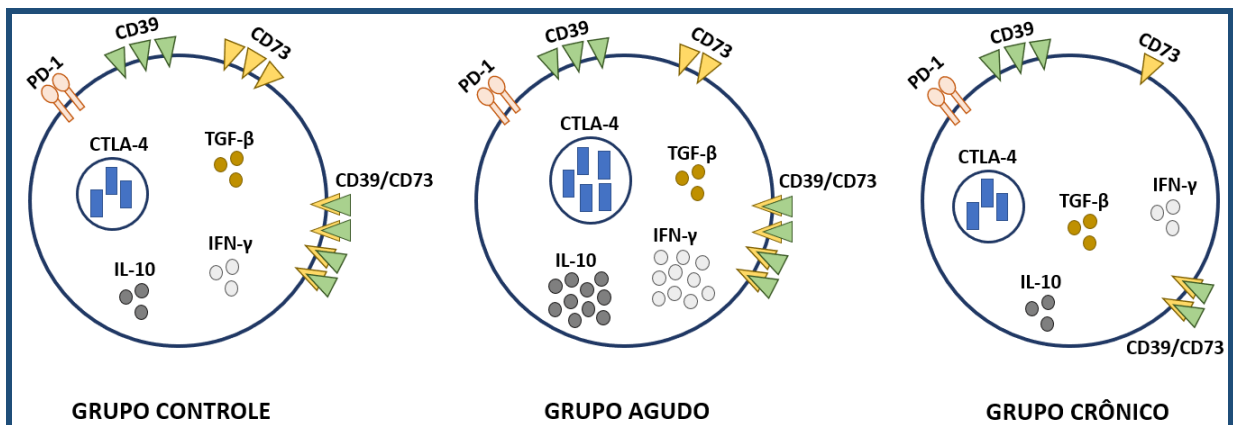
Durante a fase crônica não foram revelados resultados estatísticos significativos na produção do CTLA-4. No entanto, observou-se tendência na redução desse receptor no qual o número de componentes poderia justificar uma não diferença estatística. Portanto, faz-se necessária uma extensão na análise deste parâmetro, no qual o aumento no número de voluntários poderia confirmar ou refutar a hipótese sugerida. Caso haja confirmação, pesquisas mostram que a duração da carga viral circulante varia de 7 a 12 dias após o início dos sintomas (JAFFAR-BANDJEE et al, 2009) tendo seu pico variável de acordo com o local da epidemia (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015). Além disso, sabe-se que a expressão de CTLA-4, diferentemente da CD28, aumenta com a ativação dos linfócitos T (CHAN et al., 2013). Assim, infere-se que a redução da carga viral circulante esteja diretamente relacionada a uma diminuição da ativação de células T CD4 o que justificaria uma possível diminuição na produção do CTLA-4 na fase crônica. Além disso, tal redução poderia contribuir com mecanismos inflamatórios em resposta a persistência de componentes virais remanescentes.

Por fim, foi analisada a expressão do PD-1 (Morte Celular Programada 1) pelas células T CD4 nas fases aguda e crônica. O PD-1 corresponde a um regulador negativo das funções das células T através da inibição em mecanismos de proliferação, produção de citocinas e sobrevivência celular. A elevada expressão

dessa estrutura é um importante marcador de exaustão celular e geralmente o aumento de produção ocorre em infecções crônicas e câncer (BUCHBINDER; ANUPAM, 2016). Nossos resultados não mostraram diferenças estatísticas significativas sugerindo que, em ambas as fases, esse parâmetro não é modulado. Além disso, com esse resultado, infere-se que o CTLA-4 esteja entre os principais mecanismos inibitórios de contato célula-célula na fase aguda da doença.

Diante do exposto, demonstra-se que os linfócitos T CD4+ podem desempenhar papel fundamental na imunopatologia de infecções causadas pelo vírus da Chikungunya. Através de mecanismos pró-inflamatórios e imunossupressores, as células em estudo podem contribuir com determinadas características clínicas observadas bem como com o estabelecimento da cronicidade que ocorre em parcela considerável da população acometida pela doença (Figura 5).

Figura 5. Representação das alterações imunológicas entre os grupos controle, agudo e crônico.



