



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

NARA GUALBERTO CAVALCANTI

**MARCADORES MOLECULARES NAS MANIFESTAÇÕES
MUSCULOESQUELÉTICAS CRÔNICAS DA FEBRE CHIKUNGUNYA**

Recife
2020

NARA GUALBERTO CAVALCANTI

**MARCADORES MOLECULARES NAS MANIFESTAÇÕES
MUSCULOESQUELÉTICAS CRÔNICAS DA FEBRE CHIKUNGUNYA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em inovação terapêutica.

Orientadora:
Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Co-orientadora:
Profa. Dra. Claudia Marques

Recife
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Cavalcanti, Nara Gualberto

Marcadores moleculares nas manifestações musculoesqueléticas crônicas da Febre Chikungunya/ Nara Gualberto Cavalcanti– 2020.

129 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadora: Claudia Marques

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Artrite 2. Chikungunya 3. Biomarcadores I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orient.) II. Marques, Claudia (coorient.) III. Título

616.722

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -184

NARA GUALBERTO CAVALCANTI

**MARCADORES MOLECULARES NAS MANIFESTAÇÕES
MUSCULOESQUELÉTICAS CRÔNICAS DA FEBRE CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Aprovada em: 04/05/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (Orientadora)
NUPIT-SG – UFPE

Profa. Dra. Angela Duarte (Examinador Interno)
Serviço de Reumatologia – HC/UFPE

Prof. Dr. Carlos Brito (Examinador Externo)
Serviço de Clínica Médica – HC/UFPE

Dr. Eraldo Fonseca dos Santos Jr
pós-doutorado – UFPE

Profa. Dra Renata Virginia Cavalcanti Santos
Departamento de Nutrição-UFPE

AGRADECIMENTOS

O meu sentimento é de enorme gratidão!

A todos os que são minha vida.

A Daniel, minhas pequenas grandes Iolanda e Ana, minha Lua e meus sobrinhos.

A meus pais, pela vida e aos que se tornaram, por me ensinar sobre ela.

A Claudia, pela mão amiga, pela alegria com que divide seu conhecimento,

A Dra. Angela Duarte, por ensinar sempre a buscar mais e melhor,

A Aline, pela presença feliz nas horas de dúvida,

A Kamila Vilar por toda a ajuda e paciência,

A Maíra, pela confiança, suporte e estímulo.

Estendo a minha gratidão a todos da Reumatologia, pela amizade e companheirismo.

“A dor é inevitável.

O sofrimento é opcional”

Haruki Murakami

(In: Auto-retrato do escritor enquanto corredor de fundo)

RESUMO

A Febre de Chikungunya é uma arbovirose que recentemente causou um surto de proporções continentais, com rápida disseminação por toda a América Latina, atingindo expressiva parcela da população brasileira. A doença evolui com elevada taxa de cronificação dos sintomas, com predomínio de manifestações musculoesqueléticas. O entendimento dos mecanismos fisiopatológicos relacionados à persistência do quadro articular, bem como a investigação de alterações imunológicas e de fatores predisponentes para tal evolução, podem auxiliar no desenvolvimento de tratamentos, estratégias de controle da doença e minimização de dano. Estudos prévios estabelecem o aumento de Interferon dos tipos I e II, o aumento de IL-6, de GM-CSF e MIP-1 α e -1 β , entre outras citocinas, nas fases aguda e crônica da doença, bem como a desregulação das respostas Th1 e Th2 na doença crônica. Há contudo, poucos estudos que avaliem as correlações clínicas das citocinas e que investiguem outras vias ou mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da doença. Objetivamos, com este estudo, avaliar os níveis séricos de citocinas menos estudadas nesta doença e seu potencial enquanto biomarcadores relacionados à cronificação CHIK. Foram selecionados 45 pacientes nas fases subaguda e crônica, com IgG e/ou IgM específicas positivas e 49 controles saudáveis, nos quais foram realizadas as dosagens das citocinas IL-8, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, TGF- β IL-27, e as galectinas-1, -3, -4, -7, e -9. Os níveis de citocinas e galectinas foram comparados com os de controles saudáveis e avaliados em relação às características clínicas dos pacientes nas fases subaguda e crônica. Foram encontrados níveis aumentados nos pacientes de CHIK em relação aos controles de IL-27, TGF- β , IL-17A, IL-29 ($P < 0,0001$) e TGF- β ($p = 0,0032$), além da galectina-9 ($p < 0,0001$). Níveis suprimidos de IL-21 ($p < 0,0001$) e galectina-3 ($p < 0,0001$) também foram verificados. Foi observada correlação dos níveis de IL-27 com duração da doença ($r = 0,441$, $p = 0,0024$) e sua associação com cronicidade ($p = 0,026$) e com o número de articulações dolorosas ($r = 0,298$, $p = 0,0466$) e intensidade da dor pela escala visual analógica ($p < 0,0001$). A IL-17A correlacionou-se com o número de articulações edemaciadas ($r = 0,315$, $p = 0,0352$). Os níveis de galectina-9 correlacionaram-se com a intensidade ($p = 0,024$, $r = 0,459$), e associaram-se ($p = 0,020$) à duração da rigidez matinal. O presente estudo caracterizou o aumento nos níveis séricos de IL-27, IL17A, TGF- β , e da galectina-9 e a supressão de IL-21, e galectina-3 nas fases subaguda e crônica em comparação a indivíduos do grupo controle, demonstrou o aumento de IL-27 na fase crônica em relação à subaguda, e estabeleceu a relação de IL-17A, IL-27 e galectina-9 com características clínicas inflamatórias da fase crônica da doença causada pelo CHIKV.

Palavras Chave: Artrite; Biomarcadores; Chikungunya; Citocinas; Galectinas.

ABSTRACT

Chikungunya fever is an arboviruse that recently caused an outbreak of continental proportions, with rapid spread throughout Latin America, reaching a significant portion of the Brazilian population. The disease progresses with a high rate of symptom chronicity, with a predominance of musculoskeletal manifestations. Comprehension of the pathophysiological mechanisms related to the persistence of the articular condition, as well as the investigation of immunological changes and predisposing factors for such evolution can help in the development of therapeutic and clinical strategies to control the disease and minimize damage. Previous studies depicted the elevation of type I and II Interferons, of IL-6, GM-CSF, MIP-1 α and -1 β , among other cytokines in the acute and chronic phases of the disease. Other demonstrated the deregulation of Th1 and Th2 responses in the chronic CHIK. There are few studies evaluating clinical correlations of cytokines and investigating other inflammatory mediators/ inflammatory pathways involved in the CHIK physiopathologic process. Thus, we aim with this study to evaluate serum levels of cytokines and their potential as biomarkers related to chronic Chikungunya disease. We selected 45 patients affected by Chikungunya in the subacute and chronic phases, with positive specific IgG and / or IgM and 45 healthy controls. The cytokines IL-8, IL-17A, IL-18, IL-21, IL- 22, IL-23, IL-27, TGF- β IL-27, and galectins-1, -3, -4, -7, and -9 were measured. The levels of cytokines and galectins were compared with those of healthy controls and evaluated in relation to the clinical characteristics of patients in the subacute and chronic phases, with increased levels of IL-17A, IL-27, TGF- β , IL-17A, IL-29 ($P<0.0001$), and TGF- β ($p=0.0032$), in addition to galectin-9 ($P<0.0001$), but not in controls, and suppressed levels of IL-21 ($P<0.0001$) and galectin-3 ($P<0.0001$). When assessing the correlations and clinical associations of cytokines and galectins, a correlation was found between IL-27 levels with disease duration ($r=0.441$, $p=0.0024$) and its association with chronicity ($p=0.026$) and the number of painful joints ($r=0.298$, $p=0.0466$) and pain intensity on the visual analog scale ($p<0.0001$). IL-17A correlated with the number of swollen joints ($r=0.315$, $p=0.0352$). Galectin-9 correlated with intensity ($p=0.024$, $r=0.459$) and was associated with the duration of morning stiffness ($p=0.020$).

Our study characterized the high serum levels of IL-27, IL17A, TGF- β , and galectin-9 and suppression of IL-21, and galectin-3 in the subacute and chronic phases in comparison to health individuals. We demonstrated the rise of IL-27 in the chronic phase, comparing to the subacute phase, and the relationship of IL-17A, IL-27 and galectin-9 clinic inflammatory symptoms in the chronic phase of CHIKV disease.

Keywords: Arthritis; Biomarkers; Chikungunya; Cytokines; Galectins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Figura 1 - Primeiros relatos epidêmicos de Chikungunya	19
Figura 2 - Distribuição geográfica dos casos de Chikungunya	21
Figura 3 - Dispersão anual dos casos notificados de Febre Chikungunya 2014 a 2018	23
Figura 4 - Proteínas do envelope e capsídeo viral, estrutura tridimensional do vírus e esquema de codificação do RNA do vírus Chikungunya	25
Figura 5 - Curva de viremia, sintomas e resposta humoral ao longo do tempo na Febre de Chikungunya	27
Figura 6 - Replicação e disseminação viral na infecção Inicial pelo vírus da Chikungunya.	36
Figura 7 - Modelo simplificado da participação de células da imunidade inata e adaptativa e de citocinas nas fases aguda e crônica da CHIK	40
Figura 8 - Frequência de resultados da sorologia IgM de acordo com a fase da doença	67
Figura 9 - Níveis séricos de IL-17-A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29 e TGF- β em pacientes e controles	68
Figura 10 - Níveis séricos de IL-17A, IL-27, IL-29 e TGF- β por subgrupo de duração da doença	69
Figura 11 - Correlação ente nível de IL-27 e tempo de doença em semanas	69
Figura 12 - Correlação entre níveis séricos de IL-27 e IL-17A com sintomas articulares em pacientes com CHIK	70
Figura 13 - Níveis séricos de citocinas por subgrupo de intensidade de dor.	70
Figura 14 - Correlação entre níveis Séricos de citocinas mensuradas por ELISA em pacientes com CHIK	72
Figura 15 - Níveis séricos de Galectinas em pacientes com artropatia por Febre de Chikungunya e controles	73
Figura 16 - Níveis séricos de Galectinas por subgrupo de duração de doença	75

Figura 17 - Níveis séricos de Galectina-9 por tempo de rigidez matinal; correlação entre Galectina-9 e Intensidade da rigidez matinal pela escala visual analógica	76
Figura 18 - Correlações entre níveis Séricos de galectinas em pacientes com CHIK	77
Figura 19 - Correlação entre níveis Séricos de galectinas e citocinas em pacientes com CHIK	78
Figura 20 - Correlações entre níveis Séricos de GAL-1 e GAL-4 e entre GAL-4 e GAL-7 em controles	78
Figura 21 - Correlação entre níveis Séricos de galectinas e citocinas em controles	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Casos notificados e principais regiões acometidas no Brasil pela Febre de Chikungunya, de 2014 a 2018	22
Quadro 2 - Fatores solúveis relacionados a doenças auto-imunes na Chikungunya	42
Quadro 3 - Possíveis biomarcadores para a Febre de Chikungunya	56
Quadro 4 - Citocinas avaliadas no soro através da técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínico-epidemiológicas de pacientes com Febre de Chikungunya e controles	66
Tabela 2 - Níveis séricos de IL-17-A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29 e TGF- β em pacientes e controles	67
Tabela 3 - Níveis séricos de Galectinas -1, -3, -4, -7 e -9 em pacientes com artropatia por CHIK e controles	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR	<i>American college of rheumatology</i>
ANA	<i>Antinuclear Antibodies</i>
Anti-CCP	<i>Anti-citrullinated cyclic peptide</i>
APSO	Artrite psoriásica
AR	Artrite reumatóide
CHIK	Febre Chikungunya
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CxCI	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAMP	<i>Dammage associated molecular pattern</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EA	Espondilite anquilosante
ECSA	<i>East-central-South African</i> - sorotipo do virus chikungunya
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EULAR	<i>European league against rheumatism</i>
EVA	Escala visual analógica
GC	Glicocorticóide
FAN	Fator antinúcleo
FR	Fator reumatóide
HC	Hospital das Clínicas
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IC	Intervalo de confiança
IFA	<i>Indirect immunofluorescent assay</i>
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G

IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IOL	<i>Indian Ocean Lineage</i> – Sorotipo do vírus Chikungunya
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein</i>
IPS-1	<i>IFN- β promoter stimulator-1</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating fator</i>
LINAT	Laboratório de imunomodulação e novas abordagens terapêuticas
MAC-ELISA	Teste imunoenzimático de captura de imunoglobulina da classe M
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MAY	Mayaro
MCF	Metacarpofalangeanas
MCP	<i>Monocyte chemoattractant protein</i>
MIG	<i>Monokine induced by gamma interferon (CXCL-9)</i>
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein-1</i>
MMP	<i>Matrix metaloproteinasis</i>
MP	Metilprednisolona
MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NK	<i>Natural killer</i>
NF-k β	<i>Nuclear factor kappa Beta</i>
nTreg	<i>Natural T regulatory cells</i>
NUPIT-SG	Núcleo de pesquisa em inovação terapêutica Sueley Galdino
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chances)
PAMP	<i>Dammage associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation and Normal T Cells Expressed and Secreted</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	<i>Transforming Growth Fator Beta</i>
Th	<i>T Helper</i> (T auxiliar)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg	<i>T Regulatory cels</i>
TR-1	<i>Type 1 regulatory T cell</i>
TRL	<i>Toll-like receptor</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VAS	<i>Visual Analogue Scale</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VISA	<i>virus-induced signaling adapter</i>
ZYKV	<i>Zyka virus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.2	REVISÃO DE LITERATURA	18
1.2.1	Dados epidemiológicos	18
1.2.2	Aspectos relacionados à transmissão do CHIKV	23
1.2.3	Aspectos relacionados ao vírus	24
1.2.4	Formação de anticorpos e diagnóstico laboratorial	26
1.2.4.1	Detecção viral	26
1.2.4.2	Sorologia	27
1.2.4.3	Teste de neutralização viral	28
1.2.4.4	Reatividade cruzada dos testes imunológicos	28
1.2.5	Quadro Clínico	28
1.2.5.1	Fases aguda e subaguda	28
1.2.5.2	Fase crônica	30
1.2.6	Imunopatogênese	33
1.2.6.1	Imunopatogênese - fases aguda e subaguda	33
1.2.6.1.1	<i>Resposta inata</i>	33
1.2.6.1.2	<i>Evasão das respostas antivirais</i>	34
1.2.6.1.3	<i>Replicação tecidual e resposta inflamatória</i>	35
1.2.6.1.4	<i>Linhagem mononuclear - papel dos monócitos e macrófagos</i>	37
1.2.6.1.5	<i>Células NK</i>	37
1.2.6.1.6	<i>Células T</i>	37
1.2.6.1.7	<i>Citocinas</i>	38
1.2.6.1.8	<i>Tipos de resposta imune relacionada à função T-auxiliar</i>	38
1.2.6.1.9	<i>Interferências nos níveis de citocinas por fatores não relacionados à infecção viral</i>	39
1.2.6.2	Imunopatogênese - Fase Crônica	40
1.2.6.2.1	<i>Hipóteses relacionadas à cronificação</i>	40
1.2.6.2.2	<i>Principais células envolvidas no processo de cronificação da CHIK - Células da linhagem monocítica/macrofágica</i>	42
1.2.6.2.3	<i>Células NK</i>	43
1.2.6.2.4	<i>Linfócitos T</i>	43
1.2.6.2.5	<i>Linfócitos B</i>	44
1.2.6.2.6	<i>Osteoclastogênese</i>	44
1.2.6.2.7	<i>Citocinas na fase crônica</i>	44
1.2.6.3	Galectinas	45
1.2.6.3.1	<i>Galectina-1</i>	46
1.2.6.3.2	<i>Galectina-3</i>	46
1.2.6.3.3	<i>Galectina-4</i>	47
1.2.6.3.4	<i>Galectina-7</i>	47
1.2.6.3.5	<i>Galectina-9</i>	47
1.2.6.3.6	<i>Galectinas e CHIK</i>	47
1.2.6.4	Biomarcadores	48
2	OBJETIVOS	58
2.1	OBJETIVO GERAL	58
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
3	METODOLOGIA	59
3.1	TIPO E LOCAL DE ESTUDO, TAMANHO DA AMOSTRA E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM	59

3.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	59
3.2.1	Critérios de inclusão – grupo CHIK	59
3.2.2	Critérios de inclusão – grupo controle	59
3.2.3	Critérios de exclusão – grupo CHIK e grupo controle	60
3.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA INICIAL E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DO PACIENTE	60
3.4	VARIÁVEIS DO ESTUDO	60
3.4.1	Variáveis dependentes e definição operacional	60
3.4.2	Variáveis independentes e definição operacional	60
3.5	AVALIAÇÃO LABORATORIAL	62
3.5.1	Técnicas	62
3.5.1.1	ELISA	62
3.6	ESTATÍSTICA E ANÁLISE DOS RESULTADOS	63
3.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	64
	RESULTADOS	65
3.8	PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DOS PACIENTES COM FEBRE DE CHIKUNGUNYA	65
3.9	IMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS	66
3.10	ANÁLISE CITOCINAS	67
3.10.1	Níveis séricos de citocinas em pacientes Chikungunya e controles	67
3.10.2	Duração da doença e níveis de citocinas	69
3.10.3	Manifestações clínicas e níveis de citocinas	69
3.10.4	Correlação entre citocinas	71
3.11	ANÁLISE GALECTINAS	73
3.11.1	Associações entre galectinas e tempo de doença e correlações com manifestações clínicas	74
3.11.2	Correlação entre Galectinas	76
4	DISCUSSÃO	79
5	CONCLUSÕES	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICES	100
	ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

A Febre de Chikungunya (CHIK) é uma arbovirose (do inglês: *arthropode borne viruses*) causada pelo vírus da Chikungunya (CHIKV), transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*). O CHIKV atingiu as Américas em 2013 ([1](#), [2](#)) e, nos últimos cinco anos, foram notificados mais de 500.000 casos somente no Brasil ([3](#), [4](#)), número provavelmente subestimado, em decorrência de subnotificação de grande parte dos casos. Acometendo no início do surto principalmente os estados do Nordeste, atualmente distribui-se por todo o território Nacional ([5](#)).

Após o quadro agudo, a doença pode cronicar em 30 a 50% dos casos, com persistência de sintomas musculoesqueléticos como artrite, artralgia crônica e lombalgia inflamatória ([6](#)). Entre os indivíduos cronicamente afetados pela doença, 5 a 10% desenvolvem doença articular com quadro semelhante à artrite reumatoide (AR); entesopatias recorrentes e/ou sacroilíte, como ocorre nas espondiloartrites, e até, mais raramente, quadros sistêmicos como vasculites, acometimento do sistema nervoso, acometimento vascular com linfangite crônica ([7](#)). Uma das principais teorias atualmente aceitas é de que, a partir de mecanismos imunológicos, o quadro viral poderia desencadear doenças reumatológicas em indivíduos susceptíveis e não apenas mimetizá-las ([8](#)).

Diante do grande número de casos registrados em todo o País, a evolução para cronicidade tornou-se um sério problema de saúde pública, e nos encontramos diante de uma verdadeira epidemia de artropatia crônica inflamatória pós CHIK. Marcadores laboratoriais que possam prever o desenvolvimento de artropatias crônicas incapacitantes, que possibilitem diagnosticar precocemente indivíduos sob risco e que auxiliem no seguimento acrescentando dados objetivos, são importantes para a tomada de decisões terapêuticas precoces, e de medidas clínicas que minimizem possíveis incapacidade e dano articular. O presente trabalho tem o objetivo de determinar marcadores laboratoriais que auxiliem a detecção dos indivíduos com maior risco de desenvolver quadros articulares mais acentuados e incapacitantes, à semelhança da AR e das espondiloartrites, tendo como gatilho a CHIK e quiçá possam ser utilizados para o desenvolvimento futuro de novas terapias.

Para tanto, realizamos a investigação do perfil de citocinas e galectinas, correlacionando com tempo de evolução, indicadores clínicos de gravidade de doença e presença dos anticorpos IgG e IgM.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Dados epidemiológicos

A Febre Chikungunya (CHIK) é uma alfavirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* atualmente de distribuição global, com elevada taxa de ataque, ocorrendo em surtos epidêmicos explosivos, geralmente após períodos chuvosos. Existem documentações de surtos epidêmicos da doença, de menores proporções, desde a década de 50, inicialmente restritos a regiões da África e Ásia. Nos últimos 15 anos o vírus da Chikungunya (CHIKV) vem causando surtos epidêmicos de grandes proporções, reincidentes, com intervalo de recorrência variando de 7 a 20 anos, com acometimento de mais de três milhões de indivíduos em vários continentes (2, 9).

Existe uma teoria de que surtos de CHIK poderiam ter ocorrido desde 1779, tendo erroneamente sido documentados como epidemias de Dengue. Carey, 1971 (10) descreve relatos de surtos de doenças febris do fim do século XVIII ao início do século XX, com evolução para dor articular severa e prolongada em pequenas articulações das mãos e pés, durando semanas a meses.

Na literatura, a primeira descrição comprovadamente de uma epidemia de CHIK ocorreu em 1952-53, na Tanzânia, África (Figura 1) (11, 12). A doença ganhou seu nome nesta região, a partir de derivações da palavra *chingwingwinda*, que no dialeto Makonde significa “aquilo que se dobra”, em referência à posição curvada causada pela intensa dor articular e periarticular no quadro agudo. Neste surto foi feito o primeiro isolamento viral na amostra de soro de um paciente e realizada a cultura do vírus (13). O CHIKV foi isolado do vetor (*Aedes africanus*) pela primeira vez em 1958 (14). O padrão recorrente e prolongado da dor articular é descrito desde os primeiros relatos de surtos epidêmicos, como os descritos por Robinson e Lumsden em 1955 na Tanzânia (12) (11) (Figura 1) e Gear & Reid, 1957, na África do Sul (15).

Figura 1: Primeiros relatos epidêmicos de Chikungunya.

TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF
TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE.
Vol. 49. No. 1. January, 1955.

COMMUNICATIONS

AN EPIDEMIC OF VIRUS DISEASE IN SOUTHERN PROVINCE, TANGANYIKA
TERRITORY, IN 1952-53

I. Clinical Features

BY

MARION C. ROBINSON*

(From Lulindi Hospital, Universities Mission to Central Africa)

TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF
TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE.
Vol. 49. No. 1. January, 1955.

AN EPIDEMIC OF VIRUS DISEASE IN SOUTHERN PROVINCE, TANGANYIKA
TERRITORY, IN 1952-53

II. General Description and Epidemiology

BY

W. H. R. LUMSDEN *

(From the Virus Research Institute, Entebbe, Uganda)

Imagem retirada de cópia PDF do artigo.

Neste primeiro surto relatado já há descrições da elevada taxa de ataque da doença:

“Trabalhadores vindos da África Leste portuguesa para Newala relataram, antes do fim de fevereiro, que uma doença similar à dengue manifestou-se de forma intensa no platô de Mawia (N.J. SINCLAIR, personal communication). Dr. Fritz BAUER... me informa que a doença começou nas áreas costeiras em março de 1953, aumentou em abril e terminou, seguindo uma campanha inseticida, em maio. As cidades de Quionga, Palma e Mocímboa da Praia foram especialmente afetadas; mais de 60% da população foi acometida. Não houve casos ao sul de Mocímboa da Praia. O surto descrito por Dr. BAUER nas áreas costeiras ocorreu após a epidemia principal no Platô de Makonde Plateau e muito provavelmente também após o surto do Platô de Mawia. Se a doença foi a mesma, houve clara distinção entre as epidemias de Tanganyika e do Leste da África Portuguesa e os últimos territórios dos distritos costeiras — onde alguns casos similares à dengue foram descritos — que nunca se tornaram seriamente envolvidos.” Relato do Dr. Fritz Bauer, extraído de Gudo et al., 2016 ([16](#)).

Nos anos subsequentes, vários outros surtos ocorreram em territórios da África Subsaariana, como República Central Africana, Congo, Angola, Nigéria e diversos outros países africanos, com expansão para o sul do continente, em surtos recorrentes até 2004, quando houve uma epidemia de maiores dimensões, que se expandiu para ilhas do oceano Índico e, posteriormente para as ilhas do Pacífico/Índia/Sudeste Asiático(2).

Na Ásia, os primeiros relatos de surtos epidêmicos de CHIK datam de 1958, na Tailândia (Bangkok), com disseminação inicialmente para Filipinas, Vietnã e Indonésia e posteriormente em surtos por todo o Sudeste Asiático. No subcontinente indiano também ocorrem surtos recorrentes desde 1963, acometendo milhões de indivíduos, com soroprevalência estimada em cerca de 10-12,5% (17).

Mais recentemente, vem ocorrendo uma expansão dos territórios acometidos pelo CHIKV, com números alarmantes de indivíduos afetados pela doença. (18). Segundo Higuera (19), a emergência de novas linhagens tem relação com a distribuição e dispersão geográfica, e o conhecimento desta dinâmica possibilita a predição do comportamento do vírus em relação a possíveis novas epidemias.

Atualmente são descritas quatro linhagens filogenéticas do vírus, distribuídas da seguinte forma (Figura 2):

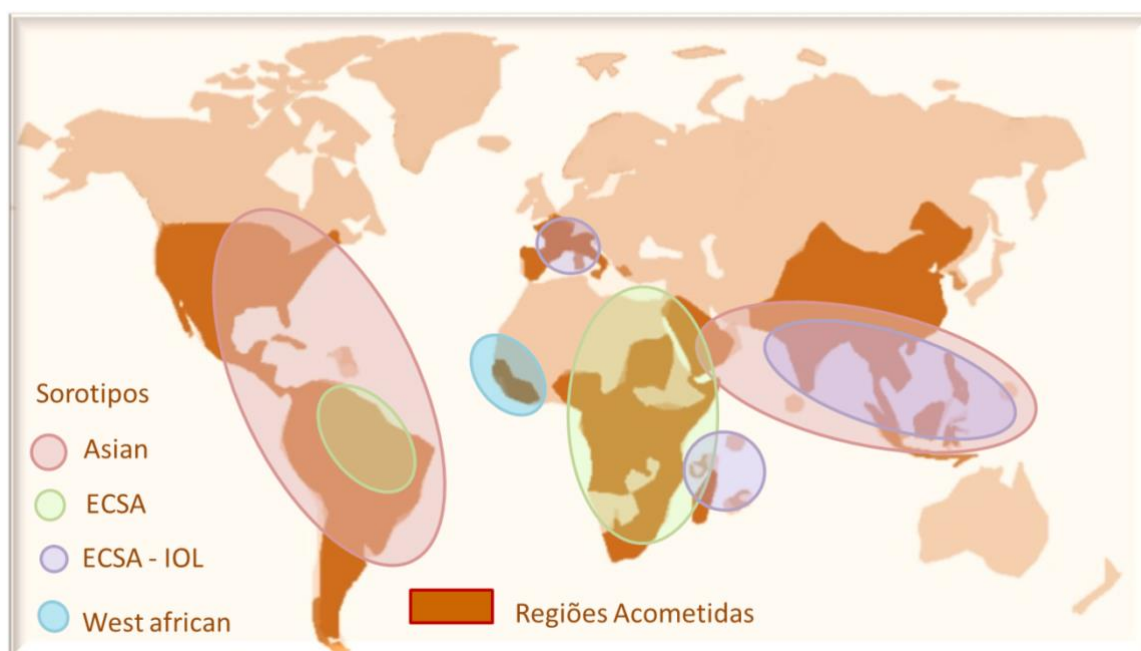
- Genótipo *West African* – isolado inicialmente do Oeste Africano (Senegal e Nigéria);
- Genótipo ECSA - *East/Central/South African* – originário da África;
- Genótipo *Asian* – responsável pelos primeiros surtos da Ásia na década de 1960.
- Genótipo IOL - *Indian Ocean Lineage* – um subgrupo da linhagem ECSA, *proveniente do Sudoeste asiático*, descrito em 2005-2006 nas ilhas do Oceano Índico, com aumento da incidência de casos graves e maior número de óbitos (20).

Em 2004-2005, concomitante à epidemia africana que deu origem à epidemia do Oceano Índico, houve expansão da linhagem ECSA para a Ásia (Índia, Indonésia, Malásia, Sri Lanka), atingindo cerca de 1,3 milhões de pessoas, com casos relatados ainda na Itália e França (2). Mais recentemente houve expansão da linhagem Asiática na Ásia, sendo atualmente a cepa predominante (17, 21).

Na América Latina, a epidemia iniciou-se em 2013 na ilha de Saint Martin, no Caribe (22) e alastrou-se rapidamente, disseminando-se por toda a América Central e a seguir, por diversos países da América do Sul (1, 23). Yactayo, 2016, (1) relata que até 2016 já havia mais de 2.900.000 casos de CHIK e quase 300 óbitos atribuídos à doença, que se espalhava por 45 países/territórios nas Américas, chegando a 3.000.000 de casos em 2017 (1, 2). O genótipo encontrado foi o asiático, com alto grau de similaridade genética com as cepas que atingiram o sudeste asiático (24).

Figura 2: Distribuição geográfica dos casos de Chikungunya no mundo.

Imagem da autora, adaptado de Burt *et al.* (25).



No Brasil, em setembro de 2014, um surto epidêmico de CHIKV teve início no Amapá, provavelmente proveniente da região do Caribe, visto ter sido causado pela mesma linhagem do genótipo Asiático, que acometeu o restante da América Latina. No mesmo mês, outro surto iniciou-se a partir de Feira de Santana/ BA, causado pelo genótipo ECSA (5, 26). Fatores como a reconhecida presença de *Aedes aegypti* em todo território nacional, a presença de hospedeiros susceptíveis, associados à elevada densidade populacional em aglomerados urbanos com baixo nível de saneamento básico e distribuição de água irregular, contribuíram para que o CHIKV se alastrasse rapidamente por vários estados do Nordeste e posteriormente tomasse grande parte do País (21). Estes mesmos fatores colocam o país em situação propícia para uma endemia, com surtos recorrentes desta doença, como ocorre na Ásia e África (5).

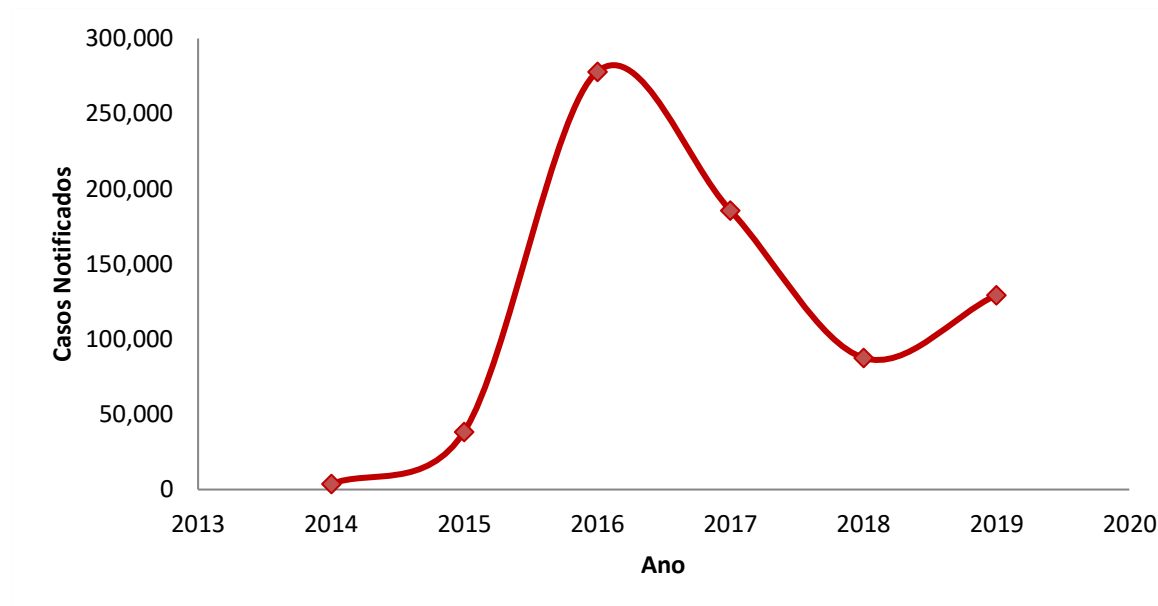
Ainda no ano de 2014 foram notificados mais de 3500 casos de CHIK. A epidemia gerou até o fim de 2018, mais de 500.000 notificações em todo o país (Quadro 1) ([3](#), [4](#)). Contudo, diante da reconhecida subnotificação, esses valores representam apenas uma parcela do número de casos que acometeu nossa população.

Atualmente a epidemia encontra-se em fase de defervescência no Norte e Nordeste, com queda no número de infectados nestas regiões, enquanto no Sudeste e Centro-Oeste houve um aumento no número total de casos notificados em 2018, em relação a 2017. Em relação ao pico da epidemia, o número total de casos vem caindo no País (Figura 3), novos surtos epidêmicos são esperados diante do comportamento usual das epidemias anteriores, visto que ainda há circulação do vírus e uma parte da população ainda é susceptível ([3](#), [4](#), [27-31](#)).

Quadro 1: Casos notificados e principais regiões acometidas no Brasil pela Febre de Chikungunya, de 2014 a 2019. Fonte: Dados da **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde**

Ano	Casos notificados	Casos confirmados	Óbitos	Número de municípios acometidos
2014	3.657 entre semana 37 e 53	140	s/ dados	8 (Bahia, Amapá, Roraima, Mato Grosso do Sul e Distrito Federal)
2015	38.499 incidência de 18,8 casos/100 mil hab	17.971 (46,7%)	14	704 Predomínio Nordeste
2016	277.882 incidência de 34,8 casos/100 mil hab	151.318 (55,7 %)	216	2.829 Predomínio Nordeste
2017	185.737 incidência de 90,1 casos/100 mil hab	151.966 (81,8%)	192	Predomínio Nordeste (Ceará 1.271,0 casos/100 mil habitantes)
2018	87.687 Incidência 42,1 casos/100 mil hab	68.962 (78,6 %)	39	Predomínio Sudeste
2019	129.349 Incidência 61,6casos/100 mil hab	Sem dados	90	Predomínio Sudeste e Nordeste (Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte)
Total	722.811	390.231	551	

Figura 3: Dispersão anual dos casos notificados de Febre Chikungunya 2014 a 2018. Fonte: Dados provenientes da **Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde** ([3](#), [4](#), [29-32](#))



Acredita-se que mutações virais venham aumentando a patogenicidade do vírus, pois desde a epidemia das ilhas do Pacífico o registro de casos graves e atípicos se tornou mais frequente, bem como as complicações neurológicas associadas ao quadro agudo ([33-36](#)). No Brasil e América do Sul houve registro de aumento de mortalidade associada à epidemia de CHIK ([1](#), [37-41](#), [42](#)).

1.2.2 Aspectos relacionados à transmissão do CHIKV

A Febre de Chikungunya é uma arbovirose, denominação que implica sua transmissão por artrópodes hematófagos. Os principais vetores de transmissão são mosquitos do gênero *Aedes*, especialmente as espécies *aegypti* e, a partir da epidemia da região do pacífico de 2004-2009, amostras virais foram também encontradas na espécie *albopictus* ([43](#)), após mutação viral. Ambas as espécies vem ampliando sua zona de distribuição, com sua presença reconhecida em todos os continentes, à exceção da Antártida ([44](#)), o que, associado à globalização, vem aumentando o risco de grandes epidemias multicontinentais, como a que recentemente atingiu as Américas.

Os surtos epidêmicos do CHIKV usualmente têm elevada taxa de ataque, com surgimento súbito, grande número de indivíduos afetados, e desaparecimento gradual. A velocidade de expansão do surto depende de diversos fatores, como disponibilidade e condições ambientais para propagação do vetor, susceptibilidade da população, adaptação do vírus ao vetor ([45](#)).

Acredita-se que o vírus inicialmente era restrito a espécies símias. Em algum momento, ocorreram mutações virais e alterações ambientais, que permitiram a formação de ciclos de epidemias urbanas, como o aumento das aglomerações humanas, aumento da temperatura global, variações no índice pluviométrico, e alterações na distribuição da vegetação, que culminaram com a crescente formação de locais propícios para a reprodução do vetor.

A distribuição do vírus, a princípio, ocorreu a partir de ciclos enzoóticos (ciclos silvestres que perpetuam o vírus), onde os principais hospedeiros-reservatórios são primatas não humanos. Com a saída do vírus do meio silvestre para regiões urbanas, gera-se um ciclo epizoótico com disseminação progressiva para outros centros urbanos, sustentando-se a transmissão entre humanos ([46-48](#)). Em epidemias onde o caso índice foi importado de outras regiões, ou seja, onde não há ciclo enzoótico, a distribuição é inicialmente urbana, podendo ocorrer a perpetuação do vírus através da formação de novos ciclos silvestres ([21](#)).

Excepcionalmente outras formas de transmissão independente do vetor são relatadas, como transmissão materno fetal, infecção nosocomial, infecção via transfusão sanguínea e transplantes ([49-51](#)).

No Brasil, encontramos o *Aedes aegypti* em áreas urbanas ao longo de todo o País, enquanto o *Aedes albopictus* foi encontrado em todos os estados, exceto Acre, Amapá, Roraima e Sergipe. A disseminação do vetor, em conjunto com fatores ambientais e com a prévia susceptibilidade da população (pela ausência de surtos anteriores que gerasse imunização populacional), favoreceram a dispersão da doença ([5](#), [21](#)).

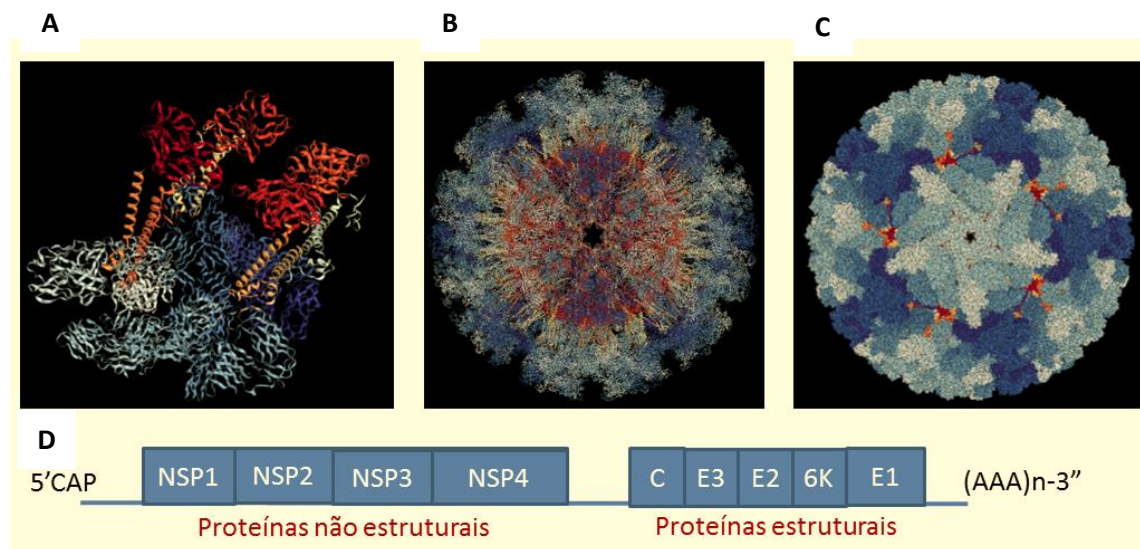
1.2.3 Aspectos relacionados ao vírus

O CHIKV pertence ao gênero *Alphavirus*, família *togaviridae*, ([18](#), [52](#)), é incluído no complexo antigênico *Semliki forest* que inclui ainda os vírus Semliki forest, O'nyong-nyong, Ross River, Getah, Bebaru, e Mayaro.

É um vírus de fita linear única de RNA, com um nucleocapsídeo de formato esférico (mais precisamente eicosaédrico) com cerca de 40–70nm de diâmetro (Figura 4). Seu genoma é da ordem de 11-12kb e codifica cinco proteínas estruturais (E1, E2, E3, 6K e C) e 4 proteínas não estruturais - nsP1, nsP2, nsP3, e nsP4 ([53-55](#)). As proteínas do envelope E1 e E2 estão envolvidas na invasão da célula hospedeira e replicação viral, enquanto a proteína não estrutural 4 é uma RNA polimerase RNA

dependente (RdRp ou RNA replicase – enzima que catalisa a replicação de RNA à partir de uma fita de RNA) (56). O gene que codifica a proteína E1 também é muitas vezes utilizado, em alternativa ao RNA total, na análise da diversidade genética do CHIKV (19). A estrutura conformacional das proteínas estruturais e sua ordem de codificação no RNA viral est demonstrada na Figura 4.

Figura 4: Proteínas do envelope e capsídeo viral, estrutura tridimensional do vírus e esquema de codificação do RNA do vírus Chikungunya



(A) Esquema estrutural dos heterodímeros de da glicoproteínas do envelope e capsídeo viral; (B) e (C). Imagem de reconstrução computacional de partículas virais do CHIKV; (D) genoma do RNA do CHIKV, indicando loci das proteínas não estruturais (NSP) e proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K, E1),

Plotado pela autora a partir do banco de dados PDB (<http://www.rcsb.org/3d-view/3j2w>).

O genoma RNA, por sua maior capacidade de mutação que o DNA, confere ao vírus maior plasticidade genética, favorecendo a adaptação a número maior de hospedeiros/vetores (57). Essa variabilidade genética tem relação com a incapacidade da RNA replicase de corrigir erros gerados durante sua atividade e, em menor escala, com o aumento da frequência de deleções e “inserts” de material genético(22). As alterações no genoma viral podem levar a aumento na infectividade viral, na velocidade de replicação e até ampliar o número de vetores disponíveis. Exemplos destas ocorrências são a substituição no *loci* A226V – que ampliou as espécies de vetores disponíveis, passando o vírus a ser transmitido também pelo

Aedes albopictus ([58](#)), e as mutações adaptativas nos genes da proteína do envelope E1 e E2 que geraram o genótipo IOL ([20](#)).

1.2.4 Formação de anticorpos e diagnóstico laboratorial

1.2.4.1 Detecção viral

Na fase aguda, tanto a cultura de vírus em células (realizada usualmente em células *Vero* e *Hela*), quanto a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) podem detectar o RNA viral no sangue periférico dos indivíduos infectados pelo CHIKV. A cultura é um método atualmente em desuso para fins diagnósticos, pois sua sensibilidade é mais baixa que os métodos moleculares, com o inconveniente do risco biológico elevado e do tempo prolongado necessário para sua realização (1 a 2 semanas) ([59](#)), ([60](#)), ([61](#)).

Em relação à qPCR, apesar de apresentar elevadas sensibilidade e especificidade (podendo chegar praticamente a 100% dependendo do método), ainda é um método caro, sem ampla disponibilidade na maioria dos locais afetados pela epidemia. Sua realização é possível apenas durante a fase de viremia, que em geral duram de 4 a 6 dias após o início dos sintomas, podendo perdurar até o 14º dia de doença, alcançando até 10^8 - 10^9 cópias/ml ([59](#), [60](#), [62-65](#)).

A utilização da confirmação virológica por qPCR é necessária em casos de emergência de novo surto em população previamente não acometida, estudo de novos focos e disseminação de cepas, casos fora de surtos epidêmicos, casos graves e atípicos, bem como para confirmação em situações de risco de gravidade como neonatos e gestantes ([66](#)).

1.2.4.2 Sorologia

A sorologia para CHIKV tem elevadas sensibilidade (82 – 88%) e especificidade (82 – 97 %) ([67](#), [68](#)) e geralmente torna-se positiva precocemente (Figura 5). A IgM torna-se positiva ao redor do 4º ao 6º dia após o início dos sintomas, atingindo 84% de positividade no período de convalescença (> 2 semanas após o início do quadro) ([69](#), [70](#)). Pouco depois, em torno do 6º ao 10º dia do início dos sintomas, a IgG se torna positiva, concomitante à secundária queda na carga viral.

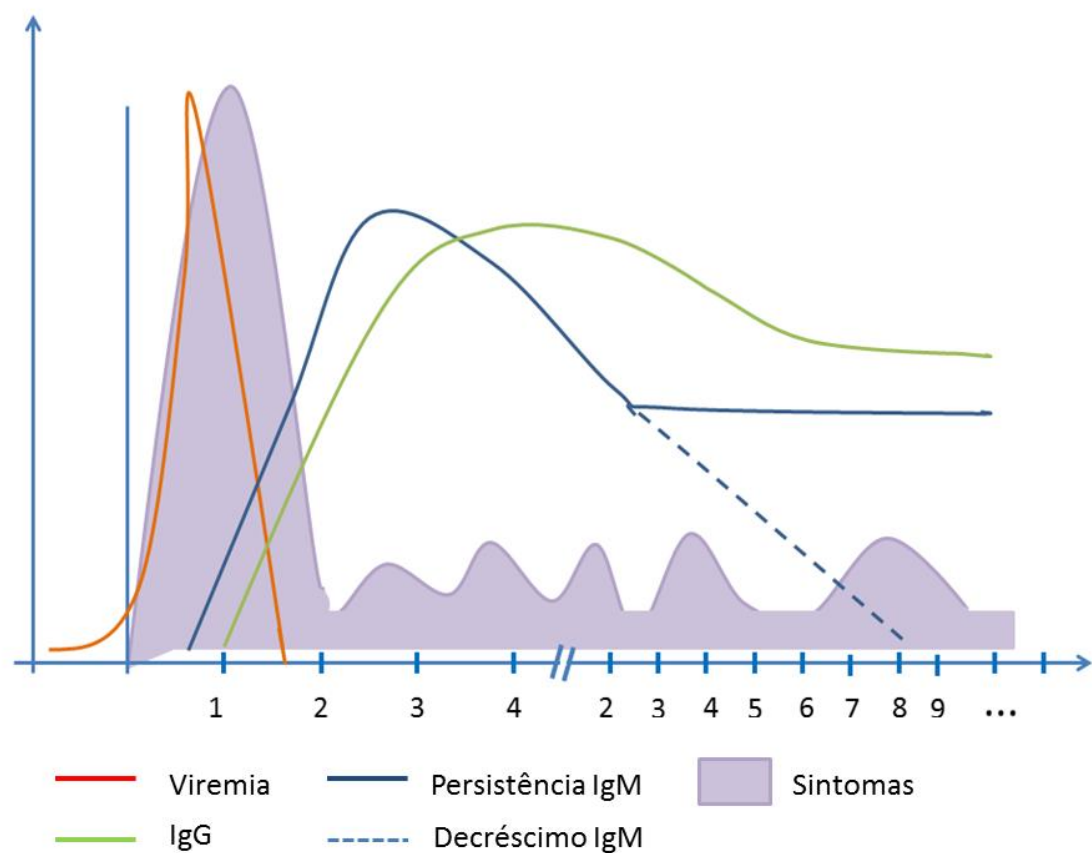
Os títulos de IgM geralmente caem com a resolução dos sintomas, mas podem persistir por meses e até anos nos pacientes que se mantêm sintomáticos. Alguns estudos demonstram correlação da persistência de positividade e título de IgM com a

persistência dos sintomas (8, 63, 71-73). Recomenda-se a utilização da IgM como triagem epidemiológica, especialmente nas 12 primeiras semanas de doença (74).

Os títulos de IgG persistem elevados por anos e conferem proteção contra novas infecções pelo CHIKV. Um aumento de pelo menos quatro vezes o título basal é confirmatório de infecção recente (42).

O principal teste de *rastreio* para detecção de anticorpos específicos é o *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Os tipos mais frequentemente utilizados são o ELISA de captura IgM-MAC ELISA que detecta apenas IgM, ou o i-ELISA que pode detectar IgM ou IgG. Como teste confirmatório, pode-se utilizar o teste de imunofluorescência indireta (IFA) que detecta a presença de anticorpos específicos IgG ou IgM, utilizando a presença de antígenos virais em células infectadas, porém a técnica é bem mais laboriosa que o ELISA e há pouco ganho de sensibilidade e especificidade (67).

Figura 5: Curva de viremia, sintomas e resposta humoral ao longo do tempo na Febre de Chikungunya. Imagem da autora.



1.2.4.3 Teste de neutralização viral

O teste sérico de neutralização do vírus é mais específico que o ELISA e o IFA. É utilizado para determinar o título sérico de anticorpos neutralizantes contra CHIKV, utilizando-se, para tal, da capacidade que o soro contendo anticorpos específicos tem de impedir a infecção de células, em meio de cultura apropriado (75). Apesar das altas sensibilidade e especificidade, o teste é extremamente laborioso e necessita de laboratório de nível de segurança 3, pois há manipulação de vírus vivos (76).

1.2.4.4 Reatividade cruzada dos testes imunológicos

Existe reatividade cruzada relatada com outros *alphavirus* como os vírus Ross River (77), O'nyong-nyong e Mayaro (78) (59, 68). Em nosso caso, contudo esse aspecto é menos significativo, pois esses não são vírus endêmicos no Brasil, excetuando-se pelo vírus Mayaro, que é endêmico na região Norte do País e teve surtos epidêmicos relatados na região Centro Oeste do país. Em nossa região, apesar da descrição de casos importados esporádicos, não há relatos de casos autóctones vigentes no período da coleta (79).

Avaliando a reatividade cruzada com outras viroses, *Anfasa et al.*(2017) (77) analisaram amostras de soros de pacientes na epidemia de CHIK em Curaçao e os compararam com soros de outras viroses provenientes de banco de soros. Encontraram reatividade cruzada para o teste de ELISA IgM com Ross River, Epstein Barr e citomegalovírus agudos. Não encontraram reatividade cruzada com Dengue (77). Ainda sobre a suspeita de que os vírus da Zyka e Dengue pudessem gerar testes falso positivos para Febre de Chikungunya, em 2017, *Magalhães et al.*(2017) (80) analisaram a positividade para PCR e sorologia para CHIKV, DENV e ZYKV em amostras de soro de pacientes febris no período da epidemia de Chikungunya, tanto no período agudo da doença, quanto na fase de convalescença (10-30 dias após o quadro febril agudo). Como esperado, encontraram co-reatividade entre DENV e ZYKV, porém não entre CHIKV e os dois primeiros (80).

1.2.5 Quadro clínico

1.2.5.1 Fase aguda e subaguda

Após inoculação, o CHIKV replica-se durante um período de incubação que pode variar de 1 a 12 dias, porém mais usualmente durando entre 4 a 7 dias. O período de viremia tem duração de 5 a 10 dias, raramente perdurando até 14 dias (52-55). Ao

contrário de outras arboviroses, a CHIK é sintomática em mais de 70% dos casos (72-96%) (81). No quadro febril agudo (período de viremia) ocorrem febre alta (>38,5-39°C) geralmente de início abrupto, erupção cutânea, dor lombar, dorsal e/ou cervical, mialgia, cefaleia, conjuntivite, edema de membros superiores e inferiores, linfadenopatias, linfangite, linfopenia e leucopenia, além de fadiga intensa e anorexia (82). Mais raramente pode ocorrer diarreia e vômitos. Entre estes, os principais sintomas associados a evolução para cronicidade foram febre alta, calafrios, intenso mal-estar, poliartralgia grave, mialgia generalizada e erupção cutânea (95).

A presença frequente (quase 100% dos pacientes) de artralgia e especialmente artrite intensas e muitas vezes incapacitantes auxilia no diagnóstico diferencial com outras arboviroses prevalentes em nosso País como Dengue e Zika (83). A artrite inicialmente corresponde a um quadro poliarticular, de grandes e pequenas articulações, aditivo e simétrico e pode ser acompanhada agudamente por tenossinovite e bursites (74).

Em uma meta-análise focada na prevalência de comorbidades entre os casos de CHIK, e de seu impacto na gravidade do quadro, *Badawi et al.* (2018) avaliaram dados provenientes de 11 manuscritos realizados entre 2007-2017, com um total de 2773 pacientes. Foi encontrada uma maior proporção de casos de Diabetes entre os casos graves, com uma razão de chances de 1.2 (95%CI: 1.05-1.48; $p = 0.0135$) para o desenvolvimento de infecção grave, quando comparado a indivíduos sem diabetes, tal correlação não foi encontrada para hipertensão ou doenças cardiovasculares. Infecção grave foi definida como necessidade de internamento em unidades de cuidados intensivos, manifestações atípicas agudas - encefalite aguda, lesões vesicobolhosas, convulsões febris, meningoencefalite, envolvimento articular com destruição, hospitalização e morte. Na análise da sintomatologia, os sintomas mais prevalentes foram febre (90.7%; 95% CI: 86.6-93.6%), artralgia (85.2%; 95% CI: 70.2-93.4%), cefaleia, mialgia, edema articular, dermatite e fadiga em 30-50% dos casos (84).

Em crianças, o quadro clínico é geralmente mais leve e autolimitado, a evolução para formas crônicas é mais rara, possivelmente em decorrência a uma menor intensidade na resposta imune desencadeada pelo vírus (85, 86). Contudo, especialmente em crianças pequenas pode ocorrer um quadro agudo mais grave, com maior incidência de apresentações com envolvimento neurológico, lesões cutâneas bolhosas e outras manifestações atípicas (87). Essa susceptibilidade possivelmente

também está relacionada a uma menor intensidade da resposta imune. Foi relatado um aumento da incidência de morte fetal associada à infecção no final da gestação, na semana que antecede o parto ([49](#)).

Na fase subaguda (a partir da 3ª semana a 12ª semana) pode ocorrer persistência dos sintomas articulares inflamatórios, ressaltando-se artralgia, tenossinovite, tendinites, artrite/sinovite, bursites e rigidez matinal ([82](#)), à semelhança do quadro crônico, porém geralmente de maior intensidade.

1.2.5.2 Fase crônica

As taxas de cronificação de sintomas articulares (acima de 3 meses) variam na literatura entre 14% e quase 90% ([88](#)). Rodriguez-Morales *et al.* ([89](#)) realizaram uma meta-análise de 18 coortes (9 prospectivas e 9 retrospectivas) realizadas entre 2007 e 2015, com um total de 5702 pacientes. Encontraram uma prevalência de cronificação de 40.22% (31.11–49.34%) para análise global, e de 25.33% (16.46%-34.21) quando excluídas as coortes retrospectivas, minimizando, desta forma, os vieses. Outro dado importante encontrado nesta meta-análise é de que a prevalência estimada não foi significativamente menor em estudos de maior duração. Em relação aos fatores clínicos predisponentes para cronificação dos sintomas musculoesqueléticos, foi encontrado maior risco entre mulheres, não houve associação com idade e foi observado maior risco de desenvolvimento de reumatopatia crônica pós CHIKV entre os pacientes com maior duração da fase aguda, maiores níveis de imunoglobulina G específica, artralgia de mãos e punhos, mialgia e linfopenia na fase aguda ([89](#)).

Em um estudo no Brasil, em Feira de Santana/BA em 831 indivíduos, foi encontrada uma soroprevalência de 51%, dentre estes, 36,79% eram sintomáticos. Um total de 72,8% dos casos sintomáticos se auto referiu como portador da forma crônica da doença ([90](#)). Em um estudo realizado em uma comunidade rural de Sergipe, com 120 pacientes, Cunha *et al* (2017) encontraram uma soroprevalência de 20%, 18 meses após o início de um surto epidêmico local. A positividade para anticorpos específicos anti CHIKV foi 18,3% para IgG e 5.0% para IgM, sendo 3,33% também positivos para ambos IgG e IgM. Entre os 24 pacientes serologicamente confirmados, 54.2% relataram sintomas ($p<0.01$) ([91](#)).

Uma recente meta-análise englobando 34 estudos realizados entre 1979-2017, em 15 países/ territórios, avaliou um total de 6532 pacientes com quadro crônico. A

duração dos estudos foi bastante heterogênea: 39% duraram 3-6 meses (95% IC, 37–41%); 18% se prolongaram por 6–12 meses: (95% IC, 16–20%); enquanto apenas 21% tiveram a duração entre 12–24 meses: (95% CI, 19–22%) ([92](#)). Foi encontrado um percentual de pacientes sem recuperação e evolução para doença crônica de 43%, (95% IC, 35–52%, I²=98.38%, $p<0.001$), incluídos sintomas neuropsiquiátricos. Os principais sintomas encontrados foram dor (artralgia/ mialgia), fadiga, rigidez matinal, depressão, distúrbios de humor e de sono. A prevalência de sintomas ‘dor/ artralgia persistentes’ foi de 42% (95% IC, 33–51%, I²=96.68%, $p<0.001$).