Fonte: Própria. A imagem revela a modulação dos parâmetros imunológicos pró-inflamatórios e imunossupressores em células T CD4+ de voluntários acometidos pelas fases aguda e crônica da Chikungunya.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os linfócitos T CD4 são células do sistema imunológico que apresentam um papel chave na modulação das respostas desencadeadas por células que compõem as vias inata e adaptativa. Ao longo dos anos, estudos vem demonstrando sua importante participação em características imunológicas e sintomatológicas originadas pelo vírus da Chikungunya. Assim, cientes de sua importância na doença, o presente trabalho objetivou contribuir com o entendimento de possíveis mecanismos desenvolvidos durante as fases aguda e crônica, pelas células T auxiliaadoras.

Durante a vigência do projeto, foi observada redução na frequência populacional de células T CD4 na fase aguda. Somados a isso, o aumento na produção das citocinas IL-10 e IFN- γ em estágio agudo com retorno aos níveis basais na fase crônica e ausência de diferença estatística significativa para produção de TGF β compuseram os resultados associados às citocinas. Quanto a análise de enzimas envolvidas no metabolismo de purinas, a expressão da CD73 se mostrou reduzida em ambas as fases da doença enquanto que a CD39 assim como a co-expressão CD39/CD73 manifestaram semelhança com o grupo controle. Acerca dos receptores inibitórios avaliados, não foram observadas diferenças estatísticas significativas quanto a expressão da PD-1 enquanto que o CTLA-4 apresentou aumento na fase aguda.

Durante a vigência do projeto, revelamos que a modulação de mecanismos pró-inflamatórios (IFN- γ) e imunossupressores (IL-10, CD39/CD73 e CTLA-4) podem auxiliar na compreensão acerca da participação dos linfócitos T CD4+ em infecções pelo CHIKV. Infere-se, portanto, que sinais artritogênicos bem como a persistência sintomática, característica da fase crônica poderia ser auxiliada pelas células T auxiliaadoras. No entanto, torna-se importante a realização de estudos adicionais para que se possa confirmar ou refutar as sugestões aqui fornecidas. Além disso, se faz necessário o aumento no número de voluntários nos grupos em estudo além de ampliação de parâmetros imunológicos a serem analisados. Com isso, objetiva-se esclarecer a diversidade funcional das células em estudo durante infecções estabelecidas pelo CHIKV.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
2. AGARWAL et al. Evidence of Experimental Vertical Transmission of Emerging Novel ECSA Genotype of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1-6, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080107>>. Acesso em: 21 jul. 2019.
3. AMDEKAR, Sarika; PARASHAR, Deepi; ALAGARASU, Kalichami. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. **Viral Immunology**, v. 30, n. 10, p. 1-12, 2017. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vim.2017.0052?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=vim>. Acesso em: 22 jul. 2019.
4. ANTONIOLI et al. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 6, p. 355-367, 2013. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3674206/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
5. BEAVIS et al. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. **Cell press**, v. 33, n. 5, p. 231-237, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490612000403?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
6. BRASIL, Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016**. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>>. Acesso em 01 de março de 2020.

7. BRASIL, Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018** Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>>. Acesso em 01 de março de 2020.

8. BRASIL, Ministério da Saúde. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52.** Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>>. Acesso em 01 de março de 2020.

9. BRASIL, Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica do sarampo no Brasil 2019: janeiro a dezembro.** Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/10/Boletim-epidemiologico-SVS-06.pdf>>. Acesso em 01 de março de 2020.

10. BROOKS et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. **Nature**, v. 12, n. 11, p. 1301-1309, 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nm1492>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

11. BUCHBINDER, Elizabeth I.; DESAI, Anupam. CTLA-4 and PD-1 Pathways Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. **American Journal of Clinical Oncology**, v. 39, n. 1, p. 98-106, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558876>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

12. CEKIC, Caglar; LINDEN, Joel. Purinergic regulation of the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 16, n. 3, p. 177-192, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri.2016.4>>. Acesso em: 17 jul.2019.

13. CHAN et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. **Nature**, v. 15, n. 1, p. 25-32, 2013. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/gene201357>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

14. CHEN et al. Chikungunya virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase core domain displays detergent-sensitive primer extension and terminal adenylyltransferase activities. **Antiviral Research**, v. 143, p. 38-47, 2017. Disponível em: <[https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-3542\(16\)30688-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166-3542(16)30688-X)>. Acesso em: 01 jun. 2019.
15. CHROBAK et al. CD73 Plays a Protective Role in Collagen-Induced Arthritis. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 6, p. 2487-2492, 2015. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/194/6/2487.long>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
16. COFFEY, Lark L.; FAILLOUX, Anna-Bella; WEAVER, Scott C. Chikungunya Virus–Vector Interactions. **Viruses**, v. 6, n. 11, p. 4628-4663, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246241/>>. Acesso em 21 jul. 2019.
17. COOLES, Faye A.H.; ISAACS, John D. Pathophysiology of Rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 50, n. 2, p. 233-240, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15098367>>. Acesso em: 22 jul 2019.
18. CUNHA, Rivaldo V.; TRINTA, Karen S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment – A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523-531, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000800523>. Acesso em 21 jul. 2019.
19. DIAS, et al. Human CD8 T cell activation in acute and chronic Chikungunya infection. **Immunology**, v. 155, n. 4, p. 499-504, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.12992>>. Acesso em: 03 de mar 2020.
20. DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arbovirose emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 30, p. 1-6, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-89102017000100606&script=sci_arttext&tling=pt>. Acesso em 21 jul. 2019.

21. DUIJL-RICHTER et al. Early Events in Chikungunya Virus Infection – From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. **Viruses**, v. 7, p. 3647-3674, 2015. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/7/7/2792>>. Acesso em: 20 jul. 2019.
22. FAAS, M.M.; SÁEZ, T.; VOS, P. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses?. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 55, p. 9-19, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299716300826?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
23. FIRTH et al. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, v.5, n. 108, p. 1-19, 2008. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-5-108>>. Acesso em: 20 jul. 2019.
24. FOX, Julie M.; DIAMOND, Michael S. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 11, p. 4210-4218, 2016. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/197/11/4210.long>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
25. HAWMAN et al. Chronic Joint Disease Caused by Persistent Chikungunya Virus Infection Is Controlled by the Adaptive Immune Response. **Journal of Virology**, v. 87, n. 24, p. 13878-13888, 2013. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/87/24/13878.long>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
26. HAYDAY, 2000. $\gamma\delta$ CELLS: A Right Time and a Right Place for a Conserved Third Way of Protection. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 975-1026, 2000. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/full/10.1146/annurev.immunol.18.1.975>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
27. HIGGS, Stephen; VANLANDINGHAM, Dana L. Chikungunya Virus and Zika Virus Transmission Cycles. **Chikungunya and Zika Viruses**. Estados Unidos: Academic Press, 2017. Disponível em:

- <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128118658000027>>. Acesso em: 21 jul. 2019.
28. HLASTEAD, Scott B. Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas. **Emerging Infections Disease**, v. 21, n. 4, p. 557-561, 2015. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/21/4/14-1723_article>. Acesso em: 23 jul. 2019.
29. JAFFAR-BANDJEE, et al. Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. **Microbes and Infection**. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 14-15, p. 1206-1218, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1286457909002342?via%3Dihub>>. Acesso em 27 jul. 2019.
30. JR et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Trop.** v. 188, p. 213-224. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0001706X18309379?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 jul. 2019.
31. KAM et al. Early Appearance of Neutralizing Immunoglobulin G3 Antibodies Is Associated With Chikungunya Virus Clearance and Long-term Clinical Protection. **The Journal of Infection Disease**, v. 205, n. 7, p. 1147-1154, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/205/7/1147/790509>>. Disponível em: 22 jul. 2019.
32. KULKARNI et al. Regulatory T cells and IL-10 as modulators of chikungunya disease outcome: a preliminary study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 12, p. 2475-2481, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-017-3087-4>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
33. KUMAR et al. Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1045, p. 1-14, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-018-19295-0>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

34. KUMAR et al. Mouse macrophage innate immune response to chikungunya virus infection. **Virology Journal**, v. 9, n. 313, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-313>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
35. LABADIE et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 3, p. 894-906, 2010. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/40104>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
36. LATHA et al. $\gamma\delta$ T cell-mediated immune response in disease and therapy. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 571, p. 1-11, 2014. Disponível em: <<http://www.readcube.com/articles/10.3389/fimmu.2014.00571>>. Acesso em: 04 ago. 2019.
37. LEE et al. Expanding regulatory T cells alleviates chikungunya virus-induced pathology in mice. **Journal of Virology**, v. 89, n. 15, p. 7893-7904, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505607/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
38. LI et al. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. **Nature**, v. 468, p. 705-710, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature09546>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
39. LIANG et al., Differentiation and Function of T Cell Subsets in Infectious Diseases. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1-2, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/3439025/>>. Acesso em: 17 jun 2019.
40. LONG et al. $\gamma\delta$ T Cells Play a Protective Role in Chikungunya Virus-Induced Disease. **Journal of Virology**, v. 90, n. 1, p. 433-443, 2016. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/90/1/433.long>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