Nesta meta-análise, Paixão et al. (2018) encontraram que indivíduos de países de alta renda per capita tinham uma maior prevalência de doença crônica, quando comparados a países de baixa renda per capita - 53% (95% IC, 39–67%) x 35% (95% IC, 26–44%), porém com sobreposição do intervalo de confiança. Outros fatores de risco para o desenvolvimento de cronicidade não foram avaliados. A forma crônica da doença foi causadora de alto impacto na qualidade de vida na maioria dos estudos avaliados na meta-análise. Realizando-se uma análise por genotipo, a maior prevalência de doença crônica foi observada entre pacientes infectados com o subgrupo IOL - 50% (95% IC, 40–60%, I²=98.45%, $p<0.001$), seguido pelo subgrupo asiático - 36% (95% IC, 20–52%, I²=96.70%, $p<0.001$). A menor prevalência ocorreu entre pacientes infectados pelo genotipo ECSA – 13% (95% IC, 7–18%, I² não-calculável) ([92](#)).

Os dados referentes à sintomatologia foram similares aos encontrados em uma revisão sistemática recente compilada por van Aalst et al. (2017) ([93](#)) que englobou 37 estudos realizados entre 2000 e 2016, sendo 18 retrospectivos e 17 prospectivos e 2 com componente retrospectivo e prospectivo, com períodos de seguimento de 1,5 a 72 meses. Artrite/artralgia foram descritos como sintomas predominantes (5 a 60%), sendo mãos/punhos/metacarpos, tornozelos e joelhos os sítios mais frequentes. Entre as manifestações não articulares, as queixas mais encontradas foram alopecia e depressão, além de redução na qualidade de vida. Os principais fatores de risco foram sexo feminino, idade, e gravidade da fase aguda. Foi verificada ainda disfunção neurocognitiva associada à infecção congênita ([93](#)).

Edington et al. (2018) ([94](#)) revisaram a prevalência de sintomas articulares crônicos nas Américas, em 18 artigos publicados entre 2015 e 2018, envolvendo 2415 pacientes. Analisaram 10 estudos prospectivos e oito retrospectivos, com períodos de seguimento de 10 a 72 semanas. A incidência foi de 52.4% (95% IC: 0.44–0.61),

sendo um pouco mais baixa nos estudos prospectivos (48%), quando comparados aos retrospectivos (57%), porém sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Não foram observadas diferenças estatísticas nas incidências de cronicidade quando considerada a duração do estudo ou estratificação por desenho, tamanho da amostra, região do continente americano ou país ([94](#)). Contudo, considera-se que estes dados podem ser diferentes da realidade do Brasil, pois foi incluído apenas um estudo brasileiro, com pequena amostra, e reconhece-se que nosso País teve, nos últimos anos, o maior número de casos suspeitos da América Latina, e que tem sobreposição de dois diferentes genótipos ([1](#)).

Pacientes com maior intensidade dos sintomas no quadro agudo, proteína C reativa elevada e alta carga viral ($>10^9$ /ml) têm maior risco de evoluir para a fase crônica ([95](#)). Outros fatores como idade maior que 45 anos, títulos mais elevados de anticorpos específicos, persistência do anticorpo IgM contra o CHIKV, presença de doença articular prévia e componentes da síndrome metabólica (HAS, DM, obesidade) também estão relacionados à persistência dos sintomas ([33](#), [82](#), [86](#), [96-100](#)). Alguns genótipos virais tem maior capacidade de induzir manifestações prolongadas, e provavelmente fatores genéticos do hospedeiro também tem impacto sobre o desenvolvimento de artropatia crônica pós CHIK ([18](#), [101](#)).

Nas situações de cronicidade chama a atenção o elevado grau de comprometimento do bem estar global dos indivíduos ([62](#), [82](#), [87](#), [88](#),). Em um estudo indiano, de 1195 indivíduos entrevistados com relato de quadro agudo prévio, 48,6% tinham dor persistente após 18 meses do quadro inicial. Destes, 60,6% tinham disfunção leve com comprometimento da qualidade de vida e 16,2% tinham comprometimento funcional importante ([82](#), [98](#), [102](#), [103](#)). Em outro estudo prospectivo, Couturier *et al.* (2012) ([103](#)), encontraram como fatores de risco para pior índices globais de saúde e satisfação após 24 meses de seguimento, idade avançada, sexo feminino, duração e intensidade do quadro agudo e presença de comorbidades ([103](#)).

Na fase crônica o acometimento articular pode assumir diferentes padrões clínicos. Para a maior parte dos pacientes a artralgia é caracterizada por flutuações na intensidade da dor, com recidivas recorrentes, causando redução da qualidade de vida nos indivíduos acometidos ([104](#), [105](#)). Porém uma parte da população acometida desenvolve sintomas persistentes, sem períodos de remissão, com características similares a algumas doenças reumáticas crônicas, como AR. Artrite simétrica,

comprometimento de articulações das mãos, punhos, joelhos e tornozelos, e rigidez matinal são sintomas comuns à AR e CHIK. Lombalgia inflamatória e acometimento de enteses e fâscias ocorrem nas espondiloartrites e podem ocorrer como manifestações articulares na artropatia por CHIK ([105](#)).

Em um estudo retrospectivo realizado nas ilhas Reunion, entre 159 pacientes com quadro de CHIK encaminhados para o reumatologista, 112 (70%) foram classificados como tendo doença reumática inflamatória crônica, sendo que 40 casos preenchiam os critérios ACR/EULAR 2010 para artrite reumatoide, 33 para espondiloartrite (de acordo com o European Spondyloarthropathy Study Group - ESSG) e 21 foram considerados como tendo poliartrite indiferenciada ([100](#)).

Um estudo realizado na Índia, publicado em 2011 demonstrou que 5,6% dos pacientes com infecção por CHIK desenvolvem artrite crônica com padrão de comprometimento com erosões e raras deformidades (quadro, em geral, associado a fator reumatoide positivo e anticorpos anti-CCP - *anti-cyclic citrullinated peptide* - negativos), que foram efetivamente tratados com metotrexato e/ou sulfasalazina, drogas usadas no tratamento da artrite reumatoide ([106](#)).

1.2.6 Imunopatogênese

A imunopatogênese da CHIK vem sendo extensivamente estudada em modelos animais, culturas de células e estudos em humanos. Vários métodos são utilizados, como estudo do perfil de citocinas, estudos de expressão gênica e estudos de imunofenotipagem. Apesar disto, os mecanismos que levam à cronificação da doença ainda são pouco compreendidos.

1.2.6.1 Imunopatogênese – fase aguda e subaguda

1.2.6.1.1 *Resposta inata*

A resposta viral normal em humanos envolve uma resposta rápida e intensa da imunidade inata, através do reconhecimento de partículas virais por receptores que reconhecem uma gama de estruturas comuns a classes de patógenos (*pathogen associated molecular pattern* - PAMP's). Após lesão celular, também ocorre ativação imune por receptores que identificam padrões moleculares de dano (*damage associated molecular pattern* - DAMP), com a exposição no meio extracelular de substâncias que deveriam ser encontradas apenas no interior de células.

Com esta resposta inicial, inicia-se a produção de uma série de citocinas e quimiocinas, como os interferons (IFN) tipo I (IFN α e IFN β) e II (IFN- γ), e as interleucinas (IL) IL-12, e IL-18, IFN- α/β , IFN- γ , IL-12, e IL-18. Ocorre a ativação de células como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células NK, além da participação do sistema complemento levando à lise das células infectadas e à opsonização das proteínas virais, facilitando a fagocitose (107). Ao longo da resposta antiviral, ocorrem falhas nestes processos e nos mecanismos de controle que levam à erradicação do processo inflamatório após resolução do quadro infeccioso (ainda não completamente elucidados) que permitirão mais tardiamente a cronificação da doença (108).

A fagocitose inicial das células infectadas não é capaz de controlar a replicação viral. Ao contrário, em humanos este processo pode funcionar como forma de disseminação viral para as células da linhagem macrofágica. Contudo, a ativação da imunidade inata é crucial no controle da resposta antiviral e as principais citocinas mediadoras nesta fase seriam os IFN tipo I (α e β), que se elevam precocemente no curso da doença, induzindo uma intensa resposta efetora antiviral (109).

O aumento dos IFN's tipo I não seria induzida diretamente pelo vírus, e sim pelas células não hematopoiéticas infectadas (predominantemente células da linhagem fibroblástica), por via dependente de Cardif ou da proteína adaptadora MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) (109). Cardif, também conhecido como IPS-1, VISA ou MAVS, é uma proteína adaptadora intracelular, que regula resposta de uma família de receptores ativados por proliferador de peroxisoma (PPAR, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*) induzíveis pelo ácido retinóico, levando à produção de IFN após reconhecimento de RNA intracelular.

Há indícios que a sinalização celular via *Toll like receptor* (TRL) é importante no controle da infecção, visto que o TLR3 reconhece RNA viral, detectando células infectadas. A deficiência de TRL3 gera, conforme demonstrado em modelo experimental, uma exacerbação do processo infeccioso(110). Contudo, a sinalização via TRL3 não é exclusiva no processo e já foram relatados outros mecanismos de indução da produção de IFN's tipo I (111). Recentemente Esposito e Fonseca. (2018) identificaram ativação das três vias de detecção e resposta inata antiviral: *Toll-like*, *RIG-I* e *NOD-like* (112).

1.2.6.1.2 Evasão das respostas antivirais

Após o início da replicação, o vírus gera mecanismos de inibição das respostas tipo I e tipo II do interferon: Inibição da indução de transcrição via sinalização JAK/STAT pela proteína viral não estrutural nsp2, reduzindo a sensibilidade viral ao IFN ([113](#), [114](#)). A falha da resposta IFN tipo I foi estudada em modelo animal, resultando em maior gravidade de doença articular e sistêmica ([115](#)). O quadro mais acentuado e a maior incidência de complicações neurológicas e articulares em idosos poderiam ser ocasionados por defeitos adquiridos da resposta antiviral, mais comuns em idosos, como por exemplo, reduções na secreção de IFN α e IFN β . A uma natural deficiência da resposta de IFN-I relacionada à idade, soma-se a influência da elevação do TGF β ([116](#)), o que poderia levar a uma diminuição ainda maior da resposta efetora imune como observado em modelo animal ([115](#)), ([116](#)).

1.2.6.1.3 Replicação tecidual e resposta inflamatória

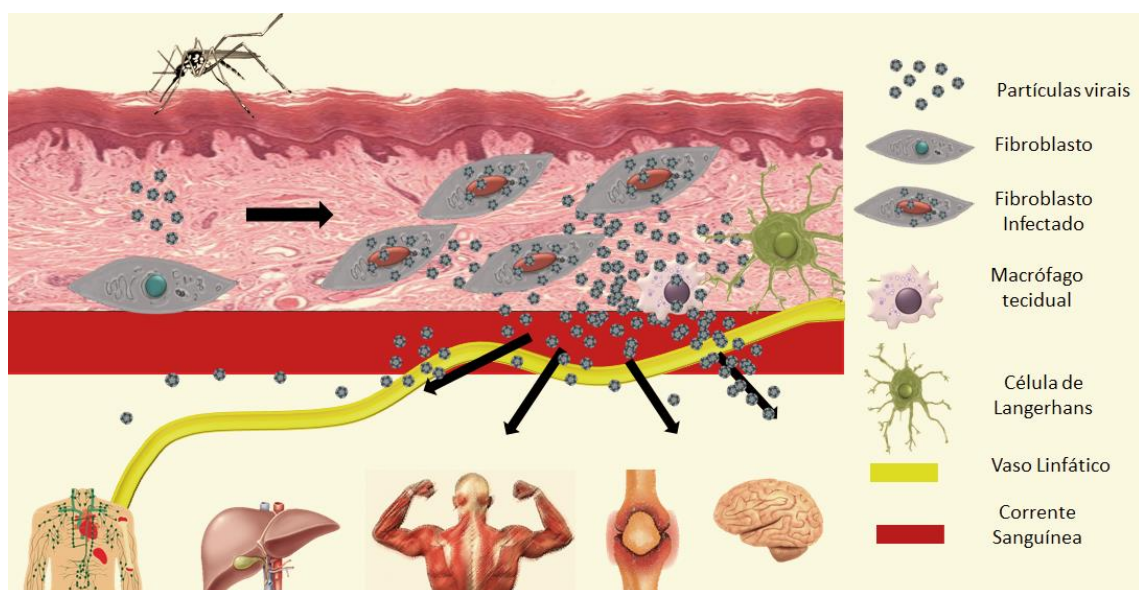
Na fase aguda da CHIK - quando ocorre a disseminação inicial do vírus, coincidindo com a febre, exantema e artralgia intensa, linfopenia e leucopenia (fase de viremia) - a imunidade inata tem um papel importante. Como a pele é usualmente a porta de entrada, as células de linhagem imunológica residentes na pele, tais como células dendríticas, células de Langerhans, fibroblastos cutâneos e macrófagos teciduais da pele são inicialmente invadidas pelo vírus, ocorrendo a replicação viral inicial. Células mononucleares infectadas carregam os vírus, distribuindo-os para o sistema linfático e a corrente sanguínea (Figura 6) ([108](#), [117](#)).

A intensidade da resposta inicial, a manutenção do processo inflamatório na fase subaguda e mesmo a evolução para cronicidade são associadas à dimensão da viremia. Como já havia sido demonstrado em animais ([108](#), [109](#)), *Chow et al* (2011). ([118](#)) demonstraram em humanos que a carga viral na fase aguda tem repercussão nos níveis de proteína C reativa, na contagem de neutrófilos do quadro inicial e na produção de IFN- α e ainda associa-se negativamente à contagem total de linfócitos e de monócitos ([118](#)). Contudo, *Wauquier et al.* (2011) ([119](#)) não encontraram o mesmo resultado em relação ao IFN- α ([119](#)). Paradoxalmente, *Kam et al.*(2012) ([70](#)) demonstraram que a menor carga viral, associada à produção lenta de IgG3 específica aumentou o risco para artralgia persistente, possivelmente indicando que a maior intensidade da resposta antiviral provocada por cargas virais maiores pode ter efeito protetor contra o desenvolvimento da forma crônica da doença ([120](#)).

Após a fase inicial da infecção, o vírus, atinge os tecidos periféricos, onde continua a replicação viral, com seu pico ocorrendo em torno do 6º dia de doença (108). Nesta fase, as principais células alvo são células de linhagem epitelial como células endoteliais, fibroblastos e células sinoviais semelhantes a fibroblastos, células musculares indiferenciadas, macrófagos residentes nos tecidos e possivelmente outras células mononucleares teciduais e do sangue periférico, distribuídas em diversos tecidos como músculo, tecido ósseo, sinóvia, fígado e até sistema nervoso central (Figura 6) (115, 121-125).

Em modelo animal primata, diferentemente de humanos, é claramente demonstrada a persistência prolongada de vírus viável nos tecidos, onde ocorre inflamação após término da viremia (108, 126). Inicialmente, vários tecidos podem ser acometidos, contribuindo para a replicação viral. Posteriormente o vírus é capaz de permanecer “escondido” nas vesículas apoptóticas (127), ou contaminar células adjacentes (96, 128, 129). Contudo, em humanos não foi possível comprovar a presença de infecção crônica, sendo encontrados apenas fragmentos de RNA e proteínas no interior das células de um paciente no estudo de *Hoarau et al.* (2010), sem a presença de partículas virais viáveis (96).

Figura 6: Replicação e disseminação viral na infecção Inicial pelo vírus da Chikungunya. Imagem da autora adaptado de Petitdemange, Wauquier & Vieillard, 2015 (130).



1.2.6.1.4 *Linhagem mononuclear – papel dos monócitos e macrófagos*

Os macrófagos são centrais na imunopatogenia da doença pelo CHIKV, tanto na fase aguda como na crônica, visto que atuam induzindo o processo inflamatório crônico e regulando o processo de eliminação viral, além de servir como célula chave na disseminação do vírus e possível reservatório viral ([108](#), [123](#)). Por outro lado estas células são necessárias ao controle da infecção aguda, uma vez que na sua depleção ocorre aumento da viremia em modelo animal (ratos), ao mesmo tempo em que ocorre uma redução na resposta inflamatória ([131](#), [132](#)).

1.2.6.1.5 *Células NK*

As células mononucleares não são as únicas envolvidas no processo inflamatório inicial, já é bem documentada intensa ativação de células NK (do inglês: *natural killers*) em tecido sinovial e tecido conjuntivo periarticular, que induziriam dano às células infectadas ([119](#), [133](#)). Em modelo animal (ratos) a participação dessas células na imunopatogenia do quadro agudo foi confirmada pela infiltração precoce de sítios de inoculação viral, conjuntamente a macrófagos e monócitos ([131](#)). Hoarau et al. (2010) confirmaram em humanos o envolvimento das células NK, com rápida ativação destas, de células dendríticas e plasmocitóides na fase aguda, e com menor ativação de células T na fase aguda nos pacientes que evoluíram para recuperação ([96](#)).

1.2.6.1.6 *Células T*

Após a apresentação de antígenos, ocorre nos linfonodos a ativação das células TCD8+, que tem seu pico inicial bastante precoce, enquanto o aumento dos linfócitos T CD4+ ocorre um pouco mais tardiamente, ao fim da primeira semana após o início do quadro clínico ([119](#)). O papel dos linfócitos T vem sendo estudado com resultados conflitantes ([134](#)), o que em parte pode ser atribuído às diferenças entre humanos e modelos animais ([130](#)).

Discute-se qual o papel das células T na erradicação da proliferação do vírus e da persistência dos sintomas articulares. Estudos sugerem que apesar da sua incapacidade para realizar o controle da viremia ([96](#)) elas teriam participação na imunopatogenese da doença crônica ([135](#), [136](#)). A favor disto, a administração de em modelo animal da proteína de fusão CTLA4-Ig, que previne a ativação do CD28, reduzindo ativação linfocitária, melhorou o edema articular em ratos, diminuindo a

infiltração tissular por células T ([137](#)). Porém outros estudos consideram a participação de células T como parte necessária para o controle da viremia ([138](#)), ou pelo menos no controle do processo inflamatório ([139](#)).

1.2.6.1.7 Citocinas

Entre as citocinas, além dos IFN- α , β e γ , as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α aumentam muito precocemente ainda na fase virêmica, estas últimas parecem ter correlação direta com os níveis de viremia (Figura 7) ([118](#), [119](#), [140](#), [141](#)).

Outros fatores solúveis também aumentam durante a fase aguda:

- Citocinas pró-inflamatórias IL-7, IL-8 (que atua atraindo neutrófilos), IL-12 (que tem papel no estímulo de células NK), IL-15,
- Quimiocinas MCP-1, MCP-2 e MCP-3 (MCP: *monocyte chemoattractant protein*) e IP-10 (*IFN inducible protein-10* ou CXCL-10),
- Citocinas antiinflamatórias IL-1Ra, IL-10, IL-13
- Fatores de crescimento como: GCSF (*granulocyte colony stimulant fator*), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulant factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ([118](#), [142](#)).

1.2.6.1.8 Tipos de resposta imune relacionada à função T auxiliar

Na resposta antiviral usual para a cura e prevenção contra os vírus citopáticos, é necessária a ação celular T direta, a resposta indireta através da produção de citocinas vinculadas às células T auxiliares (*T helper* – Th), além da produção de anticorpos específicos que neutralizem a ação viral. No tocante à resposta celular vinculado às células T, a resposta Th1 promove morte das células infectadas enquanto a Th2 potencializa a resposta humoral antiviral. As células Th1 induzem a produção de citocinas inflamatórias como TNF e IFN- γ . As células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e IL-13 ([143](#)). Os linfócitos T com fenótipo Th17 (que produzem a resposta Th17 envolvida na inflamação tissular e autoimunidade) produzem IL-17, IL-17F, IL-6, IL-22 e TNF- α . A resposta T regulatória, induzida por um quarto subgrupo de células T, leva à produção de TGF- β e IL-10 induzindo à tolerância por supressão da atividade de células T auxiliares ([143](#)).

Uma questão importante em relação à imunopatogenia da CHIK, é que não ocorre a usual polarização para resposta Th1, Th2 (que normalmente se antagonizariam, de certo modo) ou para Th17. Estão presentes fatores polarizadores

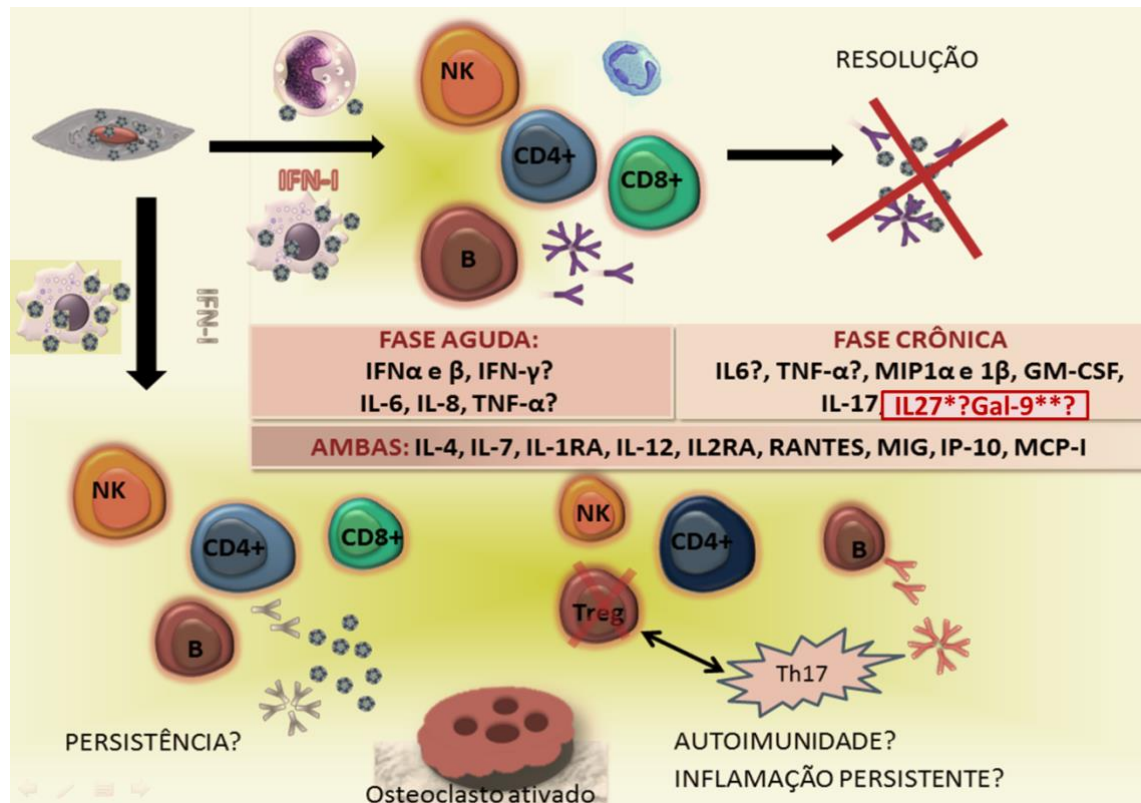
de ambas as respostas, sem clara sobreposição de uma resposta, especialmente na fase crônica: Th1 (IL-12, IFN- α , IFN- β e IFN-gama, IL-18, IL-27) e Th2 (IL-4 e IL-6). Analisando o perfil de citocinas em 28 pacientes na fase aguda, *Chirathaworn et al.* (2013) ([142](#)) não encontraram diferença entre pacientes e controle em relação às citocinas Th1 e Th2. Uma explicação seria de que a infecção levasse a um desequilíbrio da resposta usual, com sobreposição de citocinas Th1 e Th2. Os pesquisadores não encontraram, ainda, aumento das citocinas da resposta Th17, porém isto pode ser justificado pelo momento da coleta haver ocorrido apenas na transição das fases aguda/subaguda (0-16d pós início da febre) ([142](#)), enquanto espera-se que a IL-17 aumente após a 4ª semana de doença ([118](#)).

Na fase subaguda, pode ocorrer a persistência da produção de IL-6 e GM-CSF e inicia-se a produção de IL-17 que sinaliza a ativação Th17. Nos pacientes que evoluíram para recuperação após a fase aguda, HGF (*hepatocyte growth factor*) e eotaxina se mostraram elevados ([118](#)).

1.2.6.1.9 Interferências nos níveis de citocinas por fatores não relacionados à infecção viral

Outro ponto importante a ser discutido é o de que apesar de se haver definido o papel de vários fatores humorais na imunopatogênese da Febre de Chikungunya, existe acentuada variação (tanto na fase aguda como na crônica) entre diferentes estudos nos níveis de citocinas. Teng *et al.* (2015) ([144](#)) sugeriram que os diferentes padrões (assinaturas) do pool de citocinas / quimiocinas pudessem ocorrer por diferenças entre os seus níveis basais nas populações, contudo, outros fatores como o tamanho da amostra, tempo desde a coleta, horário da coleta, diferenças nas técnicas experimentais, uso de plasma ou soro, variações na fase e intensidade da doença, uso de medicações, genótipo do vírus infectante também podem ter um papel relevante para essa diferença ([144-146](#)).

Figura 7: Modelo simplificado da participação de células da imunidade inata e adaptativa e de citocinas nas fases aguda e crônica da CHIK. Imagem da autora.



1.2.6.2 Imunopatogênese - fase crônica

1.2.6.2.1 Hipóteses relacionadas à cronificação

Apesar de vários estudos populacionais identificarem fatores de risco e dos vários estudos que investigam a imunopatogênese da infecção, a persistência dos sintomas articulares ainda não foi elucidada do ponto de vista fisiopatológico. Há duas principais hipóteses que tentam explicar por que ocorre inflamação persistente:

I - Persistência de vírus viável (infecção crônica), ou inviável (fragmentos de RNA e proteínas). Tal persistência poderia levar a ativação imune prolongada.

Como já previamente discutido, fibroblastos (ou células semelhantes à fibroblastos), macrófagos e vesículas apoptóticas poderiam ser nichos imunoprevilegiados onde os vírus ou seus fragmentos permaneceriam por tempo prolongado (96, 108, 138). A partir disso, ocorreria uma estimulação persistente como sugerido por Chopra *et al.* (2008) (95), causando desregulação dos mecanismos de controle do processo inflamatório. Por sua vez, o processo inflamatório poderia gerar um ambiente favorável para a persistência viral, onde macrófagos ativados seriam

infectados através da fagocitose de vesículas apoptóticas com a presença de vírus viável, em um mecanismo similar ao que ocorre na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) ([147](#)).

II - A autoimunidade induzida por mimetismo molecular a antígenos virais - A evolução para doenças com características de reumatopatias crônicas, além da positividade de auto anticorpos ([72](#), [86](#), [148-150](#)) leva à suspeita de que o CHIKV induza a autoimunidade em indivíduos geneticamente predispostos. Fala à favor dessa suspeição a existência de semelhanças não apenas clínicas, mas fisiopatogênicas entre AR ([151](#)) e CHIK, como o perfil fenotípico de subpopulações de linfócitos T ([152](#)), como o aumento da ativação de células T CD4+ em relação às CD8+ ([135](#), [153](#), [154](#)).

Estudos de bioinformática (*docking* molecular) encontraram similaridades entre peptídeos provenientes da proteína do envelope viral E1 e proteínas humanas. A administração, em ratos, destas proteínas sintetizadas foi capaz de induzir inflamação muscular (um dos principais sítios de inflamação no modelo animal) ([155](#)). Ainda corroborando a hipótese autoimune, outro trabalho de *docking* molecular, de Hogeboom (2015) ([156](#)), levanta a possibilidade de antígenos de *alphavirus* desencadearem AR. Ao analisar 185 proteínas de vírus e bactérias intracelulares e 185 proteínas controles, Hogeboom (2015) demonstrou que peptídeos de proteínas do capsídeo de *alfavírus* (Chikungunya, Mayaro, Ross river fever) resultaram no melhor ajuste molecular ao antígeno de leucocitário humano (HLA – do inglês *human leucocyte antigen*) DR4. Mutações no gene que codifica este antígeno aumentam o risco de artrite reumatóide. Encontraram também elevada homologia com fragmentos de colágeno tipo II (fragmento 1168-1180) – alvo envolvido na imunopatogenia da AR ([156](#)).