41. LONG, Kristin M.; HEISE, Mark T. Protective and Pathogenic Responses to Chikungunya Virus Infection. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4564112/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
42. LUCKHEERAM et al. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-12, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jir/2012/925135/>>. Acesso em 19 ago. 2019.
43. LUM et al. An Essential Role of Antibodies in the Control of Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6294-6302, 2013. Acesso em: <<https://www.jimmunol.org/content/190/12/6295.long>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
44. MACÊDO, Bruna de Gois. **Avaliação das Respostas de Células T Reguladoras (Treg) em Fases Aguda e Crônica da Chikungunya em Humanos**. 2018. 87 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
45. MAGUIRAGA et al., Chikungunya Disease: Infection-Associated Markers from the Acute to the Chronic Phase of Arbovirus-Induced Arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 3, p. 1-10, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001446>>. Acesso em: 23 jul 2019.
46. MANIMUNDA 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. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/104/6/392/1941200?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 21 jul. 2019.
47. MAUCOURANT et al. Control of Acute Arboviral Infection by Natural Killer Cells. **Viruses**, v. 11, n. 131, p. 1-15, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/11/2/131>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

48. MCCARTHY, Mary K.; DAVENPORT, Bennett J. J.; MORRISON, Thomas E. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018. p. 1-26. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30656438>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
49. MESHAM et al. Multiple Host Factors Interact With the Hypervariable Domain of Chikungunya Virus nsP3 and Determine Viral Replication in Cell-Specific Mode. **Journal of Virology**, v. 92, n. 16, p. 1-24, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6069204/>>. Acesso em: 13 jun. 2019.
50. MELTON et al. Alphavirus 6K Proteins Form Ion Channels. The Journal of Biological Chemistry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p. 46923-46931, 2002. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/277/49/46923.full>>. Acesso em: 01 jun. 2019.
51. METZ, Estefan W.; PIJILMAN, Gorben P. Function of Chikungunya Virus Structural Protein. In: OKEOMA, Chioma M. **Chikungunya Virus: Advances In Biology, Pathogenesis And Treatment**. Estados Unidos: Springer International Publishing Switzerland, 2016. p. 63-74.
52. MICHLMAYR et al. Comprehensive innate immune profiling of chikungunya virus infection in pediatric cases. *Molecular System Biology*, v. 14, n. 8, p. 1-25, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30150281>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
53. MILLER et al. First Field Evidence For Natural Vertical Transmission Of West Nile Virus In *Culex univittatus* Complex Mosquitoes From Rift Valley Province, Kenya. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 2, p. 240-246, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10813479>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
54. MINER et al. Therapy with CTLA4-Ig and an antiviral monoclonal antibody controls chikungunya virus arthritis. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 375, p. 1-9, 2017. Disponível em: <<https://stm.sciencemag.org/content/9/375/eaah3438.short>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

55. MONTEIRO et al. Aedes–Chikungunya Virus Interaction: Key Role of Vector Midguts Microbiota and Its Saliva in the Host Infection. **Frontiers of Microbiology**, v. 10, n. 492, p. 1-13, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00492/full>>. Acesso em: 21 jul. 2019.
56. MORRISON et al. (2011) A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: Evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. **Am J Pathol**, v. 178, n. 1, p. 32–40. Disponível em: <[https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(10\)00064-7/fulltext](https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(10)00064-7/fulltext)>. Acesso em: 13 set. 2019.
57. NARWAL et al. Crystal structure of chikungunya virus nsP2 cysteine protease reveals a putative flexible loop blocking its active site. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 451-462, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018300114?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 mai. 2019.
58. OLIVEIRA, Ricardo Lourenço; FAILLOUX Anna-Bella. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 6, p. 1-11, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005698>>. Acesso em: 21 jul, 2019.
59. PAIXÃO et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Higiene**, v. 112, n. 7, p. 301-316, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article/112/7/301/5051873>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
60. PETER et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 4, p. 549-559, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356349/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
61. PETERSEN LR; POWERS AM. Chikungunya: epidemiology. **F1000Research**, v.5, p. 1-8, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4754000/>>. Acesso em: 20 jul. 2019.

62. PETITDEMANGE, Caroline; WAUQUIER, Nadia; VIEILLARD, Vicent. Control of immunopathology during chikungunya virus Infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 4, p. 846-855, 2015. Disponível em: <[https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(15\)00183-9/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(15)00183-9/fulltext)>. Acesso em: 22 jul. 2019.
63. PETITDEMANGE et al. Association of HLA Class-I and Inhibitory KIR Genotypes in Gabonese Patients Infected by Chikungunya or Dengue Type-2 Viruses. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0108798>>. Acesso em: 30 mai. 2019.
64. PHUKLIA et al. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. **Virus Research**, v. 177, n.2, p. 179-188, 2013. Acesso em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170213002906?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
65. PORTA, Jason et al. Structural Studies of Chikungunya Virus-Like Particles Complexed with Human Antibodies: Neutralization and Cell-to-Cell Transmission. **Journal of Virology**, v. 90, n. 3, p. 1169-1177, 2016. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=26537684>>. Acesso em: 21 jul. 2019.
66. REGATEIRO et al. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . **Eur. J. Immunol**, v. 41, n. 10, p. 2955-2965, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201141512>>. Acesso em 01 set. 2019.
67. ROJAS et al. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1-14, 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jir/2017/6104054/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

68. SCHNIERLE, Barbara S. Cellular Attachment and Entry Factors for Chikungunya Virus. **Viruses**, v. 11, n. 1078, p. 1-9, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6893641/pdf/viruses-11-01078.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2020.
69. SCHRODER et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004. Disponível em: <<https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1189/jlb.0603252>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
70. SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature**, v. 8, p. 491-500, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2368>>. Acesso em: 22 jun. 2019.
71. SHARMA et al. Structure-function insights into chikungunya virus capsid protein: Small molecules targeting capsid hydrophobic pocket. **Virology**, v. 515, p. 223-234, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004268221730435X?via%3Diuhub>>. Acesso em: 20 jul. 2019.
72. SILVA et al. Chikungunya surveillance in Brazil: challenges in the context of public Health. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n.3, p. 1-10, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222018000300301&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 18 mai. 2019.
73. SILVA, Laurie A; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5330729/>>. Acesso em: 01 jun. 2019.
74. SMITH et al. Correlation of Low CD73 Expression on Synovial Lymphocytes with Reduced Adenosine Generation and Higher Disease Severity in Juvenile Idiopathic Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 12, n. 2, p. 545-554. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.38959>>. Acesso em: 02 set. 2019.

75. SNYDER, Anthony J.; MUKHOPADHYAY, Suchetana. The Alphavirus E₃ Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. **Journal of Virology**, v.86, n. 24, p. 13609-13620, 2012. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/86/24/13609>>. Acesso em: 19 jul. 2019.
76. SNYDER et al. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. **Journal of Virology**, v. 87, n. 15, p. 8511-8523, 2013. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=23720714>>. Acesso em: 01 jun. 2019.
77. SOURISSEAU et al. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. **Plos Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 804-817, 2007. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.0030089>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
78. SPULL et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Actin-, and Microtubule-Dependent Transport of Semliki Forest Virus Replication Complexes from the Plasma Membrane to Modified Lysosomes. **Journal of Virology**, v. 84, n. 15, p. 7543-7557, 2010. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=20484502>>. Acesso em: 20 jul. 2019.
79. TANABE, Ithallo S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 8, n. 345, p. 1-15, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6191487/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
80. TEFT, Wendy A.; KIRCHHOF, Mark G.; MADRENAS, Joaquín. A Molecular Perspective of CTLA-4 Function. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 65-97, 2006. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.24.021605.09053>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
81. TEO 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. Disponível em: <<https://www.jimmunol.org/content/190/1/259.long>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

82. TEO et al. Fingolimod treatment abrogates chikungunya virus–induced arthralgia. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 375, p. 1-11, 2017. Disponível em: <<https://stm.sciencemag.org/content/9/375/eaal1333.short>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
83. THANAPATI, Subrat; DAS, Rumki and TRIPATHY, Anuradha S. Phenotypic and functional analyses of NK and NKT-like populations during the early stages of chikungunya infection. **Frontiers of Microbiology**, v. 6, n. 895, p. 1-11, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4555083/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
84. TRAVIS, Mark A.; SHEPPARD, Dean. TGF- β Activation and Function in Immunity. **Annual Review Immunology**, v. 32, p. 51-82, 2014. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-immunol-032713-120257?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=immunol>. Acesso em: 05 ago. 2019.
85. TSETSARKIN et al. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 4, p. 310-317, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625711000551?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
86. TSETSARKIN, Konstantin A.; CHEN, Rubing; WEAVER, Scott C. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. **Curr Opin Virol**, v. 16, n. , p. 143-150, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625716300116?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 jul. 2019.
87. VAIRO et al. Chikungunya Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infect. Dis. Clin. North Am**, v. 33, n. 4, p. 1003-1025, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891552019300650?via%3Dihub>>. Acesso em: 20 jan. 2020.
88. WALDOCK et al. The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. **Pathog Glob Health**. V. 107, n. 5, p. 224-241,