Outros dados que suportam a teoria da imunogenicidade do CHIKV são a positividade de fator reumatóide (FR) ([149](#), [150](#)), fator antinúcleo (FAN) ([86](#)) e anticorpos anti peptídeos citrulinados (Anti-CCP) ([157](#)) (quadro 2) durante as infecções virais (dados ainda conflituosos), e os relatos de indução de doença auto-imune pós CHIK. A maior prevalência do HLA DRB1*11 entre pacientes com artropatia crônica erosiva pós-CHIK favorece a possibilidade de fatores genéticos associados ao sistema imune estarem envolvidos no processo ([158](#)). Porém as evidências desta associação ainda são escassas e de baixa qualidade, uma vez que as avaliações foram realizadas em poucos pacientes dificultando extrapolação clínica e necessitam confirmação.

Ainda uma terceira hipótese é a de que doenças preexistentes, articulares como artropatias microcristalinas, osteoartrite e AR, sejam elas já instaladas ou a sua predisposição, e doenças crônicas metabólicas não articulares, como síndrome metabólica e hipotireoidismo, poderiam contribuir para a evolução para poliartrite crônica (84).

Quadro 2 – Fatores solúveis relacionados a doenças auto-imunes na Chikungunya

Observações			
Marcador	Frequencia	Título	Referências
FR	Variável 4-10% 22/350		Sepulveda-delgado 2017 Manimunda, 2010 Chopra, 2014 Venugopalan 2014 Anfasa 2017 Chang, 2018
Anti-CCP	1 /350		Manimunda, 2010 Schilte, 2013 Chopra, 2014 Venugopalan, 2014 Anfasa 2017 Chang 2018
FAN	Variável 5-10% 9/220	Título baixo, sem correlações clínicas	Schilte 2013 Venugopalan, 2014
Anti DNA	0/40		Schilte, 2013
Anti endomísio	0/40		Schilte, 2013
Crioglobulinas	0/40		Schilte, 2013

FR – Fator reumatoide, Anti-CCP – Anti proteínas citrulinadas, FAN – Fator anti-núcleo

1.2.6.2.2 Principais células envolvidas no processo de cronificação da CHIK - Células da linhagem monocítica/macrofágica

Foi aventada a participação de células da linhagem monocítica/macrofágica no processo de cronificação, uma vez que a inibição da produção de CCL2, um poderoso fator quimiotático de monócitos/macrófagos levou a uma melhora do quadro articular em modelo animal, contudo, foi demonstrado que na ausência do receptor de CCL2 (o CCR2) ocorre um processo inflamatório dominado por neutrófilos, ainda mais intenso e erosivo (126, 159). Biopsias sinoviais e musculares de indivíduos com manifestações crônicas da doença demonstram infiltração local de macrófagos (96, 129).

1.2.6.2.3 Células NK

Além da participação das alterações inflamatórias no quadro agudo, a presença das células NK foi detectada em infiltrados inflamatórios articulares de pacientes na fase crônica da doença (96). Thanapati (2017) investigou a questão comparando o fenótipo de células NK (por imunofenotipagem, seguido de avaliação de atividade da perforina) entre pacientes crônicos pós-CHIK, pacientes de AR e controles. Encontrou um padrão característico, com menor funcionalidade (menor nível de perforina) nas células NK de pacientes com CHIKV, e elevada expressão de TNF nestas células e em células NK-like tanto em AR quanto em pacientes crônicos de CHIK (134). Além disso, demonstrou que uma desregulação da relação NK/NK-like também pode contribuir no processo de cronificação (160, 161).

1.2.6.2.4 Linfócitos T

O aumento de linfócitos T CD8+ (107, 119) nas fases iniciais do quadro é substituído por aumento de linfócitos TCD4+ ainda precocemente (135). Contudo, ainda existe persistência da ativação de linfócitos T CD8+ na fase crônica. Miner et al. (2015) (152) encontraram aumento de células T CD8+ em pacientes na fase crônica. Já o estudo de Dias et al. (2018) (153) demonstrou que apesar de não haver diferença no percentual de células T CD8+ entre indivíduos infectados pelo CHIKV na fase crônica da doença e indivíduos controle, ocorre maior ativação destas células na fase nos indivíduos com CHIK aguda e em menor grau na fase crônica. O estudo de Hoarau et al. (2013) (133) avaliando a resposta linfocitária a proteínas virais na fase crônica (12-24 meses) e em indivíduos recuperados demonstrou respostas celulares T específicas contra o CHIKV similares entre os dois grupos. Foi encontrada maior intensidade da resposta TCD8 que CD4.

O estudo de Kulkarni et al. (2017) sugere, ainda, uma disfunção de células T CD4 regulatórias (Treg) na CHIK crônica, com persistência de redução de seu número em comparação a indivíduos recuperados e a indivíduos saudáveis {Kulkarni, 2017 #638}.

Vários outros fatores ainda necessitam mais estudos que elucidem sua participação na evolução para cronicidade, como, por exemplo, o desbalanço entre linfócitos T e células Treg, além da participação da via TH17. A anteriormente descrita redução no número de células T reg e o achado de que a indução destas células atenua as manifestações articulares da CHIK (139), são evidências indiretas da

relevância no processo de cronificação, assim como, o aumento da IL-17 nas fases subaguda e crônica da doença, sugere a participação da via Th17 ([107](#), [118](#)).

1.2.6.2.5 *Linfócitos B*

Em relação aos linfócitos B, sabe-se que ocorre persistência da produção de anticorpos ao longo da fase crônica, com diferenças em relação aos subtipos de anticorpos produzidos entre indivíduos recuperados e crônicos (maior produção de IgG3 nos indivíduos recuperados ([70](#)).

1.2.6.2.6 *Osteoclastogênese*

Parece haver evidências em modelos animais que justificam as alterações erosivas encontradas em pacientes mais graves, como uma maior preponderância em prol de fatores pró-osteoclásticos, com aumento da relação RANKL/OPG (ligante do fator nuclear kappa-betta/osteoprotegerina) ([162](#), [163](#)), havendo reprodução destes resultados em humanos ([123](#), [164](#)). Em laboratório, osteoblastos podem ser infectados pelo CHIKV, e induzem à osteoclastogênese ao produzir IL-6 e RANKL ([163](#)).

1.2.6.2.7 *Citocinas na fase crônica*

Há evidência de persistência do aumento de mRNA de IFN α e IL-12 até um ano após o quadro agudo, embora os níveis séricos destas citocinas retornem aos seus valores normais por volta do 3º mês após a infecção, independentemente da persistência de sintomas ([96](#)).

Parece haver um predomínio da resposta Th1 nas fases crônicas da doença, como pode ser evidenciado por um aumento de IL-1 β , IL-1RA, MCP1/CCL2, MIP (*Macrophage Inflammatory Proteins*)-1 α /CCLA3, MIP1 β /CCL4 e IL-8 ([107](#)). O aumento de IL-18 e IL-18BP (*interleukin 18 binding protein*) também parece apontar para um envolvimento da via Th1 no processo inflamatório pós Chikungunya ([165](#)). Por outro lado, há elevação de IL-6 IL-4, IL-10, sugerindo manutenção da via Th2. O GM-CSF também estaria aumentado na fase crônica em pacientes com artrite persistente. Parece haver, ainda, envolvimento de citocinas da via Th17, como ocorre na AR e espondiloartrites.

Uma metanálise de 2015 avaliando citocinas em pacientes com infecção por CHIK demonstrou que na fase aguda há aumento significativo de IFN- α , IFN γ , IL-2,

IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-1Ra, IL-4, IL-10, IP-10, MCP-1, MIG (do inglês: *monokine induced by gamma interferon*), MIP1 α , MIP-1 β e TGF- β (do inglês: *transforming growth factor beta*) ([144](#)). Entre estes, IFN- α , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, MCP-1/CCL2 e MMP-2 podem ser detectados até 18 meses após o quadro agudo nos tecidos de pacientes, o mesmo não foi demonstrado em indivíduos recuperados ([96](#), [134](#), [147](#)).

1.2.6.3 Galectinas

As Galectinas (Gal) são uma família de lectinas de origem animal, com afinidade por β -galactosídeos, que são envolvidas na modulação de interações célula-célula e célula-matriz ([166](#)). Reconhecem cadeias glicídicas de glicolipídeos e glicoproteínas. Detêm múltiplas funções, por exemplo, são envolvidas na modulação de interações (adesão e sinalização) célula-célula e célula-matriz, participam do processo de desenvolvimento de estruturas embriônicas, da angiogênese, regeneração tissular, regulação do ciclo celular, adipogênese, e controle homeostático de diversos tecidos ([166](#)). Tal diversidade de funções é decorrente das condições bioquímicas teciduais e da presença ou ausência de ligantes específicos no ambiente tissular do meio.

A concentração das diferentes galectinas no meio é relevante para sua função, uma vez que, quando em altas concentrações, uma galectina pode ligar-se a vários ligantes. Em baixas concentrações há um número bem mais limitado de ligantes da superfície celular e da matriz tecidual capaz de serem reconhecidos pelas galectinas ([167-170](#)).

Muitas das ações das galectinas ocorrem através de seu relevante papel no controle da apoptose em células de diversos tecidos, em especial em células do sistema imune. Isto foi bem demonstrado para a GAL-3, que bloqueia o sinal de apoptose por interação com o receptor TRAIL-Rs e induz apoptose ao interagir com CD95. GAL-1 também atua via CD-95, induzindo apoptose, ao passo que GAL-9 pode induzir a morte celular programada via interação com receptores que sinalizam a morte celular (DR, do inglês *death receptors*) em vários tipos celulares, porém na imunidade adaptativa, associa-se especificamente com Tim-3. Outros mecanismos para indução de apoptose por galectinas já foram demonstrados, como, entre outras, a ação mitocondrial direta de GAL-3 e interação desta com outros receptores celulares como CD29/CD7 em células T ([171](#)).

No sistema imunológico as galectinas tem papel abrangente, funcionando como receptores de PAMP's e DAMP's, participando assim de mecanismos de desencadeamento na resposta imune inata a vírus e bactérias. Contudo, o papel das galectinas nos sistema imune é bem mais complexo, uma vez que elas têm papel regulatório sobre as respostas inata e adaptativa ([172](#)), incluindo a participação de GAL-9 na autoimunidade mediada por Th1 / Th17 ([173](#)) e o envolvimento de GAL-1, -3 e -9 em infecções virais ([174](#)).

1.2.6.3.1 Galectinas e CHIK

O interesse em avaliar o envolvimento das galectinas na fisiopatogenia da CHIK provém da participação das galectinas na fisiopatogenia de doenças inflamatórias, como a AR ([187-189](#)), e em outras arboviroses, como a Dengue ([190](#), [191](#)). Além do fato das galectinas terem papel no controle de diversas funções macrofágicas e linfocíticas ([167](#), [179](#), [192](#), [193](#)), células intensamente envolvidas na fisiopatogenia da artropatia pela Chikungunya ([131](#), [194](#)), por sua função reguladora de apoptose poderiam ainda estar envolvidas nas alterações deste processo associadas à infecção pelo CHIKV e em processos de cronificação de doenças virais([195-198](#)).

1.2.6.3.2 GAL-1

No sistema imune a GAL-1 localiza-se principalmente nos órgãos linfoides, em macrófagos ativados e células endoteliais ([175](#)). Sua principal função é sinalizar para células T e macrófagos a resolução do processo inflamatório quando os antígenos desencadeantes da resposta inflamatória são eliminados, modulando negativamente a resposta inata e as respostas Th1 e Th17 e induzindo a expansão de Tregs. Além disso, tem outras ações anti-inflamatórias ao diminuir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, inibir a adesão e migração de neutrófilos ativados, células T e eosinófilos, reduzindo a sobrevivência dos últimos e a degranulação mastocitária ([175-177](#)).

1.2.6.3.3 GAL-3

A GAL-3 pode ter ações pró ou anti-inflamatórias a depender de concentração, alvo celular, localização intra ou extra-celular. Contribui para a resolução do processo inflamatório ao estimular a fagocitose de restos celulares, como neutrófilos apoptóticos e ao induzir e a apoptose de células T ([178](#)).

Favorece ação pró-inflamatória detectando carboidratos na superfície de bactérias (PAMPr) e também como DAMPr, e estimulando a fagocitose de microorganismos e restos celulares por neutrófilos. Estimula a adesão leucocitária, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2 e IL-8 e estimula a degranulação de neutrófilos, além de atuar como fator quimiotático de monócitos e macrófagos e induzir a ativação deste último ([179](#), [180](#)). Sua expressão tecidual é aumentada em patologias onde ocorre proliferação sinovial, como AR e osteoartrite. Em modelo animal de AR, a GAL-3 é indutora de ativação de fibroblastos e da produção de citocinas pró-inflamatórias ([177](#)).

Nos processos infecciosos, os níveis séricos de GAL-3 encontram-se particularmente elevados nos quadros de sepse de origem fúngica e bacteriana ([181](#)). A elevação dos níveis séricos de GAL-3 é marcador preditor de mortalidade por qualquer causa (*all-cause mortality*) na população geral ([182](#)).

1.2.6.3.4 GAL-4

A GAL-4 é expressa principalmente no trato gastrointestinal e pode estar envolvida na exacerbação inflamatória ao estimular células TCD4⁺ intestinais a produzir IL-6 ([183](#)). Foi descrita ainda a diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias e a apoptose de células T da mucosa gastrintestinal ([179](#)).

1.2.6.3.5 GAL-7

A GAL-7 é estudada em doenças com alterações de epitélios estratificados ([184](#), [185](#)) e pode estar envolvida na ativação de células T ([186](#)).

1.2.6.3.6 GAL-9

A GAL-9, é produzida por células T ativadas, possuindo atividade quimiotática para eosinófilos. Nas síndromes eosinofílicas suprime a apoptose de eosinófilos ativados e induz a produção de ROS (do inglês: *reactive oxygen species*) nestas células ([179](#)).

As principais ações sobre o sistema imune da GAL-9 são decorrentes de sua interação com o receptor de células Th1, Tim-3, levando à morte celular por influxo de cálcio ou suprimindo as funções efetoras de linfócitos T. Também estimula a produção de Tregs e favorece a diminuição da produção de células T17, leva à redução da produção de TNF- α e IL-1 β e aumenta a produção de IL-10 em macrófagos ativados.

É descrita, ainda, a indução de apoptose de células T CD8+ em modelo animal de nefrite. Contrariamente, induz a produção de citocinas Th1 por células TCD4+ ao estimular a ativação de células dendríticas, induzindo a secreção de IL-12 por estas células. Em modelo de AR a GAL-9 induziu a apoptose de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, contribuindo para a resolução do processo inflamatório. É relatado o aumento de sua expressão em várias infecções virais crônicas ([166](#), [174](#), [175](#), [179](#)). O aumento da expressão de Tim-3 e dos níveis séricos de GAL-9 poderiam diminuir a ativação persistente de células T em infecções virais crônicas, enquanto o bloqueio da interação entre GAL-9 e Tim-3 levaria a uma resposta imune antiviral mais efetiva ([169](#),[172](#)).

1.2.6.4 Biomarcadores

Biomarcadores, como definido pelo *Biomarkers Definitions Working Group* (BDWG) em 2001, “são características que podem ser objetivamente mensuradas e avaliadas como indicadores de processos fisiológicos ou patológicos, ou de resposta farmacológica às intervenções terapêuticas” ([199](#)). Podem ser considerados ferramentas analíticas utilizadas para avaliar parâmetros biológicos, funcionando como medidas substitutas a desfechos clínicos.

Existem múltiplas funções para as quais um biomarcador pode ser utilizado, como avaliação de resposta terapêutica e de eficácia e segurança de drogas em situações em que não é possível avaliar o desfecho desejado (ex: estudos *in vitro*). Podem ser utilizados como ferramenta diagnóstica, no estadiamento de patologias, na avaliação prognóstica (na progressão ou regressão de patologias), como ferramenta de avaliação de complacência ao tratamento, ou como ferramenta de monitorização de evolução. ([199](#)) ([200](#)).

Biomarcadores também estão presentes em múltiplos níveis no processo do desenvolvimento de ferramentas terapêuticas, por exemplo, no desenvolvimento de drogas direcionadas a novos alvos terapêuticos inseridos no processo fisiopatológico da doença que se deseja tratar, guiando a seleção de compostos alvo específicos. Auxiliam ainda na redução de custos e tempo na avaliação de segurança e eficácia de compostos em teste (marcadores preditivos) ([201](#)).

No contexto da CHIK a detecção de marcadores laboratoriais, imunológicos e genéticos, pode vir a ser útil na predição tanto de evolução para cronicidade ou cura precoce, quanto de risco aumentado para formas graves e complicações e da

resposta ao tratamento. Para determinar quais moléculas ou padrões tem aplicabilidade clínica, estudos de correlação clínico-laboratorial são necessários. A determinação de correlações clínicas com os níveis séricos de biomarcadores pode contribuir para o entendimento da imunopatogênese da doença.

O comportamento de determinada citocina/quimiocina na indução ou controle do processo inflamatório, depende muitas vezes da constituição química e celular do meio. Um comportamento fora do esperado para determinada molécula pode levantar questionamentos/hipóteses sobre os mecanismos envolvidos no processo imune. Este achado pode também revelar alvos terapêuticos que guiem o desenvolvimento de novas drogas específicas ou a utilização de drogas disponíveis para o controle da doença. Por exemplo, a detecção do envolvimento de IL-1 β ([141](#)) ou IL-17 ([118](#)) enquanto marcador de cronicidade sugere a possibilidade da utilização de medicações anti IL-1 ou anti-IL-17 (como o canakinumabe ou sekuquinumabe, respectivamente) para o controle das manifestações crônicas da Febre de Chikungunya.

Alguns resultados de exames utilizados na rotina de avaliação clínico-laboratorial da doença, como proteína C reativa ([72](#), [86](#)), ferritina ([77](#)), e Imunoglobulina específica ([72](#), [86](#), [141](#)), foram definidos como marcadores prognósticos. Em relação às citocinas compilamos abaixo os principais resultados que avaliam o potencial papel de citocinas enquanto biomarcadores nas fases aguda e/ou subaguda ([140](#)), e na fase crônica ([202](#)).

Em 2009, o primeiro estudo que demonstrou elevação de citocinas na CHIK foi realizado em Singapura, incluindo apenas 10 pacientes e determinou o perfil de 30 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, e coleta em tempos diversos de 1 a 19 dias de doença. Encontrou elevação de IL-2R, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-15, IFN- α , IP-10 e MIG, VEGF, FGF-basic, com diferença estatística em relação aos controles, com redução de IL-8, eotaxina, EGF e HGF. Não foi encontrado diferença em relação a controle para GM-CSF, IL-1 β , IL-1RA, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-12p40/p70, IL-13, IL-17, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES e G-CSF. Apesar do pequeno número de pacientes, foi encontrada associação do aumento de IL-6, IL-1 β e da redução de RANTES com severidade de doença na fase aguda (febre e plaquetopenia), ressaltando-se que os 2 últimos não foram estatisticamente diferentes de controles. O estudo sugere ainda a utilização da diminuição RANTES como biomarcador para

diferenciação de Febre da Dengue, uma vez que estaria reduzido na CHIK e elevado na Febre da Dengue ([140](#)).

Apesar do pequeno número de pacientes e de se limitar à fase aguda da doença, este estudo é importante, porque além de ser o primeiro a avaliar os níveis de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, avalia a relação entre a apresentação clínica da doença e os níveis de tais fatores solúveis, definindo alguns dos primeiros biomarcadores entre os mediadores inflamatórios da doença.

No contexto da fase aguda, estudos subsequentes como o de Chaaitanya et al. 2010 ([107](#)), definiram outros biomarcadores relacionados à fase aguda, como a diminuição de RANTES como marcadores de gravidade da fase aguda (quadro 3). Enquanto estudos como o de Chirathaworn et al. (2010) ([165](#)), que insere al IL-18 e IL-18BP na fisiopatologia da CHIK, e Wauquier et al. (2011) ([119](#)), que dosaram um perfil de 50 fatores solúveis, além do fenótipo das células T, realizaram análises apenas na fase aguda e sem correlação com dados clínicos da doença ou de sua evolução. Já Lohachanakaul et al. (2012) ([203](#)), avaliaram 62 pacientes com doenças febris, na fase aguda e subaguda, dos quais 35 portadores de CHIK, demonstrando que IL-6 e MCP-1 encontravam-se mais elevados na CHIK que em outras síndromes febris e correlacionaram-se com a gravidade do quadro, enquanto TNF- α e IL-8 apresentaram-se mais baixos que nas outras síndromes febris.

Reddy et al. ([63](#)) publicaram em 2014 um estudo realizado na Índia, incluindo 48 indivíduos na fase aguda da CHIKV (2-10 dias após o início dos sintomas) e 37 controles saudáveis. Foram dosados por CBA IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-17, IFN- γ , e TNF- α , IP-10, MIG, MCP-1, e RANTES. Destas, IL-6, IL-4, IL-5, IL-8, MCP-1, MIG e IP-10 estavam elevadas em relação aos controles e foram mais elevadas nos pacientes com carga viral detectável. Como em estudos prévios, RANTES foi significativamente mais baixo nos pacientes que nos controles. Nos 4 pacientes que evoluíram com artralgia persistente as citocinas foram novamente dosadas após 2, 4 e 12 semanas do início dos sintomas, demonstrando uma elevação de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1 e MIG. Todos com elevação na 2ª semana e posterior normalização, exceto MIG e MCP-1 mantiveram-se elevados acima dos níveis iniciais e dos encontrados nos controles. RANTES foi diminuindo progressivamente em relação aos controles até a semana 12. Contudo, estes fatores solúveis não foram dosados na segunda semana nos pacientes que não evoluíram com persistência dos sintomas, não sendo possível avaliar se este é o comportamento

usual após a fase aguda ou se seriam preditores de evolução para persistência dos sintomas.

Chirathaworn et al. (2013) ([142](#)), compararam o perfil de citocinas dosadas por CBA em 28 pacientes sequencialmente nas fases aguda (2-6 dias do início do quadro febril) e subaguda (5 a 13 dias após a primeira coleta) com 20 controles. Encontraram aumento de IL-6, G-CSF, GM-CSF, MCP-1 e TNF- α na fase aguda, com subsequente redução de IL-6, GM-CSF e MCP-1 na fase subaguda.

O estudo realizado na Índia por Venugopalan ([72](#)) embora descreva pacientes com sintomas estendidos, avaliou de fato pacientes na fase aguda e subaguda, pois os descritos sintomas estendidos ocorreram ainda dentro da fase subaguda, com cerca de 30 dias de doença. Foram dosados IFN- α , IFN- β , IL-1 β , MCP-1, IL-4 e IL-10 em 31 pacientes sintomáticos, sendo 23 com 0-5d, 4 com 6-14d, e 4 com 15-30d. IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-13, IP-10 foram dosadas em 110 indivíduos sintomáticos, sendo 23 com 0-5d, 22 com 6-14d, 65 com 15-30d e em 22 indivíduos recuperados. Todos os fatores solúveis foram dosados em 80 controles saudáveis. No geral foi demonstrado aumento de IFN- α , IFN- β , IFN- γ , P-10 e IL-1 β no início da fase aguda, com redução progressiva ao longo da fase subaguda. Já TNF- α , MCP-1, IL-4, IL-6 e IL-10 aumentaram ao longo da fase aguda, atingindo seu máximo na fase subaguda, mantendo-se altos nos indivíduos recuperados. O aumento de IL-6, IP-10, proteína C reativa alta e a falta de positividade do IgG específico foram preditores de persistência dos sintomas na fase aguda.

Em 2015, Teng et al. ([144](#)) avaliaram o perfil de citocinas em 99 pacientes na fase aguda, contudo, compararam apenas com 8 pacientes com quadro febril agudo e não com controles saudáveis. Demonstrando, contudo, que houve aumento nos níveis de IL1-RA, eotaxina, MCP-1, IFN- α nos indivíduos com alta carga viral quando comparado aos com baixa carga viral e ao contrário, aumento de IL-8 nos indivíduos com baixa carga viral.

Outro trabalho que avalia citocinas na fase aguda é o de Dutta et al. (2017) ([202](#)), que dosou IFN- α , IL-6 e TNF- α em 63 pacientes na fase aguda, e em 157 controles. A IL-6, apesar de se correlacionar com artralgia, não foi estatisticamente diferente dos controles. Já IFN- α e TNF- α foram mais elevados que nos indivíduos saudáveis.

O primeiro estudo que avaliou marcadores relacionados às formas persistentes da CHIK em humanos foi o trabalho de Hoarau et al., de 2010, ([96](#)) realizado nas ilhas

da Reunião. Neste trabalho os autores avaliaram 32 pacientes com quadro agudo de CHIK (4-5 dias de sintomas), acompanhando 15 destes pacientes por 12 a 18 meses (Grupo I: 6 recuperados e Grupo II: 9 com persistência dos sintomas) com coletas de sangue subsequentes até o 12º-18º mês. Idade >60 anos, carga viral 10^9 – 10^{10} partículas virais/ml, e proteína C reativa no T0 foram os melhores fatores discriminantes entre os 2 grupos. A IgM persistiu positiva por 12 meses, sem diferença estatística entre os grupos para IgM ou IgG. Em relação as citocinas, na fase aguda, encontrou níveis pouco elevados de citocinas Th1 (IL-8 e TNF- α) e níveis de citocinas anti-inflamatórias Th2 (IL-4 e IL-10), Não houve detecção de IL-1 β ou IL-2. Foi encontrado um aumento mais importante de IFN- γ (sem diferença entre os pacientes que evoluíram para cronicidade ou recuperação) e IL-12, que retornou aos níveis normais precocemente nos indivíduos que evoluíram para recuperação e manteve elevada durante toda a fase crônica nos indivíduos com sintomas persistentes. Não houve diferença significativa entre grupos em relação a nenhuma das citocinas coletadas na fase aguda (T0). A IL-12 tem papel relevante na imunidade adaptativa, fundamental para a resposta antiviral, ao estimular a ativação de células NK e de macrófagos. Esta citocina foi o único marcador de cronicidade encontrado, uma vez que IFN- γ não pôde diferenciar entre cronicidade ou recuperação. (96).

Em um trabalho realizado na Índia, publicado em 2011, Chaayitanya et al. (107), avaliaram 22 indivíduos, divididos entre 3 grupos: 6 pacientes com doença aguda, 6 pacientes pós fase aguda recuperados após sintomas iniciais (ambos grupos com 5-7 dias de doença), 10 pacientes com dor articular crônica (10 meses após a infecção inicial), além de seis controles. Foram encontrados elevação na fase aguda, em relação aos controles, de IL1-RA, IL2-R, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, MIG, e MCP-1 CHIKF e redução nos níveis de G-CSF e RANTES. Nos pacientes crônicos (10m após infecção inicial) foi observada elevação estatisticamente significativa de IL-6, IL-1RA, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , e MCP-1 em relação aos controles. IL-6, IL-8 e MCP-1 tiveram seus níveis diversas vezes mais elevados nos pacientes crônicos do que nos agudos, e nos controles ou nos recuperados. O mesmo ocorreu em menor proporção para MIP-1 α e MIP-1 β . IL-1RA elevou-se nos pacientes agudos e manteve-se alto nos crônicos, com redução para níveis próximos aos dos controles na recuperação. IL-10, MIG e IP-10 elevaram-se apenas na fase aguda e IL-5 teve um pequeno, porém significativo, aumento na recuperação. Os níveis de G-CSF e RANTES foram mais baixos nos pacientes com quadro agudo do que em controles. Este último foi ainda

mais baixo nos pacientes crônicos do que nos agudos, com elevação nos indivíduos em recuperação. Com a resolução do quadro agudo IL-1RA, IL-6, IL-8, MIP-1a, MIP-1b, e MCP-1 retornaram aos níveis observados nos controles. Neste estudo, portanto, IL-6, IL-8 e MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , a diminuição de RANTES e possivelmente IL-1RA foram marcadores associados à fase crônica, porém sem avaliação de correlações com características clínicas da doença ([107](#)).

Ainda em 2011, Chow et al. ([118](#)) em Singapura, acompanhando pacientes com CHIK aguda hospitalizados, todos com PCR positivo. Foi realizada dosagem de citocinas seriadamente nas fases aguda e subaguda, comparando os resultados com os de 8 indivíduos saudáveis. Apenas 4 pacientes mantiveram sintomas persistentes até o fim da fase subaguda (2-3 meses), dificultando a avaliação. Não foram detectados IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-10, IL-13, TNF- α e VEGF nas 4 avaliações. Na fase aguda ocorreu aumento de IFN- α , IL-1Ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, e IL-15. Na fase de recuperação (~10d) IL-2R, IL-4, eotaxina, HGF, FGF-basic, G-CSF, MIG e MIP-1 α se mostraram elevados. Ao redor de 4-6 semanas após início do quadro, ocorreu elevação de RANTES e EGF. Em 2-3m após o início do quadro foi encontrado apenas o aumento de IL-17. IP-10, MCP-1, IFN- α , IL-12, IL-1Ra e IL-6 se correlacionaram fortemente com a carga viral, enquanto a IL-15 apresentou correlação mais fraca. IL-6 e GM-CSF foram marcadores de artralgia persistente. Enquanto eotaxina e HGF foram marcadores de recuperação ([118](#)).

Kelvin et al. (2011) ([141](#)), em um surto ocorrido na região de Emilia-Romagna na Itália, dosou IgM, IgG e citocinas de um total de 50 pacientes portadores de CHIK na fase aguda, repetindo em 6 e 12 meses. Na avaliação subsequente em 6 meses, 15 pacientes (30%) encontravam-se assintomáticos, 21 relatavam sintomas leves e 14 pacientes sintomas graves. Em 12 meses o número de assintomáticos havia subido para 34 (68%), com 14 pacientes com sintomas leves e apenas dois pacientes com sintomas graves. No estudo de Kelvin et al. a IL-2 foi similar ao controle em todas as fases, IL-8 permaneceu estável porém mais elevado que os controles em todas as fases e IL-4 permaneceu estável porém abaixo dos controles em todas as fases. Entre os fatores solúveis, MIG, IL-6, MCP-1 e IP-10 foram mais elevadas na fase aguda, com redução nas dosagens subsequentes em 6 e 12 meses. IL-5 foi mais elevada em 6 e 12 meses que na fase aguda e TNF- α , IL-10 e IFN- γ foram similares ao controle na fase aguda elevando-se apenas na dosagem de 12 meses. IL-1 β , IL-12 também se elevaram em relação à fase aguda, porém permaneceram abaixo dos níveis

encontrados nos controles. Os autores relatam IL-1b, TNF- α , IL-12, IL-5, IL-10 e IFN- γ como aumentados na fase de convalescência da doença, contudo nesta análise não estão separados os pacientes que persistiram com sintomas (pacientes crônicos) e os pacientes assintomáticos (recuperados), o que não possibilita a avaliação destas citocinas enquanto marcadores. IP-10 (CXCL10) e IL-10 caíram com a soroconversão, sendo considerados marcadores da fase de viremia. Os autores observaram associação e IP-10, MIG (CXCL9) e IL-6 com níveis séricos elevados de IgG específica. Os autores consideraram IP-10, MIG e níveis séricos de IgG específica como marcadores de gravidade da doença crônica na avaliação de 6m ([141](#)).

Kam et al. (2012) ([120](#)) analisou 30 pacientes hospitalizados, encontrando que a produção precoce de IgG3 conferiu proteção contra artralgia persistente, enquanto a demora para o início da produção de IgG3, associado à carga viral baixa aumentaram o risco de artralgia persistente. Contudo, do mesmo modo que em Chow et al. ([118](#)) as análises são prejudicadas pela avaliação relativamente precoce da persistência dos sintomas (2-3 meses) e pela casuística baixa (30 pacientes no total) e pelo baixo número de indivíduos com sintomas crônicos (4 pacientes).

Schilte et al. ([86](#)), em um trabalho realizado entre pacientes de uma coorte de 180 pacientes das Ilhas da Reunião, publicado em 2013, dosaram os mediadores inflamatórios solúveis, proteína C reativa, anti-dsDNA, anti-endomísio, anti-CCP e crioglobulinas em 22 pacientes com artralgia persistente e 22 indivíduos recuperados, 36 meses após o quadro inicial, encontrando aumento discreto de proteína C reativa, fator VII, fração C3 do complemento, e mais acentuados de IL15 e IL-1 α . A ferritina foi mais baixa no grupo com persistência dos sintomas articulares. Não foram realizadas dosagem em outros momentos. Não houve comparação com controles saudáveis, limitando seu uso como marcador.

Em um estudo comparando o uso de cloroquina (38 pacientes) e meloxicam (32 pacientes), Chopra et al. ([204](#)) avaliaram proteína C reativa, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IP-10, e IL-13 após 31 dias, 16 semanas, e 28 semanas de doença. Encontraram aumento persistente de IL-6, e aumento de TNF- α , IP-10 e IL-13 na avaliação inicial, com queda com 24 semanas, porém com manutenção em níveis mais elevados que nos controles. Não foi encontrado aumento de IFN- γ . Exceto para IL-6, que foi mais alto no grupo com cloroquina, não houve diferença nas citocinas em relação ao tratamento.

Em 2018, Chang et al publicaram 2 artigos avaliando citocinas em pacientes com sintomas crônicos de CHIK ([150](#), [205](#)). No primeiro deles, realizado entre pacientes da Colômbia, em um estudo desenhado para avaliar a presença de RNA viral no líquido sinovial de pacientes crônicos, foram dosados IFN α 2a, proteína C reativa, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IL-1 α , IL-12/23p40, IL-15, IL-17A, eotaxina, MIP-1 β , IP-10, MIP-1 α , e MCP-1 no soro de 33 paciente e de 10 controles saudáveis, em média 22 meses após a infecção aguda, foi observada discreta elevação de IL6, IL-8, IL12p70, MCP-1, e MIP-1 β , sem contudo alcançar significância estatística em relação a controles ([150](#)).

Em um segundo estudo também realizado na Colômbia, Chang et al. (2018) ([205](#)), avaliam o perfil de citocinas na fase aguda (IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-12p70, IL-13, IL-17, IL-2, IL-4, e IL-5) em 242 pacientes, dos quais 121 evoluíram com sintomatologia crônica osteoarticular e 121, sem sintomas articulares, 20 meses após o quadro agudo de CHIK (coleta de dados por entrevista telefônica). Não foram incluídos controles saudáveis. Todas as citocinas se correlacionaram negativamente com dor articular na fase crônica, ou seja, quanto menor a resposta inflamatória sinalizada pela elevação de citocinas na fase aguda, maior o risco de evolução de sintomas crônicos. Os autores desenvolveram um modelo preditivo do risco de artropatia crônica combinando TNF α , IL-13, IL-2 e IL-4, de alta acurácia (área abaixo da curva 0.88).

Em outro estudo avaliando o uso da Cloroquina no tratamento da CHIK, Roques et al. (2018) ([206](#)) mensuraram GM-CSF, TGF α , G-CSF, IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-10, IL-15, sCD40L, IL-17, IL-1Ra, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, MIP-1 α , MCP-1, TNF- α , MIP-1 β , IL-12–23(p40), IL-18, eotaxina, GM-CSF, IFN α 2, IL-12(p70), e IP-10 na fase aguda. Pacientes que evoluíram para cronicidade apresentaram níveis mais elevados de TNF- α no início e ao longo da fase aguda em relação a quem evoluiu para resolução. Não houve grupo controle de indivíduos saudáveis, limitando a avaliação das citocinas, uma vez que não era o objetivo do estudo.

Ninla-aesong et al (2019) ([207](#)) realizaram na Tailândia um estudo que acompanhou pacientes portadores de CHIK por 5 anos, incluindo 63 pacientes com artralgia persistente (dos quais 51 - 80.9% - com dor intensa, e 12 - 19.05% - com sintomas leves), 30 indivíduos assintomáticos, com completa recuperação e 30 controles saudáveis. Foram mensurados IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, TGF- β , MCP-1, RANTES, MMP-1, e MMP-3. Entre estes, IL-1b, IL-6, IL-

8, MCP-1, MMP-1 e MMP-3 aumentaram nos pacientes com quadro crônico, quando comparado a controles. E quando o grupo de comparação foi o de indivíduos recuperados só encontraram aumento de TNF- α , MMP-1 e MMP-3. Neste grupo, paradoxalmente, o TNF- α (bem como RANTES) foi mais elevado nos pacientes com artralgia leve que nos pacientes com artralgia intensa. No grupo que se recuperou completamente TNF- α , IL-1 β , IL-8, e MCP-1 se demonstraram mais elevados. Não houve diferença de IL-4, IL-10, IL-12, IL-17A, e RANTES entre os três grupos. IL-12 e MCP-1 foram mais elevados nos pacientes com artralgia intensa do que nos com artralgia leve. Neste estudo, TNF- α , MMP-1 e MMP-3 foram os principais marcadores de doença crônica, assim como IL-12 e MCP-1 podem ser considerados marcadores de gravidade da doença crônica.

Além dos mediadores inflamatórios solúveis, alguns resultados de exames utilizados na rotina de avaliação clínico-laboratorial da doença, como proteína C reativa ([72](#), [86](#)), ferritina ([77](#)), e Imunoglobulina específica ([72](#), [86](#), [141](#)), também foram definidos como marcadores prognósticos.

O Quadro 3 revisa os principais fatores solúveis com potencial para utilização como biomarcadores na Febre de Chikungunya.

Quadro 3 - Possíveis biomarcadores em Chikungunya, de acordo com a fase da doença

Fator solúvel	Fase aguda (predominância resultados / em relação a controles)	Recuperação (predominância resultados / em relação a controles)	Fase crônica (predominância resultados / em relação a controles)	Biomarcador	
IgM	Ausente em controles Aumentado a partir da 1ª semana de doença	Ausente em controles Aumentado	Ausente em controles Aumentado ou ausente em pacientes	Associação de IgM precoce persistente + IgG baixa + resposta Th2 aumentada na fase aguda da doença marcador cronicidade	Venugopalan, 2014
Título IgG	Ausente em controles Aumentado a partir da 2ª semana de doença ou ausente	Ausente em controles Aumentado	Ausente em controles Aumentado em pacientes	Intensidade sintomas crônicos Mais alto nos pacientes crônicos com artralgia persistente, sem correlações A falta de positividade para IgG foi preditor de cronicidade	Kevin, 2011 Schilte, 2013 Venugopalan 2014
IgG3 específico	Ausente em controles Aumentado a partir da 2ª semana de doença ou ausente	Ausente em controles Aumentado ou ausente	Ausente em controles Ausente ou pouco elevado em pacientes	O aumento precoce de IgG3 é marcador de recuperação	Kam, 2012 – só 4 pacientes crônicos
IFN gama	n		Aumentada 12m (só)	Cronicidade - sem correlação com intensidade dos sintomas Correlação c/ intensidade dor na coorte (6-22m)	Kevin, 2011 Venugopalan, 2014
TNF Alfa	aumentada		Aumentada 6m 12m (mais-progressivo)	Cronicidade – sem correlação com intensidade dos sintomas crônicos > recuperados na coleta inicial (estudo sem controle)	Kevin, 2011 Roques, 2018

IL-12	Aumentada (mais elevada nos que ficaram crônicos)	baixa	aumentada	Cronicidade	Hoarau 2010 a c
IL-1β,	Aumentada	n	Aumentada (só kevin)	severidade- fase aguda crônica (sem rel com sintomas (kevin)	Ng et al. 2009 a (baixa) Kevin, 2011 a c Venugopalan 2014 c
IL1 alfa			aumentada	Correlação com nível de dor- possível marcador de cronicidade	Schilte, 2013
IL-8	Aumentada (pouco) Diminuído	Aumentada pouco	Aumentada (muito)	cronicidade	Chaaityanya, 2011 Kevin2011 a c Lohanachakul a
IL-6	aumentada		Aumentada (kevin n encontrou aum. Crônico)	severidade- fase aguda Cronicidade (artralgia persistente Associação com DAS28 cronicidade	Ng et al. 2009 a Chaaityanya, 2011 a c (não avalia como marcador) Chow et al. 2011 -4 pac c Sepulveda-Delgado, 2017 c Lohachanakul, 2012 ag Chopra, 2014 (n avalia como marcador, só aum agudo e cron) Venugopalan 2014
IL-4	diminuída		diminuída		Kevin, 2011
IL-5	Não aumentada	aumentada	n	recuperação	Chaaityanya, 2011
IL-13	alto		Alto (baixou em relação a fase aguda	Não fez correlação clínica	Chopra, 2014
IL-15			aumentada	elevado nos pacientes crônicos, sem correlações	Schilte, 2013
IL-17	n	n	Aumentada (2-3m)	cronicidade	Chow, 2011
IL1RA	Aumentada	n	aumentada	cronicidade	Chaaityanya, 2011 a c
RANTES	Diminuído	n	Diminuído (Chaitanya)	Diminuição assoc. com Severidade - fase aguda Cronicidade	Ng et al. 2009 a Chaitanya, 2011 a c
MCP-1 CCL2	Aumentada (pouco) Aumentada	n	Aumentada (muito) N - kevin	Cronicidade	Chaaityanya, 2011 m Kevin 2011 só fase aguda Lohachanakul, 2012 a sub
Eotaxina	n	aumentada	n	recuperação	Chow, 2011
CxCL10	Aumentada (muito)	n	Aumentada 6 e 12m Alto 24s (baixou em rela a fase aguda)	Soroconversão (cai) Cronicidade Intensidade sintomas crônicos	Kevin, 2011 Cropra 2014 (não avalia correl sintomas-aumento agudo e crônico)
CxCL9	Aumentada (mais)		Aumentada 6m (caindo em rel a fase aguda)	Correl com intensidade dos sintomas (mas ã é bom marcador, visto que cai com a cronicidade)	Kevin, 2011
MIP-1a	n	diminuído	Aumentada	cronicidade	Chaaityanya, 2011
MIP-1b	n	n	Aumentada	cronicidade	Chaaityanya, 2011
GM-CSF			Aumentada	Cronicidade (3m) – (apenas 4 pacientes)	(Chow et al. 2011). A c
HGF	n	aumentada	n	recuperação	Chow, 2011
FR	10/10 0/20 0/70 5/110	n	10/10 0/70	Negativou após melhora nos subagudos (SD2017)	Sepulveda-delgado 2017 Manimunda, 2010 Chopra, 2014 Venugopalan 2014 Anfasa 2017 Chang, 2018

	0/77 3/33 (IgM) 4/33 (IgG)				
Anti CCP	1/20 0/40 0/70 0/110 0/77 0/33	n	n		Manimunda, 2010 Schilte, 2013 Chopra, 2014 Venugopalan, 2014 Anfasa 2017 Chang 2018
FAN	Neg 70p (chopra) 2/45 (agudo+subagudo)		+tit baixos 4/40pactes, s/correlações(sc hilte) Neg 70p (chopra) 3/65		Schilte 2013 Venugopalan, 2014
Anti DNA	n	n	Neg 40pac		Schilte, 2013
Anti endomísio	n	n	Neg 40pac		Schilte, 2013
Crioglobulinas	n	n	Neg 40pac		Schilte, 2013
Ferritina	elevado	n	n	Preditor de cronicidade (>3m)	Anfasa, 2017
PCR	elevado	= ou pouco elevado	Pouco alto (<agudo)	Mais alto nos pacientes crônicos que tinham artralgia preditor	Schilte, 2013 Venugopalan

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil sérico de citocinas e de galectinas em pacientes com acometimento musculoesquelético nas fases subaguda e crônica da artropatia pós Chikungunya, comparando com o perfil de produção de citocinas em indivíduos do grupo controle.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença das citocinas IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27 e IL-29, TGF- β , IL-8 e galectinas 1, 3, 4, 7 e 9 em pacientes acometidos de Febre Chikungunya comparando com seus níveis em indivíduos do grupo controle.
- Avaliar as relações entre os níveis séricos das citocinas e galectinas estudadas (IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27 e IL-29, TGF- β , IL-8 e galectinas 1, 3, 4, 7 e 9) com as fases crônica e subaguda em pacientes acometidos de Febre Chikungunya.
- Verificar a presença de relações entre os níveis séricos de citocinas e de galectinas estudadas (IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27 e IL-29, TGF- β , IL-8 e galectinas 1, 3, 4, 7 e 9) e os indicadores de atividade e de gravidade de

doença, nas fases subaguda e crônica da doença, como número de articulações acometidas e índices de dor.

- Avaliar a presença de anticorpos específicos contra o vírus Chikungunya das classes IgM e IgG, relacionando com tempo de duração dos sintomas.
- Verificar a presença de relações entre a presença de anticorpos específicos contra o vírus Chikungunya das classes IgM e IgG e os níveis séricos de citocinas e de galectinas.

3. METODOLOGIA

3.1 TIPO, LOCAL DE ESTUDO E TÉCNICA DE AMOSTRAGEM

Estudo de corte transversal, observacional aninhado em estudo caso controle, realizado no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas (HC) - Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em colaboração com o Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (NUPIT SG) e Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT).

A amostra foi selecionada por conveniência, e durante um período de 12 meses foram incluídos todos os pacientes atendidos no ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE, desde que preenchessem os critérios de inclusão e exclusão.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

3.2.1 Critérios de Inclusão – Grupo CHIK (todos necessários)

- Idade acima de 18 anos
- Critérios Clínicos / Laboratoriais: História prévia de febre de início súbito maior que 38,5°C e artralgia ou artrite intensa com início agudo, não explicada por outras condições, podendo estar associados à cefaleia, mialgia e exantema e sorologia positiva para Chikungunya (IgM e/ou IgG)
- Critérios Epidemiológicos: Residir ou visitar áreas endêmicas ou epidêmicas até duas semanas antes do início dos sintomas; ou residir ou ter visitado, durante o período de transmissão/viremia, áreas onde há registros de casos suspeitos ou confirmados.

3.2.2 Critérios de inclusão – grupo controle

- Idade acima de 18 anos

- Definição de Controle: Indivíduos assintomáticos, sem história prévia nos últimos 6 meses de quadro febril agudo – os indivíduos do grupo controle foram retirados de um banco de amostras coletadas 6 meses anteriormente ao início do surto de Chikungunya no país.

3.2.3 Critérios de exclusão – grupo CHIK e grupo controle

- Presença de doenças agudas ou crônicas de caráter inflamatório, infeccioso ou história atual ou pregressa de neoplasias.
- Uso de corticosteroides no período de 7 dias antecedentes à coleta.

3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA INICIAL E ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DO PACIENTE

A partir da seleção, os pacientes elegíveis foram convidados a participar do estudo, e após assinatura do assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), foi realizado o preenchimento da ficha clínica para inclusão no estudo, contendo dados sobre a história clínica e exame físico, antecedentes e uso de medicações (APÊNDICE B).

3.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO

3.4.1 Variáveis dependentes e definição operacional

- IgG sérica específica Titulação
- IgM sérica específica Titulação
- Níveis séricos de GALs Titulação
1, 3, 4, 7 e 9
- Níveis séricos de Titulação
Interleucinas (IL)-17A,
IL-8, IL-21, IL-22, IL-27,
IL-29, TGF β

3.4.2 Variáveis independentes e definição operacional

- Tempo de doença Semanas
- Quadro subagudo > 2 semanas, < 12 semanas
- Quadro crônico > 12 semanas

- Artralgia Presença de dor articular atual, sem sinais inflamatórios
- Artrite Presença de dor articular atual acompanhada de sinais inflamatórios
- Artrite atual Presença ou ausência
- Número de articulações acometidas Ao exame físico
- Tempo de sintomatologia articular Em semanas
- Padrão de acometimento articular Monoarticular, oligoarticular, poliarticular – de acordo com a história clínica
- Comprometimento das atividades cotidianas Deixou de realizar atividades do dia-a-dia devido à Chikungunya – sim ou não
- Dias de comprometimento das atividades cotidianas e/ou laborais Variável contínua, em dias completos
- Comorbidades Variável dicotômica – sim ou não
- Tabagismo Atual, inativo ou nunca fumou.
- Carga tabágica Definida como o número de cigarros consumidos por dia, dividido por 20 (1 maço = 20 cigarros) e multiplicado pelo número de anos em que o paciente fumou
- Etilismo 15 doses/semana para os homens e 10 doses/semana para mulheres -Uma dose equivale a aproximadamente 285 ml de cerveja, 120 ml de vinho e aproximadamente 30 ml de destilado (whisky, vodka, cachaça).
- Intensidade da dor inicial No momento do aparecimento do quadro articular – mensurada por escala visual analógica, de 0 a 10 (0 sem dor; 10 a pior dor possível)
- Intensidade da dor atual No momento da inclusão no estudo – mensurada por escala visual analógica, de 0 a 10 (0 sem dor; 10 a pior dor possível)

- Rigidez pós repouso Presença ou ausência (dicotômica); tempo até melhor máxima (contínua); intensidade (avaliada por escala visual analógica, de 0 a 10 - 0 sem rigidez; 10 a pior rigidez possível)

3.5 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Após a avaliação clínica, foi realizada a coleta de sangue em veia periférica (30 ml) para avaliação laboratorial. Em seguida, o sangue foi centrifugado, separado em alíquotas em tubos Eppendorf, e armazenado em freezer a -80°C, para posterior análise.

Foram realizados no LINAT, de acordo com as técnicas padronizadas:

Sorologia para Chikungunya IgG e IgM – ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*)

Dosagem sérica de citocinas IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27 e IL-29, TGF- β , IL-8 – ELISA

Dosagem sérica das GALs 1, 3, 4, 7 e 9 - ELISA.

3.5.1 Técnicas

3.5.1.1 ELISA

As citocinas e galectinas presentes no soro dos pacientes e dos controles foram quantificadas por técnica de ELISA, seguindo-se o protocolo recomendado pelos fornecedores. Placas de poliestireno EIA/RIA de 96 poços (Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram sensibilizadas *overnight* a -4°C com o anticorpo policlonal de captura, específico para a citocina/ galectina estudada, seguido por bloqueio dos sítios inespecíficos com albumina sérica bovina (BSA) a 1%. Os padrões das citocinas/ galectinas estudadas em diluições sequenciais de concentrações conhecidas e as amostras (os soros dos pacientes e controles) foram então apostos, com incubação de 4h. O anticorpo de detecção – imunoglobulina da classe IgG específica para a citocina/ galectina estudada, conjugado com enzima e seu substrato (HRP-avidina e tetrametilbenzidina – TMB, respectivamente) – foi então adicionado. Entre cada fase, lavagens sequenciais são realizadas para retirada de resíduos não conjugados. Após o tempo de reação colorimétrica, esta é interrompida pela adição de H₂SO₄ – ácido sulfúrico e procedeu-se à leitura em leitora de ELISA BioteK, ELx808 com absorbância de 450 e 570nm, com posterior cálculo das concentrações das citocinas/ galectinas

por regressão logística de acordo com o padrão utilizado de diluições sequenciais com concentrações conhecidas.

A detecção de anticorpos específicos para o CHIKV (Euroimmun) foi realizada com protocolo específico para os kits de ELISA, segundo recomendações do fabricante. Os kits utilizados e seus respectivos limites de detecção seguem descritos no quadro 4.

Quadro 4: Citocinas avaliadas no soro através da técnica ELISA, fabricantes e limites de detecção

CITOCINA/GALECTINA	FABRICANTE	LIMITES DE DETECÇÃO
IL-22	Ebioscience	7,82 – 1000 pg/ml
IL-21	Ebioscience	15,63 – 2000 pg/ml
IL-27	Ebioscience	62,5 – 8000 pg/ml
IL-29	Ebioscience	7,82 – 1000 pg/ml
TGF- β	Ebioscience	7,82 – 1000 pg/ml
IL-8	Invitrogen	250- 1.953.125,0
IL-17A	eBioscience	3,91-500 pg/ml
GAL-7	R&D	93,8 – 6000 pg/ml
GAL-3	R&D	31,25 – 4000 pg/ml
GAL-1	R&D	156,25 – 20000 pg/ml
GAL-4	R&D	15,625 – 2000pg/ml
GAL-9	R&D	156 – 10000 pg/ml
SOROLOGIA		
IgM	Euroimmun	Semiquantitativo
IgG	Euroimmun	Semiquantitativo

3.6 ESTATÍSTICA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

O software utilizado para realização de análises estatísticas foi o Graphpad Prisma versão 6.0. A expressão dos resultados das variáveis contínuas foi feita através de média e desvio padrão para os dados paramétricos e para a mediana, e variância interquartil para os dados não paramétricos. A avaliação da normalidade foi realizada através do *D'Agostino-Pearson omnibus test* e confirmado pelo teste de *Shapiro-Wilk test*. Para verificação de possíveis diferenças entre as médias foram utilizados o teste “t” *Student* para amostras independentes, quando a distribuição foi gaussiana. Nos casos em que o conjunto amostral não passou no teste da

normalidade, foi usado o teste “t” não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Associação entre duas variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Spearman, sendo considerada correlação negligenciável quando r foi menor ou igual 0,1, fraca entre 0,1 e 0,39, moderada se acima de 0,4 e menor ou igual a 0,69, forte quando maior que 0,7 e muito forte quando entre 0,9 e 1,0 ([208](#)).

3.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo é um subgrupo de estudo dos pacientes do HC-UFPE da coorte CHIK Brasil, em um projeto intitulado “Marcadores moleculares nas manifestações MUSCULOESQUELÉTICAS crônicas da febre chikungunya”, aprovado no comitê de ética (CEP/HC/UFPE) de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, registrado sob o CAE 21656919.9.0000.8807, parecer número 3.625.247, de 07 de outubro de 2019.

Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram TCLE (APÊNDICE A), conforme exigência da referida resolução. As coletas do sangue foram realizadas por profissionais devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Os participantes do estudo foram submetidos a uma consulta médica de rotina, sendo a ficha clínica preenchida neste momento. As informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora principal, no serviço de reumatologia do HC-UFPE (Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Recife – PE, sala 133), pelo período de 5 anos.

Foram considerados riscos diretos para o voluntário os relacionados ao constrangimento ao ser realizada a entrevista e o desconforto causado por um tempo mais prolongado de atendimento no dia da inclusão no estudo. Para minimizar estes riscos, as entrevistas foram realizadas por um único pesquisador, em uma sala reservada, com ar condicionado. O desconforto relacionado à coleta de sangue em veia periférica e possibilidade de equimose na região da coleta, o que foi minimizado pela realização do procedimento por indivíduos treinados e utilização de aparato adequado.

Os benefícios diretos e indiretos para os voluntários foram o atendimento, tratamento e acompanhamento médico durante todo o período da participação no estudo, além do auxílio à compreensão das manifestações reumatológicas associadas à infecção pelo CHIKV, com possível benefício a pacientes futuramente afetados.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL CLÍNICO-DEMOGRÁFICO DOS PACIENTES COM FEBRE DE CHIKUNGUNYA

Foram avaliados 45 pacientes maiores que 18 anos, com manifestações articulares da CHIK, sendo 24 na fase subaguda (3-12 semanas) e 21 na fase crônica (>12 semanas), todos com confirmação sorológica anti-CHIKV IgM e IgG realizada por ELISA (Euroimmun), e 49 controles, pareados por idade e sexo. Foram excluídos indivíduos com queixas musculoesqueléticas prévias ao quadro viral agudo. As amostras sorológicas foram coletadas no período entre abril de 2016 e fevereiro de 2017.

Trinta e seis (80,0%) pacientes eram do sexo feminino, com média de idade global de 55,2 ($\pm 13,8$), e média de anos de idade para os pacientes da fase subaguda 54,3 ($\pm 14,6$), e 56,1 ($\pm 13,1$) anos para os da fase crônica. Entre os pacientes 44,44% tinha hipertensão, sendo 50,0% no grupo com doença subaguda, e 38,1% no grupo crônico. O diagnóstico prévio de Diabetes Mellitus (DM) foi encontrado em 17,77% dos pacientes, sendo 16,66% no grupo subagudo e 19,05% no grupo crônico. Do total de pacientes 11,1% eram tabagistas ativos, sendo 4,1% no grupo dos subagudos e 19,05% no grupo dos crônicos.

Quarenta (90,9%) pacientes mantinham queixas de artralgia no momento da avaliação, dos quais 79,16% no grupo subagudo e 100% dos crônicos. Vinte e um pacientes (46,66%) apresentavam edema em pelo menos uma articulação ao exame físico, sendo 75,0% no grupo subagudo e 61,9% no grupo crônico. Dezesete pacientes (37,77%) apresentavam queixas compatíveis com dor neuropática, com DN4 ≥ 4 , sendo 37,5% entre os subagudos e 38,09% entre os crônicos. Nenhum dos pacientes apresentava quadro de acometimento de SNC.