2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1179/2047773213Y.0000000100?journalCode=yphg20>>. Acesso em: 21 jul.2019.
89. WAUQUIER et al. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. **The Journal of Infection Disease**, v.204, n. 1, p. 115-123, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/204/1/115/2192116>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
90. YAMANA et al. Resistance to IL-10 inhibition of interferon gamma production and expression of suppressor of cytokine signaling 1 in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 6, n. 6, p. 567-577, 2004. Disponível em: <<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC1064873&blobtype=pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2019.
91. ZELLER, Herve; BORTEL, Wim Van; SUDRE, Bertrand. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013–2014. **The Journal of Infections Diseases**, v. 214, n. 5, p. 436-440, 2016. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/214/suppl_5/S436/2632642>. Acesso em: 22 jul. 2019.
92. ZHANG, Jun-Ming; NA, Jianxiong. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2785020/>>. Acesso em: 22 jul. 2019.
93. ZHU, Jinfang; YAMANE, Hedehiro; PAUL, E. William. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 48, p. 445-489, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20192806>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

GLOSSÁRIO

9. GLOSSÁRIO

ARBOVIROSE: Virose causada por arbovírus.

ARBOVÍRUS: Vírus transmitidos por vetores artrópodes hematófagos.

ARTRALGIA: Dor nas regiões articulares

FOTOFOBIA: Intolerância a luz.

GENOMA: Corresponde a todos os genes de um organismo.

GUANOSINA: Nucleotídeo que possui a guanina como base nitrogenada.

IMUNOGLOBULINA: Também conhecida por anticorpos, diz respeito a estruturas produzidas por plasmócitos que atuam em mecanismos de defesa contra patógenos.

IMUNOPATOLOGIA: Respostas do sistema imunológico frente a enfermidades.

LINFÓCITOS: Células de núcleo arredondado que compõe a imunidade adaptativa.

OPSONIZAR: Diz-se o processo de cobertura de microorganismos por anticorpos ou estruturas do sistema complemento facilitando, assim, a eliminação do mesmo.

PATOLOGIA: Alterações fisiológicas ou anatômicas que podem desencadear alguma doença.

POLIPROTEÍNA: Consiste em mais de uma proteína unidas em uma única estrutura.

VETOR: Organismo capaz de transmitir vírus, bactérias ou parasitas a outro ser vivo.

ANEXOS

10. ANEXOS

Figura 6. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



	HOSPITAL UNIVERSITÁRIO LAURO WANDERLEY/UFPA	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
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;) Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;		
Versão: 1		
CAAE: 59833416.6.0000.5183		
Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPA		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.766.906		
Apresentação do Projeto: Trata-se de um estudo quantitativo, prospectivo, longitudinal, com etapas observacional e experimental, analítico, clínico-laboratorial, em que pacientes infectados com vírus da Zika, Dengue e Chikungunya serão estudados quanto a seus marcadores imunológicos e dados clínicos na fase aguda das doenças e na fase de cura após 12 meses. Várias hipóteses serão testadas, visando estudar mecanismos moleculares e sua correlação com dados clínicos.		
Objetivo da Pesquisa:		
Objetivo Primário: Investigar a fisiopatologia de infecção pelos arbovírus (DENV, ZIKV, CHIKV), correlacionando características clínicas dos pacientes acometidos e mecanismos imunológicos e genéticos associados à infecção.		
Objetivo Secundário: Este projeto foi dividido em cinco grupos de objetivos específicos:		
Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley - 2º andar - Campus I - UFPA. Bairro: Cidade Universitária CEP: 58.059-900 UF: PB Município: JOAO PESSOA Telefone: (83)3216-7964 Fax: (83)3216-7522 E-mail: comitedeetica@hulw.ufpb.br		

Figura 7. 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 e, em seguida, descartados.

Todos os seus dados serão confidenciais e colocados de maneira anônima por devida codificação dos seus dados (ARBXX). 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 Dr^a 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 às 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