Em relação ao uso de medicações, entre os subagudos 37,5% estavam utilizando e 50,0% já haviam utilizado AINH. Entre os crônicos 42,85% estavam em uso atual de AINH e 66,66% já haviam utilizado essa medicação previamente.

Em relação ao uso de corticosteroides, foi utilizado em algum momento da evolução por 75,0% entre os subagudos e 76,19% entre os crônicos. Nenhum paciente estava em uso de corticosteroides no momento da coleta, há pelo menos uma semana.

Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com manifestações articulares e dos indivíduos controle estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínico-epidemiológicas de pacientes com Febre de Chikungunya (CHIK) e controles.

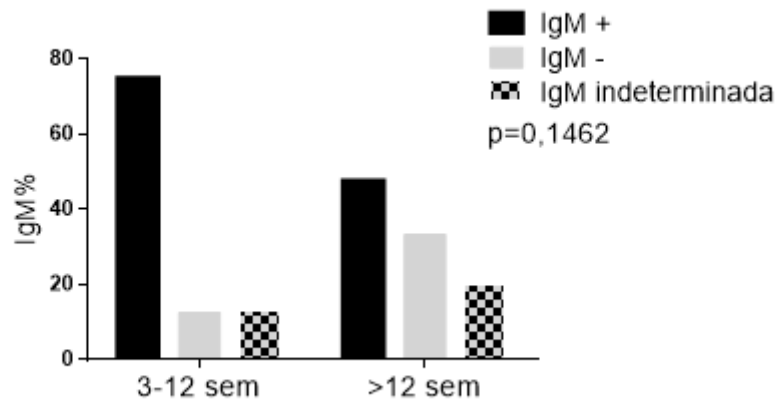
Características	Pacientes com CHIK fase subaguda	Pacientes com CHIK fase subaguda	Pacientes com CHIK fase crônica	Controles
n	45 (100%)	24 (53,33%)	21 (46,67%)	49
Sexo Feminino, n(%)	36 (80,0%)	21 (87,5%)	15 (71,43%)	37 (74,51%)
Idade (media $\pm$ DP, anos)	55,2 $\pm$ 13,8	54,3 ($\pm$ 14,6)	56,1($\pm$ 13,1)	51 $\pm$ 8,95
Duração da doença (semanas)*	12 (8,5-20)	9 (6-11)	20 (15,5-27)	
IgG +, n(%)	45 (100%)	24 (100%)	21 (100%)	
IgM +, n(%)	28 (62,22%)	18 (75,0%)	10 (47,62%)	
Queixa de artralgia	40 (90,9%)	19 (79,16%)	21 (100%)	
Dor neuropática (DN4 $\geq$ 4)	17 (37,77%)	9 (37,5%)	8 (38,09%)	
N de articulações edemaciadas	2 (0-3,5)	2,0 (0,25-4,0)	2 (0-3,0)	
*,**				
N de articulações dolorosas ***	8 (3-21,5)	6,5 (1,25-24,5)	10 (5-13,5)	
Uso corticoide prévio	34 (75,0%)	18 (75,0%)	16 (76,19%)	
Uso AINH prévio	28 (62,22%)	12 (50,0%)	14 (66,66%)	

*Mediana / variação interquartil. ** Ao exame físico; AINH – Antiinflamatório não hormonal; DP: desvio padrão

4.2 IMUNOGLOBULINAS ESPECÍFICAS

Todos os pacientes do grupo CHIK, independente da fase da doença foram positivos para IgG. Do total de pacientes, 62,22% foram positivos para IgM, com maior frequência de positividade nos casos subagudos (75,0%) que nos crônicos (47,62%), porém sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,061$). Houve uma maior frequência tanto de negativos quanto de indeterminados nos pacientes da fase crônica (Figura 8), sem diferença estatisticamente significativa quando analisados os 3 grupos em conjunto ($p=0,1462$).

Figura 8. Distribuição de frequências de resultados da sorologia IgM (ELISA) de acordo com a fase da doença



Sem: duração em semanas; IgM +: pacientes com sorologia IgM positiva, IgM -: pacientes com IgM negativo.

n total=45; 3-12 sem n= 24; >12 sem n=21

Análise por tabela de contingência – comparação 3-12 sem x >12 sem.

Significância estatística $p < 0,05$

4.3 ANÁLISE CITOCINAS

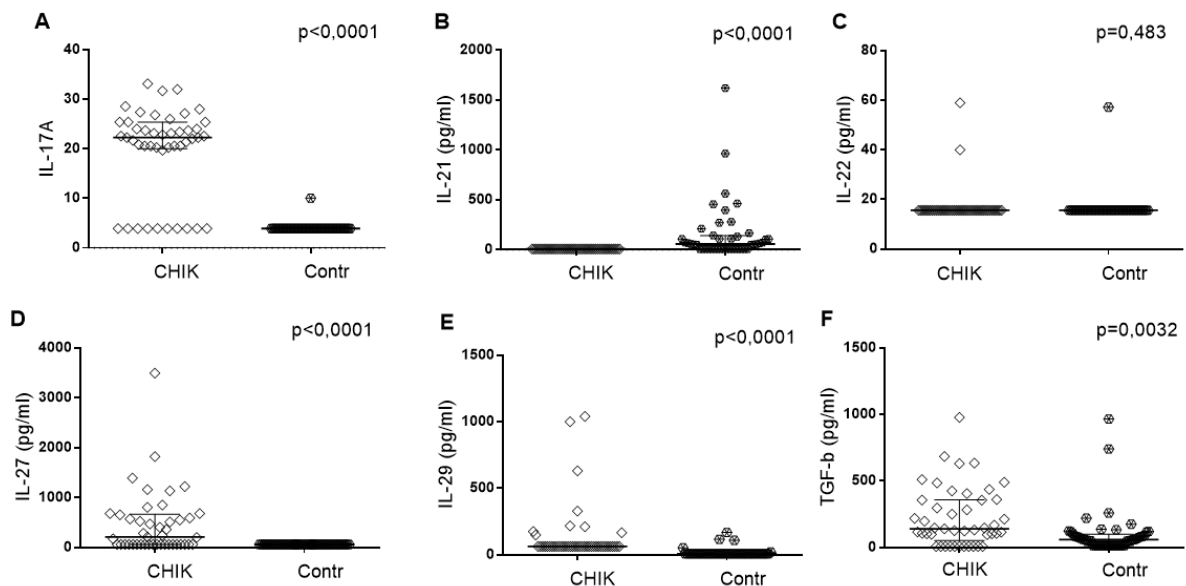
4.3.1 Níveis séricos de citocinas em pacientes Chikungunya e controles

Elevações nos níveis de IL-27, IL-17A, IL-29, e TGF- β foram detectadas na maioria dos pacientes acometidos por CHIK, com diferença estatística significativa em relação aos controles (Figura 9). A IL-21, ao contrário, foi detectada apenas nos indivíduos saudáveis, não acometidos por CHIK. Não observamos diferença entre pacientes e controles em relação à IL-22. Os resultados detalhados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Níveis séricos de IL-17-A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29 e TGF- β (pg/ml) em pacientes acometidos por CHIK (n=45) e controles

	CHIK mediana pg/ml	CHIK variância interquartil	Controles mediana pg/ml	Controles variância interquartil	p
IL-17A	22,29	20-25,43	3,91	3,91-3,91	< 0,0001
IL-21	7,81	7,81-7,81	57,17	7,81-140,1	< 0,0001
IL-22	15,63	15,63-15,63	15,63	15,63-15,63	0,4825
IL-27	210,0	62,5-667,5	62,5	62,5-62,5	< 0,0001
IL-29	62,5	62,5-1040,0	7,81	7,81-7,81	< 0,0001
TGF- β	140,4	52,61-358,4	59,0	15,63-100,0	0,0032

Figura 9: Níveis séricos mensurados por ELISA de IL-17-A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29 e TGF- β em pacientes e controles



CHIK - pacientes portadores de chikungunya

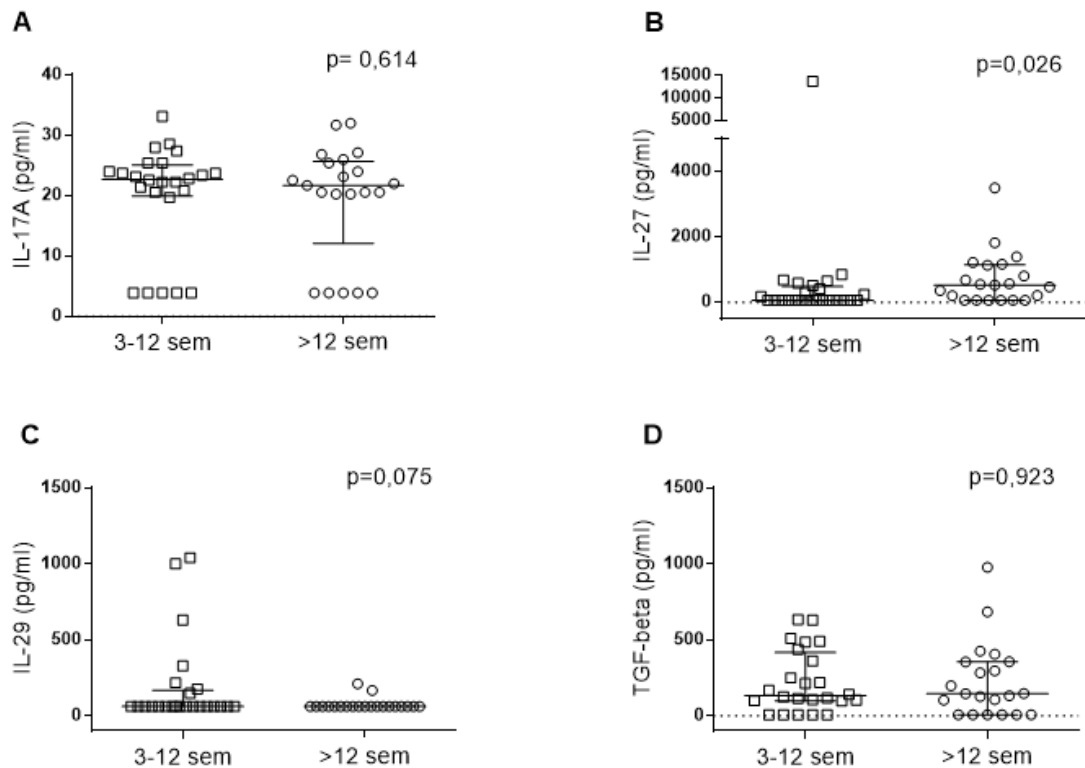
Contr - controles

IL-17-A (A), IL-21 (B), IL-22 (C), IL-27 (D), IL-29 (E) e TGF- β (F), mensurados por ELISA

4.3.2 Tempo de doença e níveis de citocinas

Para investigar a associação entre a fase da apresentação clínica da doença e os níveis de citocinas, os pacientes foram estratificados nas fases subaguda (3-12 semanas) ou crônica (>12 semanas). Encontramos diferença estatisticamente significativa apenas para IL-27, cujos níveis foram maiores na fase crônica (Figura 10), não houve diferença para as outras citocinas em que foi encontrada expressão. Também foi encontrada correlação positiva moderada entre os níveis da IL-27 e a duração da doença ($r=0,441$ e $p=0,0024$) (Figura 11).

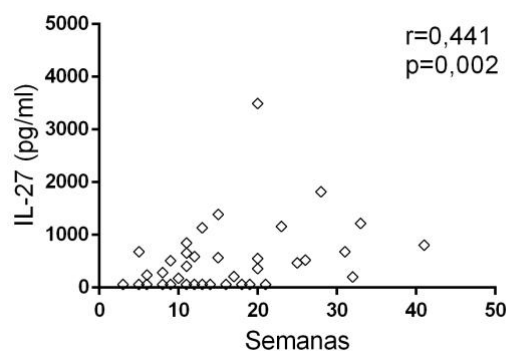
Figura 10. Níveis séricos de IL-17A, IL-27, IL-29 e TGF- β , mensurados por ELISA, por subgrupo de duração da doença.



*subagudo: 3-12 semanas, crônico: >12 semanas.

IL-27 (B), IL-29 (C) e TGF- β (D), mensurados por ELISA

Figura 11. Correlação ente nível de IL-27, mensurado por ELISA, e tempo de doença em semanas

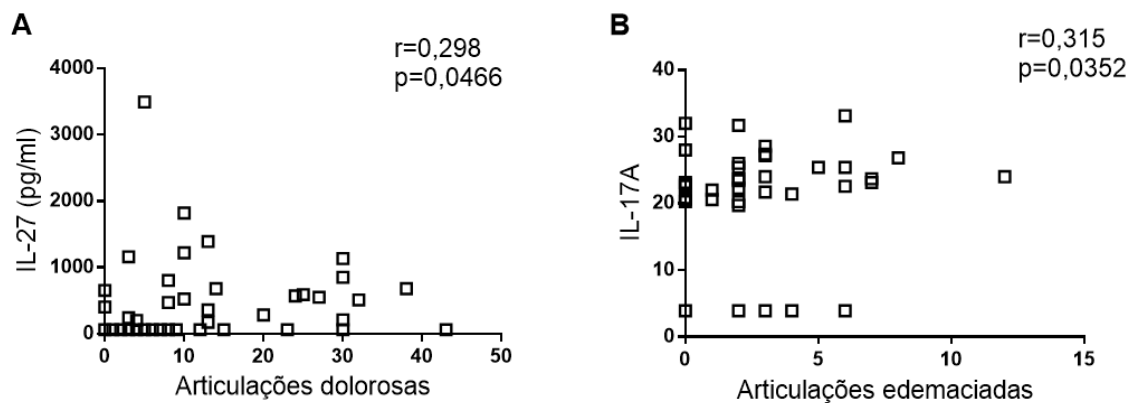


4.3.3 Manifestações clínicas e níveis de citocinas

Houve correlação positiva fraca entre os níveis de IL-27 e o número de articulações dolorosas ($r = 0,298$, $p = 0,0466$). Houve ainda correlação positiva fraca

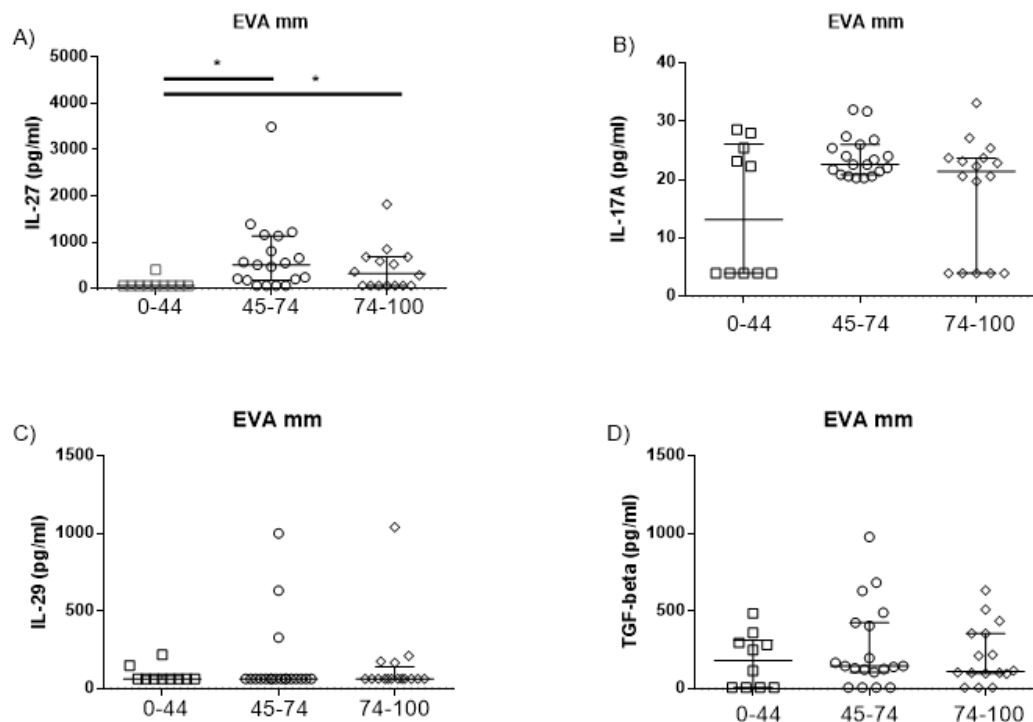
entre IL-17A e o número de articulações edemaciadas ($r=0,315$, $p=0,0352$) (Figura 12). Encontramos associação de IL-27 com o grau de dor medido moderada (45-74mm) e intensa (>75mm) pela escala visual analógica (EVA), o que não foi observado para outras citocinas (Figura 13). Não foram observadas variações nos níveis de citocinas em relação à idade e sexo.

Figura 12. Correlações entre níveis séricos de IL-27 e IL-17^a, mensurados por ELISA, e sintomas articulares em pacientes com CHIK;



(A) Correlação entre IL-27 e dor articular ao exame físico; (B) Correlação entre níveis Séricos de IL-17A e edema articular em pacientes com CHIK;

Figura 13. Níveis séricos de citocinas por subgrupo de intensidade e de dor.



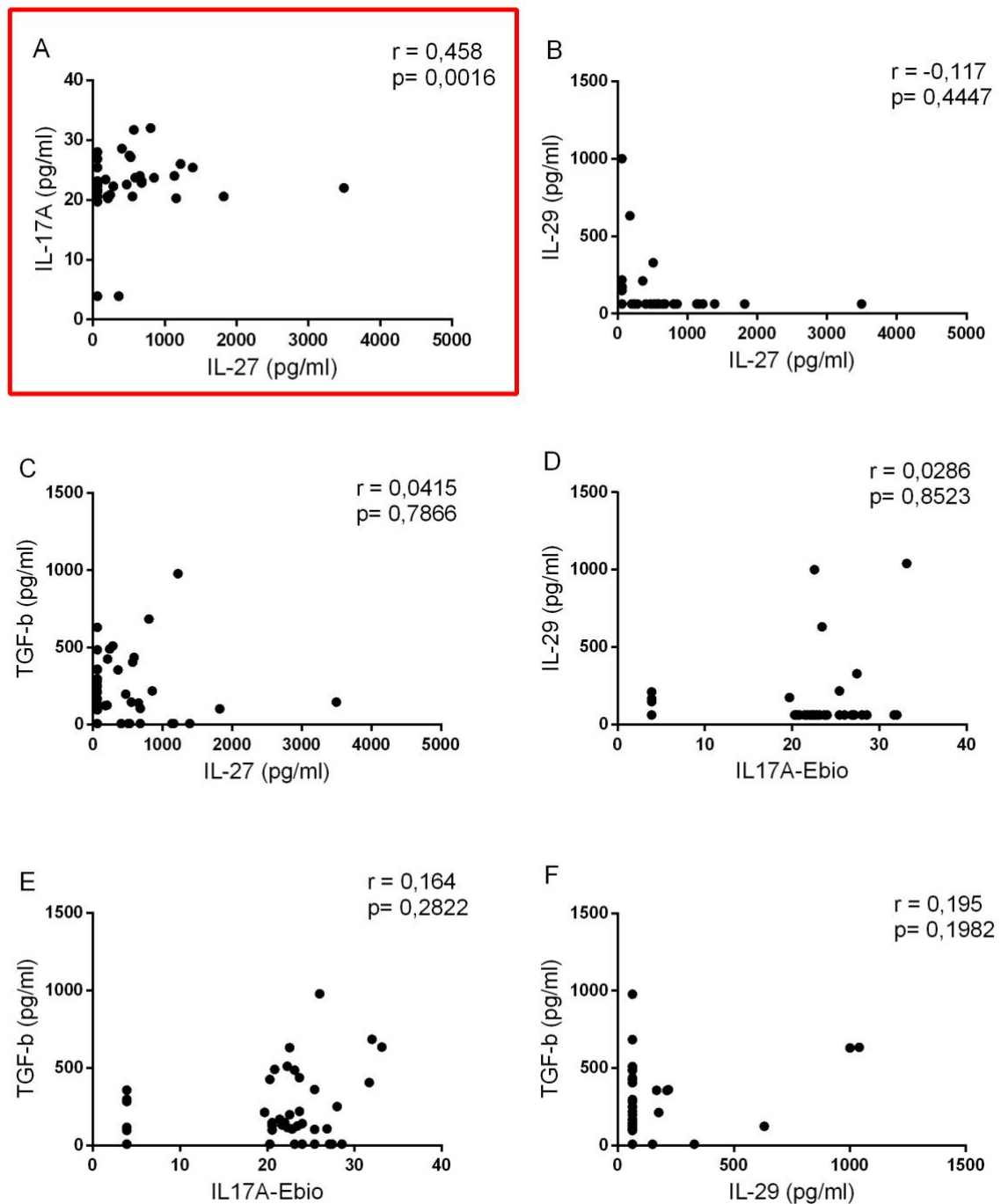
IL-27 (A); IL-17A (B); IL-29 (C) e TGF β (D), mensurados por ELISA.

Intensidade de dor pela escala visual analógica (EVA): 0-44 sem dor ou dor leve, 45-74 dor moderada, 75-100 dor intensa. * $p < 0,01$

4.3.4 Correlação entre citocinas

Encontramos correlação moderada entre IL-17A e IL-27 (Figura 14). Não foram observadas outras correlações ou associações entre as citocinas avaliadas neste estudo.

Figura 14. Correlação entre níveis Séricos de citocinas mensuradas por ELISA em pacientes com CHIK;



CHIK - pacientes portadores de chikungunya

Contr - controles

Correlação entre IL-27 e IL-17A (A), IL-29 (B), TGF-β (C)

Correlação entre IL17A e IL-29 (D)

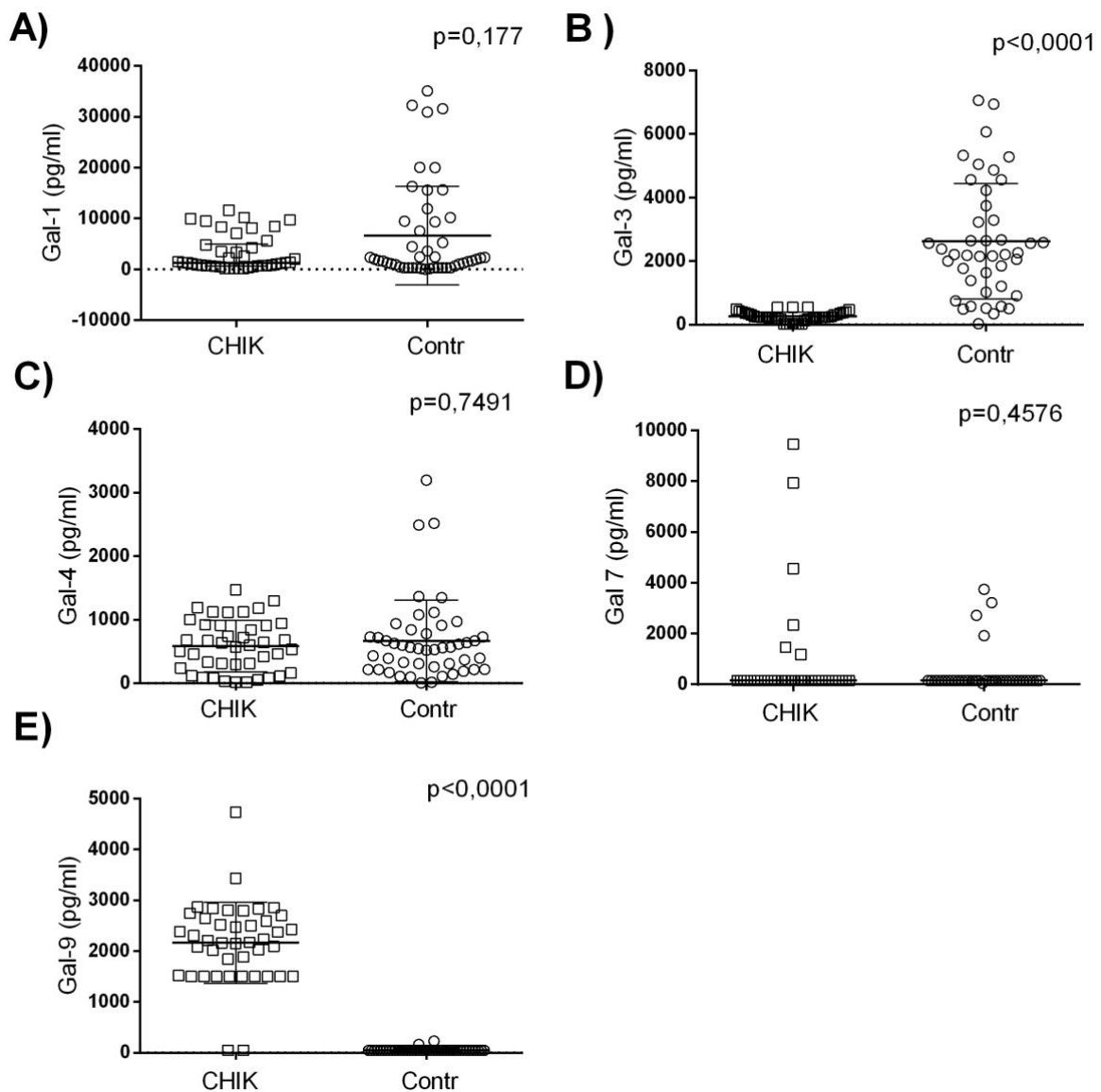
Correlação entre TGF-β e IL-17-A (E), IL-29 (F)

IL-27 (D), IL-29 (E) e (F),

4.4 ANÁLISE DE GALECTINAS

GAL-9 foi detectada na maioria dos pacientes, porém não nos controles. Níveis séricos acima do limite de detecção de GAL-7 foram detectados em apenas 04 pacientes e em nenhum dos controles. Foi encontrada uma redução nos níveis séricos de GAL-3 nos pacientes em relação aos controles. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de GAL-1 e GAL-4 entre pacientes e controles (Figura 15). Os níveis séricos de GAL-1, -4, -7 e -9 estão descritos detalhadamente na Tabela 3.

Figura 15– Níveis séricos de Galectinas em pacientes com artropatia por CHIK e controles (contr).



GALs -1 (A), -3 (B), -4 (C), -7 (D) e -9 (E)

Tabela 3. Níveis séricos de Galectinas -1, -3, -4, -7 e -9 em pacientes com artropatia por CHIK e controles

Galectinas	CHIK mediana pg/ml	CHIK variância interquartil	Controles mediana pg/ml	Controles variância interquartil	p
GAL-1	1226	682,9-4661,0	2003,0	400,5-9846,0	0,1769
GAL-3	235,5	175,5-351,8	2236,0	1256,0-2236,0	< 0,0001
GAL-4	550,0	251,7-910,0	564,5	237,0-887,0	0,7491
GAL-7	156	156-156	156	156-156	< 0,457
GAL-9	2.192	1500-2631	46,88	46,88-46,88	< 0,0001

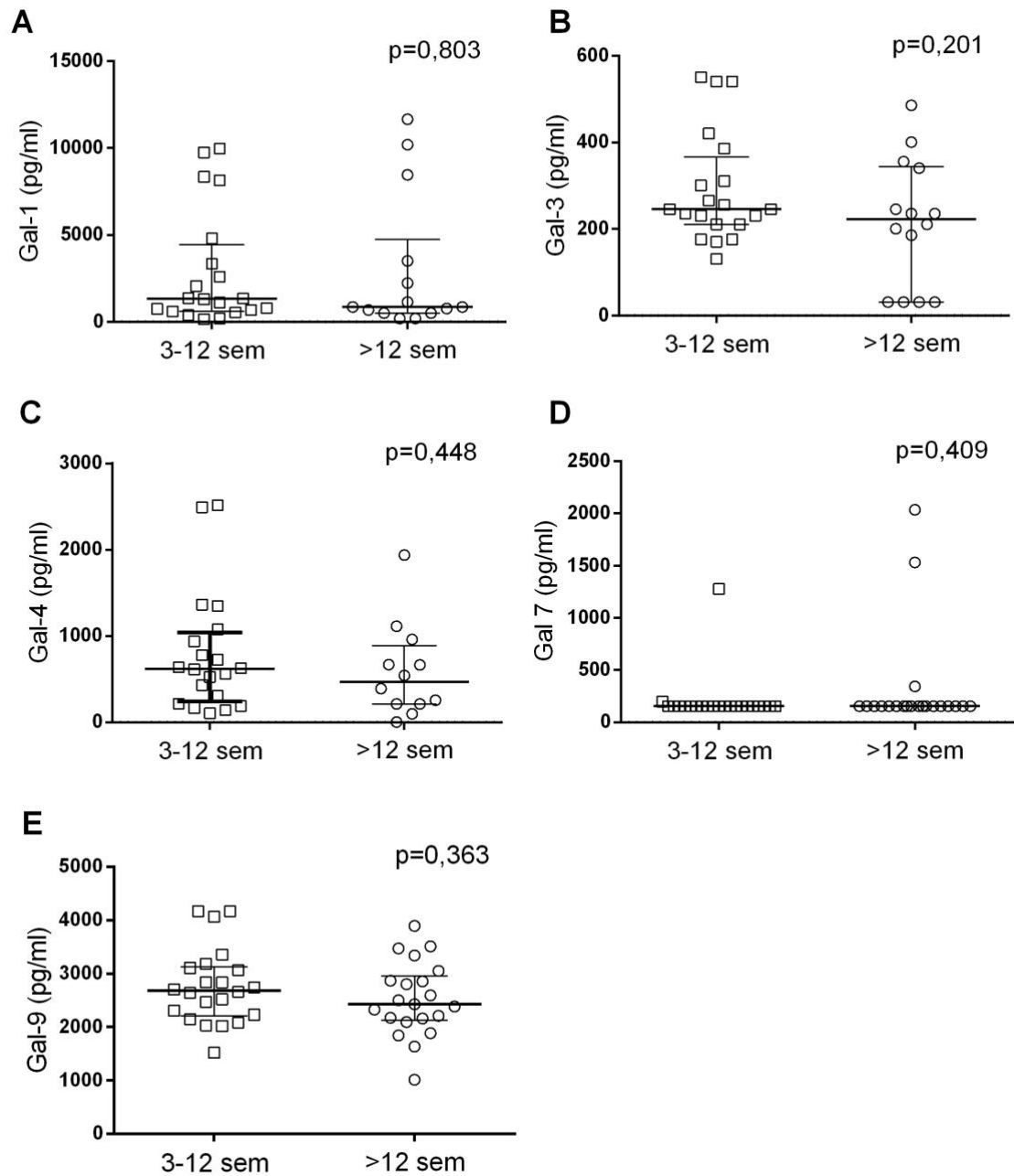
4.4.1 Associações entre galectinas e tempo de doença e correlações com manifestações clínicas

Ao comparar os grupos subagudo (3 -12semanas) e crônico (> 12 semanas), não encontramos diferença estatisticamente significativa para os níveis séricos de GAL-1, GAL-3, GAL-4, GAL-7 ou GAL-9 (Figura 16).

Em relação à correlação com manifestações clínicas, encontramos correlação positiva moderada da GAL-9 com intensidade da rigidez matinal ($p=0,024$, $r=0,459$) e associação estatisticamente significativa com a duração da rigidez >30 min x <30 min ($p=0,020$) (Figura 17).

Não foram encontradas correlações de GAL-1, -3, -4 e -7 com aspectos clínicos da doença.

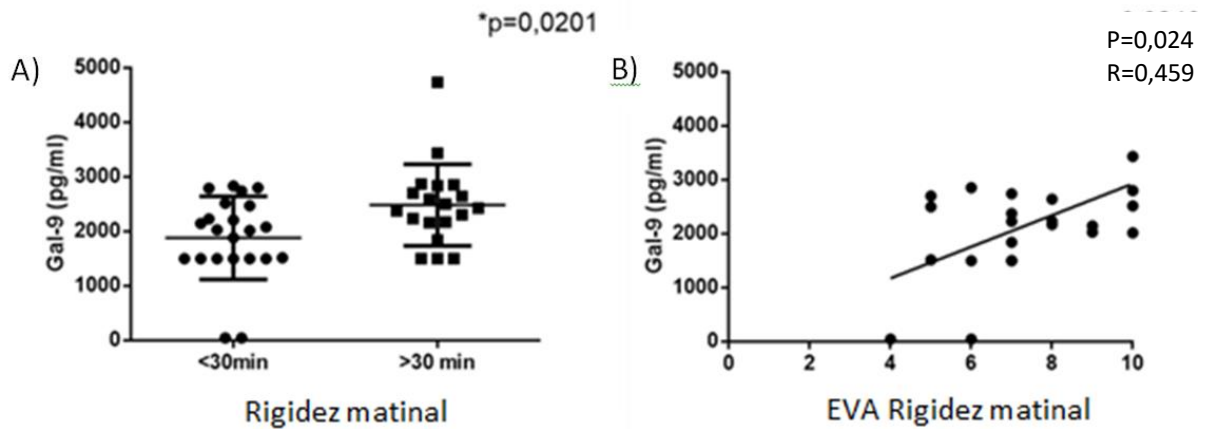
Figura 16 –Níveis séricos de Galectinas por subgrupo de duração de doença



Galectinas -1 (A), -3 (B), -4 (C), -7 (D) e -9 (E)

*subagudo: 3-12 semanas, crônico: >12 semanas.

Figura 17 –Níveis séricos de GAL-9 por tempo de rigidez matinal; correlação entre Galectina-9 e Intensidade da rigidez matinal pela escala visual analógica.



4.4.2 Correlação entre Galectinas

Foram observadas correlação moderada positiva entre GAL-1 e GAL-4 e fraca negativa entre GAL-4 e GAL-7 (Figura 18). Não ocorreram outras correlações entre as galectinas. Em relação às correlações entre citocinas e galectinas e citocinas foram verificadas correlações negativas fracas entre GAL-1 e IL-17A e GAL-1 e IL-27, além de correlação positiva moderada entre GAL-4 e IL-7 (Figura 19). Entre os controles, também foram encontradas correlação positiva moderada entre GAL-1 e GAL-4 e fraca negativa entre GAL-4 e GAL-7 (Figura 20), porém não foram encontradas correlações similares entre níveis séricos de galectinas e citocinas (Figura 21).

Para avaliar se tais correlações ocorreram exclusivamente em indivíduos acometidos por CHIK ou ocorrem naturalmente para determinadas citocinas/galectinas, foi realizada a análise de correlação no grupo controle (Figuras 20 e 21).

Figura 18. Correlações entre níveis Séricos de galectinas em pacientes com CHIK;

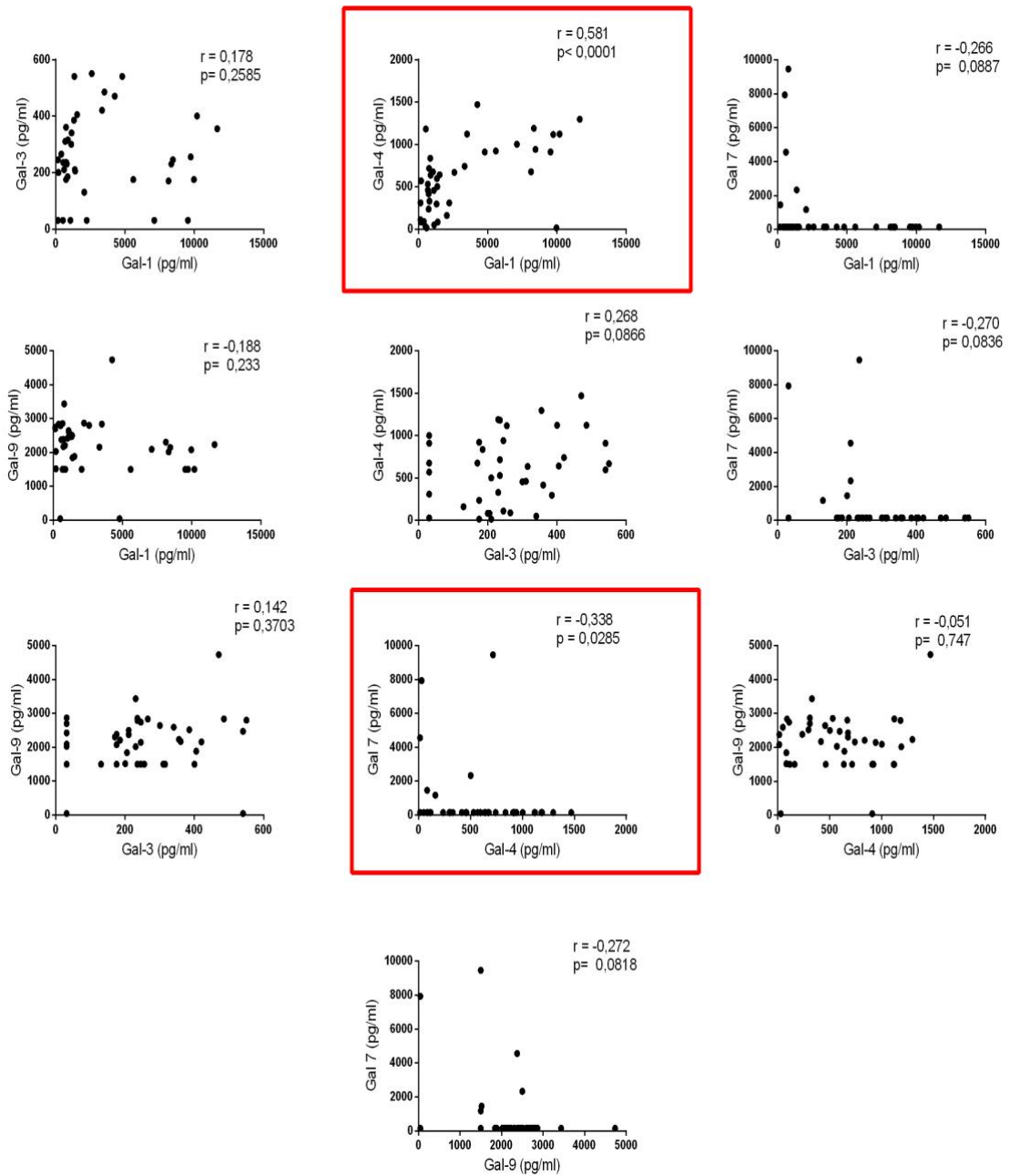


Figura 19. Correlação entre níveis Séricos de galectinas e citocinas em pacientes com CHIK;

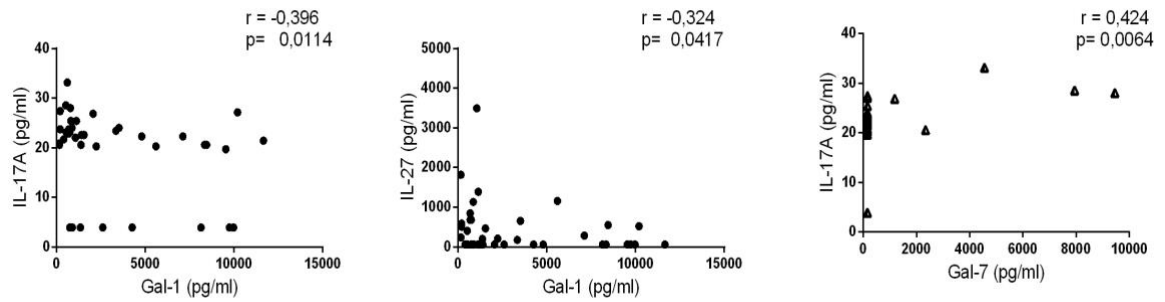


Figura 20. Correlações entre níveis Séricos de GAL-1 e GAL-4 e entre GAL-4 e GAL-7 em controles

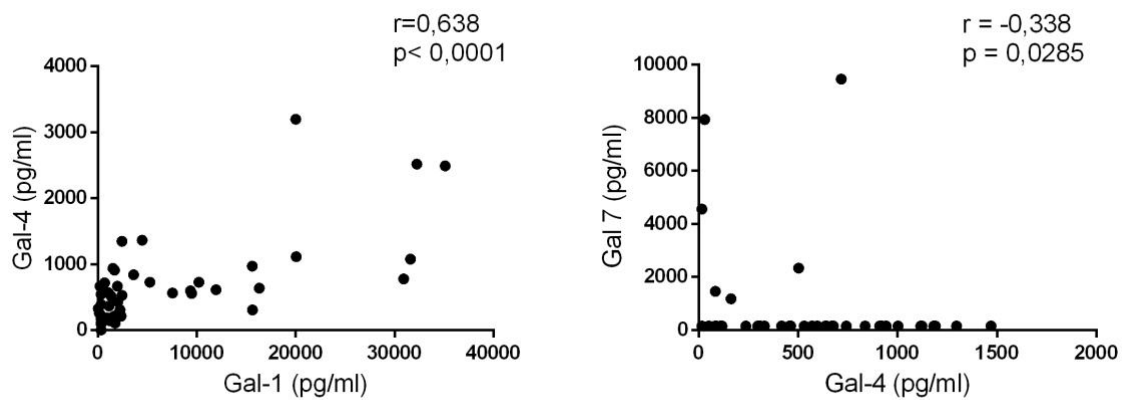
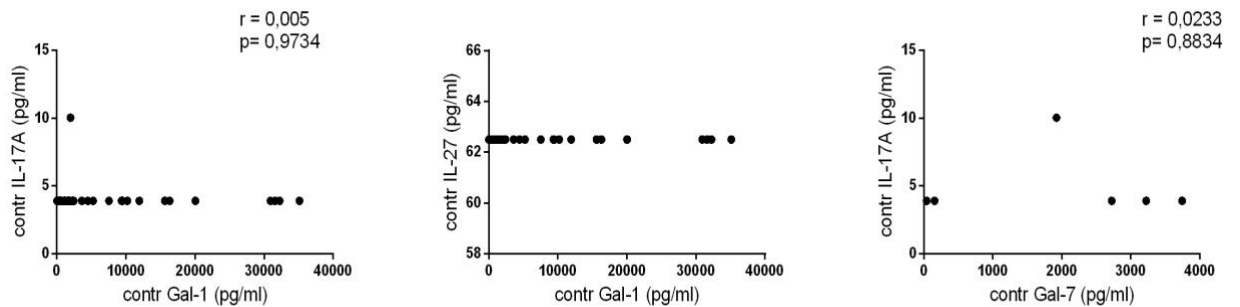


Figura 21. Correlação entre níveis Séricos de galectinas e citocinas em controles



5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo pudemos observar que pacientes com CHIK apresentam aumento de IL-27, TGF- β , IL-17A, IL-29 e GAL-9, e níveis suprimidos de IL-21 e GAL-3, quando comparado com controles saudáveis.

Além dos níveis séricos aumentados de IL-27 em relação aos controles, houve correlação desta citocina com a duração da doença, apresentando níveis mais elevados entre indivíduos na fase de cronicidade. Correlacionou-se também com manifestações clínicas do quadro, como intensidade da dor e número de articulações dolorosas. Nossos resultados apontam para uma possível participação da IL-27 na fisiopatogenia da CHIK. Não há dados prévios descrevendo a participação da IL-27 na fisiopatogenia do quadro agudo ou crônico. Há dados referentes à sua participação na imunopatogenia da AR, sendo considerado marcador de gravidade da doença (209).

A IL-27, um membro da família da IL-6 e IL-12, é uma citocina pleiotrópica, importante na diferenciação dos linfócitos T CD4+ (210). Pode ter sua produção iniciada por células apresentadoras de antígenos, especialmente as ligadas à linhagem monocítica/macrofágica, que são células chave na imunopatogenia da CHIK (194). Esta citocina pode agir de diversas maneiras, a depender do *pool* de citocinas locais, de coestimulação, e das células alvo. Pode ter ação pró-inflamatória, através da redução da resposta anti-inflamatória das Tregs (211), ou pelo estímulo da resposta Th1 nas células Th CD4+. Na ação anti-inflamatória, a IL-27 pode promover a diferenciação de linfócitos TCD4+ para TR-1 - um subtipo de linfócito TCD4+ com função regulatória, que produz a citocina anti-inflamatória IL-10 (211).

A IL-27 pode, ainda, estar envolvida na regulação da resposta Th17, de acordo com a presença de STAT's, que são proteínas de transdução de sinal, ativadoras da transcrição de fatores envolvidos na resposta inflamatória. Assim, na presença de STAT1, há uma supressão da resposta Th17, gerando uma resposta anti-inflamatória (212), enquanto na ausência de STAT 1 e presença de STAT 3 ocorre um estímulo à diferenciação Th17, aumentando o processo inflamatório.

No tocante à IL-17A os nossos dados demonstram que além de seu aumento entre pacientes, ocorre correlação desta citocina com o número de articulações edemaciadas. Similarmente, Chow *et al.* (118) também encontraram aumento nos níveis de IL-17 na fase crônica da CHIK enquanto Lohachanakul *et al.* (203) não observaram diferença entre pacientes e controles, contudo as amostras foram

colhidas antes da quarta semana de doença e como demonstrado por Chow *et al.*, o aumento ocorre apenas após a quarta semana de doença (118). O aumento da resposta Th17 é, possivelmente, um dos mecanismos envolvidos na perpetuação do quadro inflamatório da CHIK. Encontramos correlação entre IL-17A e IL-27 entre pacientes, na ausência da mesma correlação entre controles. Inferimos, a partir deste achado, a possibilidade de que o aumento da IL-27 esteja relacionado ao aumento da resposta Th17 na CHIK, sendo necessários outros estudos para melhor avaliação.

Em relação ao TGF- β , nós encontramos seu aumento nas formas crônicas da doença, sem relação com idade ou outras manifestações clínicas. Em modelo animal, os níveis de TGF- β parecem estar relacionados a aumento da susceptibilidade à persistência viral. Uhrlaub *et al.* observaram que, em ratos idosos, a produção deficitária de TGF- β e de CXCL-9, uma quimiocina que atrai linfócitos T, foi associada à diminuição da resposta T e B frente à infecção aguda pelo CHIKV. Tal redução gerou, em consequência, uma falência em produzir anticorpos específicos neutralizantes, redução na capacidade de eliminação viral e maior gravidade do edema associado à infecção nas patas dos ratos. Ao bloquear-se o TGF- β houve redução desse efeito, com melhora do edema tardio nas patas dos animais (116).

Sabendo-se que o TGF- β é indutor da resposta T regulatória, o aumento desta resposta seria esperado no caso do aumento do TGF- β , tanto em animais, quanto em humanos. Contudo isto não ocorreu durante a doença aguda (116), (213), havendo inclusive aumento na contagem de Tregs em humanos com a evolução para melhora (213). Possivelmente, a ação do TGF- β na CHIK é mais complexa, pois ele também tem a capacidade de agir sobre células T induzindo tolerância (ação direta sobre células TCD4+ ou indireta ao estimular T regs). Tem ainda a capacidade oposta de estimular a resposta inflamatória, induzindo a via Th17 (214).

Uma vez que a apresentação crônica da CHIK manifesta-se geralmente com períodos intermitentes de melhora e piora, o desequilíbrio entre os cenários inflamatórios e supressivos pode estar envolvido na fisiopatologia (215). Investigar o papel do TGF- β e de suas funções regulatórias e inflamatórias em tais cenários poderia ampliar o conhecimento acerca da doença e levar a desenvolvimentos para novos tratamentos da doença crônica.

Outro dado interessante entre nossos resultados foi a supressão de IL-21. Esta citocina tem papel na diferenciação, proliferação e aumento da ativação de linfócitos, estimulando principalmente a resposta Th2 (216) e sua redução poderia estar

envolvida na desregulação desta resposta na CHIK. Na resposta Th17 pode atuar como um amplificador, produzindo uma alça de retroestimulação positiva. A IL-21 é produzida por linfócitos Th17 e estimula a via ao diminuir a IL-2 (que desvia a produção de Th17 para Treg). Também estimula a via Th17 ao desencadear aumento na produção de IL-17 quando age em sinergismo com TGF- β ([217](#), [218](#)). Nesse sentido, sua elevação seria esperada na forma crônica da CHIK. Por outro lado, sabe-se que a IL-21 tem papel no controle e resolução de infecções virais, e que na sua ausência, ao menos em modelos animais, algumas infecções virais evoluem para cronicidade ([219](#), [220](#)). *Suto et al.* ([216](#)) sugeriram que níveis de TGF- β aumentados poderiam suprimir a expressão de IL-21. Diante destas possibilidades, seriam interessantes novas investigações sobre o papel da IL-21 na cronicidade da CHIK e sua relação com o TGF β .

Encontramos níveis séricos aumentados de GAL-9, com correlação positiva com intensidade da rigidez matinal e associação com rigidez matinal maior que 30 minutos. A rigidez matinal é considerada um sintoma decorrente do grau de atividade inflamatória articular, sendo considerado, inclusive um marcador de atividade da AR ([221](#)), deste modo, sua correlação positiva associa indiretamente a GAL-9 à inflamação articular. Não há na literatura descrições da participação de nenhuma das galectinas na fisiopatologia da CHIK.

Avaliando o papel da GAL-9 em outras arboviroses, estudos em Dengue demonstram que o vírus da dengue estimula a produção de GAL-9 em monócitos, como uma resposta ao dano celular ([190](#)). Chagan-Yasultan *et al.* encontraram aumento de GAL-9 e associação com gravidade em 65 pacientes com quadro agudo de dengue ([222](#)). Há também relato de aumento de GAL- 9 juntamente a GAL-3 BP (*binding protein*) por Liu *et al.*, enquanto as GALs -1 e -3 pareceram não estar aumentadas ([191](#)). Embora o vírus da Dengue e o CHIKV sejam de famílias diferentes, (Flaviviridae e Togaviridae, respectivamente), ambos tem a mesma via de entrada e abrigam semelhanças estruturais que podem influenciar na resposta imune ([223](#)).

Em outras viroses a participação da GAL-9 no processo fisiopatogênico já é bem definida ([224](#)). Embora o papel principal da GAL-9 frente à resposta viral seja variável dependente da célula alvo, seu papel na patogenia de algumas viroses levando à cronicidade já foi demonstrado, como no caso da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV), onde Kared *et al* ([218](#)) demonstraram que a progressão para infecção persistente é associada a aumento nos níveis séricos de GAL-9 e expansão

da subpopulação de Tregs que expressam GAL-9. Na infecção por HCV, ratos depletados para o gene da GAL-9 desenvolvem resposta TCD8+ contra o vírus, intensa e prolongada, ao contrário dos animais controle. A administração de GAL-9 reduziu a resposta específica T-CD8+ e retardou a eliminação do vírus.

A produção de GAL-9 a partir de monócitos e macrófagos pode ser induzida por IFN- γ , como ocorre na infecção crônica por HCV ([225](#)). A elevação de IFN- γ já foi demonstrada nas formas agudas da CHIK ([72](#), [165](#)). Corroborando o favorecimento do processo infeccioso pela GAL-9, a depleção de seu gene em ratos gerou um *clearance* viral mais eficaz em infecções virais agudas e crônicas, como as infecções por herpes simples ([226](#)).

Foram descritos em modelo de infecção em culturas de células HeLa e em fibroblastos papéis relevantes da indução de apoptose dependente de replicação viral na patogenia da CHIKF ([127](#)). Diante do papel pró-apoptótico da GAL-9 sobre fibroblastos e de nossos resultados demonstrando o aumento de GAL-9 nas fases subaguda e crônica da doença, seria interessante investigar a participação da galectina na indução da apoptose, no quadro infeccioso inicial. O papel da GAL-9 na fisiopatologia da CHIK pode ter relevância para o tratamento, uma vez que a inibição da apoptose reduz, sobremaneira, a replicação viral ([127](#)).

Dados de Rosen et al. ([227](#)) reforçam a importância do entendimento do papel da apoptose nas arboviroses. Em 1995 o grupo demonstrou a presença de antígenos do capsídeo viral de vírus Sindbis no interior de vesículas apoptóticas associadas a autoantígenos como a ribonucleoproteína SS-A (RO). Essa associação poderia gerar uma quebra na auto-tolerância, levando à persistência dos sintomas articulares e até ao desenvolvimento de doenças reumatológicas. O Sindbis é um *alphavirus*, com proteínas E1 e E2 do capsídeo semelhantes às do CHIKV ([227](#)). Como as duas arboviroses possuem muitas similaridades clínicas e fisiopatogênicas, inclusive com semelhança em relação à cronificação das manifestações osteoarticulares, é provável que partilhem também este aspecto da fisiopatologia, o que merece uma investigação mais aprofundada.

Observamos níveis de GAL-3 diminuídos em comparação aos controles. Não existem estudos de GAL-3 na CHIK. Há vários estudos relatando a participação da GAL-3 em processos inflamatórios crônicos, porém com associação com fibrose tecidual, o que não é habitualmente encontrado nos pacientes com artropatia subaguda ou crônica por Chikungunya. Em outras patologias crônicas com inflamação

sinovial ocorre aumento de GAL-3, como demonstrado em modelos animais e em pacientes de AR e espondilite anquilosante ([228](#)) ([229](#), [230](#)).

Em um recente trabalho em AR, Mendez-Huerg et al. ([177](#)) encontraram redução nos níveis séricos de GAL-3 em pacientes com AR quando comparado a controles, à semelhança dos nossos resultados em CHIK, e diferentemente dos estudos prévios em AR. Os autores atribuíram a diferença em relação a outros dados da literatura ao tratamento da doença, em especial ao uso de corticóide.

Em nosso estudo nenhum dos pacientes estava em uso de corticóide e não houve diferença nos níveis de GAL-3 ou GAL-9 em decorrência do uso de DMARDs. Seria interessante dosar os níveis desta galectina em tecido sinovial, uma vez que foi relatado o aumento da expressão de GAL-3 em condições que cursam com sinovite inflamatória como AR e osteoartrite e que a administração intra-articular de GAL-3 levou ao desenvolvimento de sinovite em modelo animal ([228](#)).

Observamos correlação entre os níveis de GAL-1 e GAL-4, GAL-4 e GAL-7, com resultados similares em pacientes e controles. Isto, associado ao fato de que estas citocinas não apresentaram elevação nos pacientes de CHIK em relação aos controles, sugere um efeito fisiológico ao invés de alteração relacionada à doença.

6 CONCLUSÕES

Encontramos elevação nos níveis de IL-27, IL-17A, TGF- β e GAL-9 em comparação com indivíduos saudáveis. Os níveis de IL-21 e GAL-3 estavam diminuídos em nossa análise.

Foi encontrada correlação dos níveis de IL-27 com duração da doença e sua associação com cronicidade.

A IL-27 correlacionou-se com o número de articulações doloridas e intensidade da dor pela escala visual analógica. Encontramos correlação entre IL-17A e o número de articulações edemaciadas. A GAL-9 correlacionou-se com a intensidade da rigidez matinal e foi associada à duração da mesma.

Encontramos a presença da IgG específica para todos os pacientes com CHIK, enquanto a IgM foi positiva em maior frequência na fase subaguda.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresenta a possibilidade da utilização da IL-27 enquanto marcador de cronicidade, e da IL-27, IL-17A e GAL-9 como marcadores associados à atividade de doença, inserindo a participação destes fatores solúveis, no contexto da fisiopatologia da forma crônica da febre de Chikungunya. Estes marcadores devem ser estudados quanto ao seu potencial enquanto alvo terapêutico.

O estudo caracteriza ainda a elevação nos níveis séricos destas e de TGF β e a supressão de IL-21 e GAL-3 nas fases subaguda e crônica da febre de Chikungunya.

A GAL-9 pode funcionar como um elo entre imunidade inata e adaptativa e por sua relação com a cronificação de doenças virais. Novos estudos que elucidem sua ação na fisiopatogenia da doença podem trazer informações muito importantes para a compreensão da evolução da doença.

Consideramos que é de fundamental importância o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos relacionados à persistência do quadro articular, bem como a investigação de alterações imunológicas e que favoreçam tal evolução. Nossos resultados abordam a questão fisiopatológica ao investigar a relação entre citocinas e galectinas e a artropatia crônica por CHIK. Trazem ainda, conotações clínicas evidentes, com a possibilidade de utilização dos biomarcadores encontrados na prática clínica. A busca de alterações laboratoriais que possam predizer a cronificação (especialmente para as formas mais graves da doença) pode trazer benefícios concretos no seguimento destes indivíduos e quiçá contribuir para o desenvolvimento de terapêuticas eficazes orientadas para alvos específicos do processo inflamatório.

8 REFERENCIAS

1. Yactayo S, Staples JE, Millot V, Cibrelus L, Ramon-Pardo P. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *The Journal of infectious diseases*. 2016;214(suppl 5):S441-S5.
2. Wahid B, Ali A, Rafique S, Idrees M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis*. 2017;58:69-76.
3. Ministério da Saúde, Brasil. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a Semana Epidemiológica (SE) 52 de 2014. Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde, 2015.
4. Ministério da Saúde, Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018.
5. Nunes MR, Faria NR, de Vasconcelos JM, Golding N, Kraemer MU, de Oliveira LF, et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC medicine*. 2015;13:102.
6. Rodriguez-Morales AJ, Simon F. Chronic chikungunya, still to be fully understood. *Int J Infect Dis*. 2019;86:133-4.
7. Silva JVV, Jr., Ludwig-Begall LF, Oliveira-Filho EF, Oliveira RAS, Duraes-Carvalho R, Lopes TRR, et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Trop*. 2018;188:213-24.
8. Arroyo-Avila M, Vila LM. Rheumatic Manifestations in Patients with Chikungunya Infection. *Puerto Rico health sciences journal*. 2015;34(2):71-7.
9. Pialoux G, Gauzere BA, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious diseases*. 2007;7(5):319-27.
10. Carey DE. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci*. 1971;26(3):243-62.
11. Lumsden WH. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1955;49(1):33-57.
12. Robinson MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1955;49(1):28-32.
13. Ross RW. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)*. 1956;54(2):177-91.
14. Weinbren MP, Haddow AJ, Williams MC. The occurrence of Chikungunya virus in Uganda. I. Isolation from mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1958;52(3):253-7.
15. Gear J, Reid FP. The occurrence of a dengue-like fever in the North-Eastern Transvaal. I. Clinical features and isolation of virus. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 1957;31(11):253-7.
16. Gudo ES, Black JF, Cliff JL. Chikungunya in Mozambique: A Forgotten History. *PLoS neglected tropical diseases*. 2016;10(11):e0005001.
17. Zeller H, Van Bortel W, Sudre B. Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013-2014. *The Journal of infectious diseases*. 2016;214(suppl 5):S436-S40.
18. Lo Presti A, Cella E, Angeletti S, Ciccozzi M. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2016;41:270-8.

19. Higuera A, Ramirez JD. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. *Acta Trop*. 2019;190:99-111.
20. Tsetsarkin KA, McGee CE, Volk SM, Vanlandingham DL, Weaver SC, Higgs S. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PloS one*. 2009;4(8):e6835.
21. Azevedo Rdo S, Oliveira CS, Vasconcelos PF. Chikungunya risk for Brazil. *Rev Saude Publica*. 2015;49:58.
22. Coffey LL, Failloux AB, Weaver SC. Chikungunya virus-vector interactions. *Viruses*. 2014;6(11):4628-63.
23. Tan Y, Pickett BE, Shrivastava S, Gresh L, Balmaseda A, Amedeo P, et al. Differing epidemiological dynamics of Chikungunya virus in the Americas during the 2014-2015 epidemic. *PLoS neglected tropical diseases*. 2018;12(7):e0006670.
24. Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X. Chikungunya in the Americas. *Lancet*. 2014;383(9916):514.
25. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *The Lancet Infectious diseases*. 2017;17(4):e107-e17.
26. de Souza TMA, Ribeiro ED, Correa VCE, Damasco PV, Santos CC, de Bruycker-Nogueira F, et al. Following in the Footsteps of the Chikungunya Virus in Brazil: The First Autochthonous Cases in Amapa in 2014 and Its Emergence in Rio de Janeiro during 2016. *Viruses*. 2018;10(11).
27. Silva NMD, Teixeira RAG, Cardoso CG, Siqueira Junior JB, Coelho GE, Oliveira ESF. Chikungunya surveillance in Brazil: challenges in the context of Public Health. *Epidemiol Serv Saude*. 2018;27(3):e2017127.
28. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 15, 2017. *Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde*. 2017;48(Nº 14 - 2017).
29. Ministério da Saúde B. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016 Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 2017.
30. Ministério da Saúde, Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015 Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 2016.
31. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017 Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 2018.
32. Ministério da Saúde, Brasil. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 47, 2019 Brasília (DF): Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde, 2019.
33. Economopoulou A, Dominguez M, Helynck B, Sissoko D, Wichmann O, Quenel P, et al. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect*. 2009;137(4):534-41.
34. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral research*. 2015;120:32-9.

35. Lucena-Silva N, Assuncao M, Ramos FAP, Azevedo F, Lessa RJ, Cordeiro MT, et al. Encephalitis associated with inappropriate antidiuretic hormone secretion due to chikungunya infection in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(3):417-22.
36. Mehta R, Gerardin P, de Brito CAA, Soares CN, Ferreira MLB, Solomon T. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. *Reviews in medical virology.* 2018;28(3):e1978.
37. Brito CAA. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(5):585-9.
38. Freitas ARR, Cavalcanti L, Von Zuben AP, Donalisio MR. Excess Mortality Related to Chikungunya Epidemics in the Context of Co-circulation of Other Arboviruses in Brazil. *PLoS Curr.* 2017;9.
39. Cavalcanti LPG, Freitas ARR, Brasil P, Cunha RVD. Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: from dengue to chikungunya. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(8):583-5.
40. Brito CAA, Teixeira MG. Increased number of deaths during a chikungunya epidemic in Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(9):650-1.
41. Das T, Jaffar-Bandjee MC, Hoarau JJ, Krejbich Trotot P, Denizot M, Lee-Pat-Yuen G, et al. Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. *Prog Neurobiol.* 2010;91(2):121-9.
42. Galo SS, Gonzalez K, Tellez Y, Garcia N, Perez L, Gresh L, et al. Development of in-house serological methods for diagnosis and surveillance of chikungunya. *Rev Panam Salud Publica.* 2017;41:e56.
43. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006;3(7):e263.
44. Ding F, Fu J, Jiang D, Hao M, Lin G. Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Trop.* 2018;178:155-62.
45. Simon F, Savini H, Parola P. Chikungunya: a paradigm of emergence and globalization of vector-borne diseases. *Med Clin North Am.* 2008;92(6):1323-43, ix.
46. Kuno G, Mackenzie JS, Junglen S, Hubalek Z, Plyusnin A, Gubler DJ. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses.* 2017;9(7).
47. Vector-borne disease, cities, and climate change. *Can Fam Physician.* 2016;62(10):818.
48. Velazquez-Castro J, Anzo-Hernandez A, Bonilla-Capilla B, Soto-Bajo M, Fraguera-Collar A. Vector-borne disease risk indexes in spatially structured populations. *PLoS neglected tropical diseases.* 2018;12(2):e0006234.
49. Gerardin P, Barau G, Michault A, Bintner M, Randrianaiivo H, Choker G, et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med.* 2008;5(3):e60.
50. Long KM, Heise MT. Chikungunya virus transmission--more than meets the eye. *The Journal of infectious diseases.* 2012;206(6):806-7.
51. Contopoulos-Ioannidis D, Newman-Lindsay S, Chow C, LaBeaud AD. Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases.* 2018;12(6):e0006510.
52. Powers AM, Roehrig JT. Alphaviruses. *Methods in molecular biology.* 2011;665:17-38.

53. Issac TH, Tan EL, Chu JJ. Proteomic profiling of chikungunya virus-infected human muscle cells: reveal the role of cytoskeleton network in CHIKV replication. *Journal of proteomics*. 2014;108:445-64.
54. Powers AM. How Chikungunya Virus Virology Affects Its Epidemiology and Transmission: Implications for Influencing Public Health. *The Journal of infectious diseases*. 2016;214(suppl 5):S449-S52.
55. Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonnrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 2010;468(7324):709-12.
56. Pietila MK, Hellstrom K, Ahola T. Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus research*. 2017;234:44-57.
57. Domingo E. Viruses at the edge of adaptation. *Virology*. 2000;270(2):251-3.
58. Tsetsarkin KA, Weaver SC. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. *PLoS pathogens*. 2011;7(12):e1002412.
59. Pezzi L, Reusken CB, Weaver SC, Drexler JF, Busch M, LaBeaud AD, et al. GloPID-R report on Chikungunya, O'nyong-nyong and Mayaro virus, part I: Biological diagnostics. *Antiviral research*. 2019;166:66-81.
60. Natrajan MS, Rojas A, Waggoner JJ. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. *J Clin Microbiol*. 2019;57(6).
61. Dash M, Mohanty I, Padhi S. Laboratory diagnosis of chikungunya virus: do we really need it? *Indian J Med Sci*. 2011;65(3):83-91.
62. Dutta SK, Pal T, Saha B, Mandal S, Tripathi A. Copy number variation of Chikungunya ECSA virus with disease symptoms among Indian patients. *Journal of medical virology*. 2014;86(8):1386-92.
63. Reddy V, Mani RS, Desai A, Ravi V. Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. *Journal of medical virology*. 2014;86(8):1393-401.
64. Ummul Haninah A, Vasan SS, Ravindran T, Chandru A, Lee HL, Shamala Devi S. Development and evaluation of a one-step SYBR-Green I-based real-time RT-PCR assay for the detection and quantification of Chikungunya virus in human, monkey and mosquito samples. *Trop Biomed*. 2010;27(3):611-23.
65. Reddy V, Ravi V, Desai A, Parida M, Powers AM, Johnson BW. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *Journal of medical virology*. 2012;84(11):1771-8.
66. Cabié SAaA. Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment , C. M. Okeoma, Springer International Publishing AG, Switzerland, 2016, pp. 75–98. 2016.
67. Yap G, Pok KY, Lai YL, Hapuarachchi HC, Chow A, Leo YS, et al. Evaluation of Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in two independent outbreaks. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010;4(7):e753.
68. Prat CM, Flusin O, Panella A, Tenebray B, Lanciotti R, Leparç-Goffart I. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(12):2129-32.
69. Blacksell SD, Tanganuchitcharnchai A, Jarman RG, Gibbons RV, Paris DH, Bailey MS, et al. Poor diagnostic accuracy of commercial antibody-based assays for the diagnosis of acute Chikungunya infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(10):1773-5.
70. Kam YW, Simarmata D, Chow A, Her Z, Teng TS, Ong EK, et al. Early appearance of neutralizing immunoglobulin G3 antibodies is associated with

chikungunya virus clearance and long-term clinical protection. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(7):1147-54.

71. Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Gouix A, Cotte L, Michault A, et al. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;47(4):469-75.
72. Venugopalan A, Ghorpade RP, Chopra A. Cytokines in acute chikungunya. *PloS one*. 2014;9(10):e111305.
73. Malvy D, Ezzedine K, Mamani-Matsuda M, Autran B, Tolou H, Receveur MC, et al. Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. *BMC Infect Dis*. 2009;9:200.
74. Marques CDL, Duarte A, Ranzolin A, Dantas AT, Cavalcanti NG, Goncalves RSG, et al. Recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and treatment of Chikungunya fever. Part 1 - Diagnosis and special situations. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2017;57 Suppl 2:421-37.
75. Kishishita N, Sasayama M, Takeda N, Sa-Ngasang A, Anuegoonpipat A, Anantapreecha S. Neutralization activity of patient sera collected during the 2008-2009 Chikungunya outbreak in Thailand. *J Clin Microbiol*. 2015;53(1):184-90.
76. Paolo Gaibani MPL, and Vittorio Sambri *Diagnostic Methods for CHIKV Based on Serological Tools in Justin Jang Hann Chu and Swee Kim Ang (eds.), Chikungunya Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1426, © Springer Science+Business Media New York 2016.*
77. Anfasa F, Provacia L, GeurtsvanKessel C, Wever R, Gerstenbluth I, Osterhaus AD, et al. Hyperferritinemia is a potential marker of chronic chikungunya: A retrospective study on the Island of Curacao during the 2014-2015 outbreak. *J Clin Virol*. 2017;86:31-8.
78. Johnson BW, Goodman CH, Holloway K, de Salazar PM, Valadere AM, Drebot MA. Evaluation of Commercially Available Chikungunya Virus Immunoglobulin M Detection Assays. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2016;95(1):182-92.
79. Pezzi L, Rodriguez-Morales AJ, Reusken CB, Ribeiro GS, LaBeaud AD, Lourenco-de-Oliveira R, et al. GloPID-R report on chikungunya, o'nyong-nyong and Mayaro virus, part 3: Epidemiological distribution of Mayaro virus. *Antiviral research*. 2019;172:104610.
80. Magalhaes T, Braga C, Cordeiro MT, Oliveira ALS, Castanha PMS, Maciel APR, et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(11):e0006055.
81. Appassakij H, Khuntikij P, Kemapunmanus M, Wutthanarungsan R, Silpapojakul K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion*. 2013;53(10 Pt 2):2567-74.
82. de Andrade DC, Jean S, Clavelou P, Dallel R, Bouhassira D. Chronic pain associated with the Chikungunya Fever: long lasting burden of an acute illness. *BMC Infect Dis*. 2010;10:31.
83. Madariaga M, Ticona E, Resurrecion C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. *Braz J Infect Dis*. 2015.
84. Badawi A, Ryoo SG, Vasileva D, Yaghoubi S. Prevalence of chronic comorbidities in chikungunya: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2018;67:107-13.

85. Moro ML, Grilli E, Corvetta A, Silvi G, Angelini R, Mascella F, et al. Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: a prognostic cohort study. *J Infect.* 2012;65(2):165-72.
86. Schilte C, Staikowsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases.* 2013;7(3):e2137.
87. Sharma PK, Kumar M, Aggarwal GK, Kumar V, Srivastava RD, Sahani A, et al. Severe Manifestations of Chikungunya Fever in Children, India, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(9):1737-9.
88. Rodriguez-Morales AJ, Villamil-Gomez W, Merlano-Espinosa M, Simone-Kleber L. Post-chikungunya chronic arthralgia: a first retrospective follow-up study of 39 cases in Colombia. *Clinical rheumatology.* 2015.
89. Rodriguez-Morales AJ, Cardona-Ospina JA, Fernanda Urbano-Garzon S, Sebastian Hurtado-Zapata J. Prevalence of Post-Chikungunya Infection Chronic Inflammatory Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis care & research.* 2016;68(12):1849-58.
90. Dias JP, Costa M, Campos GS, Paixao ES, Natividade MS, Barreto FR, et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus after Its Emergence in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(4):617-24.
91. Cunha RV, Trinta KS, Montalbano CA, Sucupira MV, de Lima MM, Marques E, et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus in a Rural Community in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases.* 2017;11(1):e0005319.
92. Paixao ES, Rodrigues LC, Costa M, Itaparica M, Barreto F, Gerardin P, et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2018;112(7):301-16.
93. van Aalst M, Nelen CM, Goorhuis A, Stijns C, Grobusch MP. Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. *Travel Med Infect Dis.* 2017;15:8-22.
94. Edington F, Varjao D, Melo P. Incidence of articular pain and arthritis after chikungunya fever in the Americas: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme.* 2018;85(6):669-78.
95. Chopra A, Anuradha V, Lagoo-Joshi V, Kunjir V, Salvi S, Saluja M. Chikungunya virus aches and pains: an emerging challenge. *Arthritis and rheumatism.* 2008;58(9):2921-2.
96. Hoarau JJ, Jaffar Bandjee MC, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *Journal of immunology.* 2010;184(10):5914-27.
97. Yaseen HM, Simon F, Deparis X, Marimoutou C. Identification of initial severity determinants to predict arthritis after chikungunya infection in a cohort of French gendarmes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2014;15:249.
98. Ramachandran V, Malaisamy M, Ponnaiah M, Kaliaperuaml K, Vadivoo S, Gupte MD. Impact of Chikungunya on health related quality of life Chennai, South India. *PloS one.* 2012;7(12):e51519.
99. Gerardin P, Fianu A, Michault A, Mussard C, Boussaid K, Rollot O, et al. Predictors of Chikungunya rheumatism: a prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(1):R9.
100. Javelle E, Ribera A, Degasne I, Gauzere BA, Marimoutou C, Simon F. Specific management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159

cases in Reunion Island from 2006-2012. PLoS neglected tropical diseases. 2015;9(3):e0003603.

101. Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver SC. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol.* 2011;1(4):310-7.
102. Queyriaux B, Simon F, Grandadam M, Michel R, Tolou H, Boutin JP. Clinical burden of chikungunya virus infection. *The Lancet Infectious diseases.* 2008;8(1):2-3.
103. Couturier E, Guillemin F, Mura M, Leon L, Virion JM, Letort MJ, et al. Impaired quality of life after chikungunya virus infection: a 2-year follow-up study. *Rheumatology.* 2012;51(7):1315-22.
104. Burt F, Chen W, Mahalingam S. Chikungunya virus and arthritic disease. *The Lancet Infectious diseases.* 2014;14(9):789-90.
105. Rahim AA, Thekkekara RJ, Bina T, Paul BJ. Disability with Persistent Pain Following an Epidemic of Chikungunya in Rural South India. *The Journal of rheumatology.* 2015.
106. Ganu MA, Ganu AS. Post-chikungunya chronic arthritis--our experience with DMARDs over two year follow up. *The Journal of the Association of Physicians of India.* 2011;59:83-6.
107. Chaaitanya IK, Muruganandam N, Sundaram SG, Kawalekar O, Sugunan AP, Manimunda SP, et al. Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. *Viral immunology.* 2011;24(4):265-71.
108. Labadie K, Larcher T, Joubert C, Mannioui A, Delache B, Brochard P, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of clinical investigation.* 2010;120(3):894-906.
109. Schilte C, Couderc T, Chretien F, Sourisseau M, Gangneux N, Guivel-Benhassine F, et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine.* 2010;207(2):429-42.
110. Priya R, Patro IK, Parida MM. TLR3 mediated innate immune response in mice brain following infection with Chikungunya virus. *Virus research.* 2014;189:194-205.
111. Her Z, Teng TS, Tan JJ, Teo TH, Kam YW, Lum FM, et al. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. *EMBO molecular medicine.* 2015;7(1):24-41.
112. Danillo Lucas Alves E, Benedito Antonio Lopes da F. Characterization of the immune response following in vitro mayaro and chikungunya viruses (Alphavirus, Togaviridae) infection of mononuclear cells. *Virus research.* 2018;256:166-73.
113. Fros JJ, van der Maten E, Vlak JM, Pijlman GP. The C-terminal domain of chikungunya virus nsP2 independently governs viral RNA replication, cytopathicity, and inhibition of interferon signaling. *Journal of virology.* 2013;87(18):10394-400.
114. Fros JJ, Liu WJ, Prow NA, Geertsema C, Ligtenberg M, Vanlandingham DL, et al. Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *Journal of virology.* 2010;84(20):10877-87.
115. Couderc T, Chretien F, Schilte C, Disson O, Brigitte M, Guivel-Benhassine F, et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. *PLoS pathogens.* 2008;4(2):e29.
116. Uhrlaub JL, Pulko V, DeFilippis VR, Broeckel R, Streblow DN, Coleman GD, et al. Dysregulated TGF-beta Production Underlies the Age-Related Vulnerability to Chikungunya Virus. *PLoS pathogens.* 2016;12(10):e1005891.
117. Long KM, Whitmore AC, Ferris MT, Sempowski GD, McGee C, Trollinger B, et al. Dendritic cell immunoreceptor regulates Chikungunya virus pathogenesis in mice. *Journal of virology.* 2013;87(10):5697-706.

118. Chow A, Her Z, Ong EK, Chen JM, Dimatatac F, Kwek DJ, et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of infectious diseases*. 2011;203(2):149-57.
119. Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(1):115-23.
120. Kam YW, Lee WW, Simarmata D, Harjanto S, Teng TS, Tolou H, et al. Longitudinal analysis of the human antibody response to Chikungunya virus infection: implications for serodiagnosis and vaccine development. *Journal of virology*. 2012;86(23):13005-15.
121. Ziegler SA, Lu L, da Rosa AP, Xiao SY, Tesh RB. An animal model for studying the pathogenesis of chikungunya virus infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2008;79(1):133-9.
122. Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS pathogens*. 2007;3(6):e89.
123. Her Z, Malleret B, Chan M, Ong EK, Wong SC, Kwek DJ, et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. *Journal of immunology*. 2010;184(10):5903-13.
124. Teng TS, Foo SS, Simamarta D, Lum FM, Teo TH, Lulla A, et al. Viperin restricts chikungunya virus replication and pathology. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(12):4447-60.
125. Gardner CL, Burke CW, Higgs ST, Klimstra WB, Ryman KD. Interferon-alpha/beta deficiency greatly exacerbates arthritogenic disease in mice infected with wild-type chikungunya virus but not with the cell culture-adapted live-attenuated 181/25 vaccine candidate. *Virology*. 2012;425(2):103-12.
126. Poo YS, Nakaya H, Gardner J, Larcher T, Schroder WA, Le TT, et al. CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. *Journal of virology*. 2014;88(12):6862-72.
127. Krejbich-Trotot P, Denizot M, Hoarau JJ, Jaffar-Bandjee MC, Das T, Gasque P. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *FASEB J*. 2011;25(1):314-25.
128. Jaffar-Bandjee MC, Das T, Hoarau JJ, Krejbich Trotot P, Denizot M, Ribera A, et al. Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2009;11(14-15):1206-18.
129. Ozden S, Huerre M, Riviere JP, Coffey LL, Afonso PV, Mouly V, et al. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. *PloS one*. 2007;2(6):e527.
130. Petitdemange C, Wauquier N, Vieillard V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;135(4):846-55.
131. Gardner J, Anraku I, Le TT, Larcher T, Major L, Roques P, et al. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *Journal of virology*. 2010;84(16):8021-32.
132. Rulli NE, Rolph MS, Srikiatkachorn A, Anantapreecha S, Guglielmotti A, Mahalingam S. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute chikungunya virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204(7):1026-30.

133. Hoarau JJ, Gay F, Pelle O, Samri A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P, et al. Identical strength of the T cell responses against E2, nsP1 and capsid CHIKV proteins in recovered and chronic patients after the epidemics of 2005-2006 in La Reunion Island. *PloS one*. 2013;8(12):e84695.
134. Ng L. *Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment*, C. M. Okeoma, Springer International Publishing AG, Switzerland, 2016, . 2016.
135. Teo TH, Lum FM, Claser C, Lulla V, Lulla A, Merits A, et al. A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya virus infection in mice. *Journal of immunology*. 2013;190(1):259-69.
136. Nakaya HI, Gardner J, Poo YS, Major L, Pulendran B, Suhrbier A. Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(11):3553-63.
137. Miner JJ, Cook LE, Hong JP, Smith AM, Richner JM, Shimak RM, et al. Therapy with CTLA4-Ig and an antiviral monoclonal antibody controls chikungunya virus arthritis. *Sci Transl Med*. 2017;9(375).
138. Poo YS, Rudd PA, Gardner J, Wilson JA, Larcher T, Colle MA, et al. Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic chikungunya virus infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(12):e3354.
139. Lee WW, Teo TH, Her Z, Lum FM, Kam YW, Haase D, et al. Expanding regulatory T cells alleviates chikungunya virus-induced pathology in mice. *Journal of virology*. 2015.
140. Ng LF, Chow A, Sun YJ, Kwek DJ, Lim PL, Dimatatac F, et al. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PloS one*. 2009;4(1):e4261.
141. Kelvin AA, Banner D, Silvi G, Moro ML, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(8):e1279.
142. Chirathaworn C, Poovorawan Y, Lertmaharit S, Wuttirattanakowit N. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2013;6(8):631-4.
143. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology*. 2008;123(3):326-38.
144. Teng TS, Kam YW, Lee B, Hapuarachchi HC, Wimal A, Ng LC, et al. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(12):1925-35.
145. Tanabe ISB, Tanabe ELL, Santos EC, Martins WV, Araujo I, Cavalcante MCA, et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:345.
146. Teo TH, Her Z, Tan JJ, Lum FM, Lee WW, Chan YH, et al. Caribbean and La Reunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. *Journal of virology*. 2015;89(15):7955-69.
147. Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(3):e1446.
148. Bouquillard E, Combe B. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. 2009;76(6):654-7.

149. Sepulveda-Delgado J, Vera-Lastra OL, Trujillo-Murillo K, Canseco-Avila LM, Sanchez-Gonzalez RA, Gomez-Cruz O, et al. Inflammatory biomarkers, disease activity index, and self-reported disability may be predictors of chronic arthritis after chikungunya infection: brief report. *Clinical rheumatology*. 2017;36(3):695-9.
150. Chang AY, Martins KAO, Encinales L, Reid SP, Acuna M, Encinales C, et al. Chikungunya Arthritis Mechanisms in the Americas: A Cross-Sectional Analysis of Chikungunya Arthritis Patients Twenty-Two Months After Infection Demonstrating No Detectable Viral Persistence in Synovial Fluid. *Arthritis & rheumatology*. 2018;70(4):585-93.
151. Gizinski AM, Fox DA. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2014;26(2):204-10.
152. Miner JJ, Aw-Yeang HX, Fox JM, Taffner S, Malkova ON, Oh ST, et al. Chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology*. 2015;67(5):1214-20.
153. Dias CNS, Gois BM, Lima VS, Guerra-Gomes IC, Araujo JMG, Gomes JAS, et al. Human CD8 T-cell activation in acute and chronic chikungunya infection. *Immunology*. 2018;155(4):499-504.
154. Tanay A. Chikungunya virus and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(4):389-93.
155. Reddy V, Desai A, Krishna SS, Vasanthapuram R. Molecular Mimicry between Chikungunya Virus and Host Components: A Possible Mechanism for the Arthritic Manifestations. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(1):e0005238.
156. Hogeboom C. Peptide motif analysis predicts alphaviruses as triggers for rheumatoid arthritis. *Molecular immunology*. 2015;68(2 Pt B):465-75.
157. Manimunda SP, Vijayachari P, Uppoor R, Sugunan AP, Singh SS, Rai SK, et al. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010;104(6):392-9.
158. Thanapati S, Hande A, Das R, Gurav Y, Tripathy AS. Association of human leukocyte antigen class II allele and haplotypes in chikungunya viral infection in a western Indian population. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014;108(5):277-82.
159. Chen W, Foo SS, Taylor A, Lulla A, Merits A, Hueston L, et al. Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein synthesis, protects against bone loss induced by chikungunya virus infection. *Journal of virology*. 2015;89(1):581-93.
160. Thanapati S, Ganu M, Giri P, Kulkarni S, Sharma M, Babar P, et al. Impaired NK cell functionality and increased TNF-alpha production as biomarkers of chronic chikungunya arthritis and rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 2017;78(4):370-4.
161. Thanapati S, Ganu MA, Tripathy AS. Differential inhibitory and activating NK cell receptor levels and NK/NKT-like cell functionality in chronic and recovered stages of chikungunya. *PloS one*. 2017;12(11):e0188342.
162. Phuklia W, Kasisith J, Modhiran N, Rodpai E, Thannagith M, Thongsakulprasert T, 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*. 2013;177(2):179-88.
163. Noret M, Herrero L, Rulli N, Rolph M, Smith PN, Li RW, et al. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts. *The Journal of infectious diseases*. 2012;206(3):455-7: 7-9.

164. Chen W, Foo SS, Rulli NE, Taylor A, Sheng KC, Herrero LJ, et al. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(16):6040-5.
165. Chirathaworn C, Rianthavorn P, Wuttirattanakowit N, Poovorawan Y. Serum IL-18 and IL-18BP levels in patients with Chikungunya virus infection. *Viral immunology*. 2010;23(1):113-7.
166. Thiemann S, Baum LG. Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu Rev Immunol*. 2016;34:243-64.
167. Almkvist J, Karlsson A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J*. 2002;19(7-9):575-81.
168. Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994;269(33):20807-10.
169. Boscher C, Dennis JW, Nabi IR. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2011;23(4):383-92.
170. Cummings RD, Liu FT, Vasta GR. Galectins. In: rd, Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY)2015. p. 469-80.
171. Vasta GR, Feng C, Gonzalez-Montalban N, Mancini J, Yang L, Abernathy K, et al. Functions of galectins as 'self/non-self'-recognition and effector factors. *Pathogens and disease*. 2017;75(5).
172. Vasta GR. Roles of galectins in infection. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(6):424-38.
173. de la Fuente H, Perez-Gala S, Bonay P, Cruz-Adalia A, Cibrian D, Sanchez-Cuellar S, et al. Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *J Pathol*. 2012;228(2):193-203.
174. Merani S, Chen W, Elahi S. The bitter side of sweet: the role of Galectin-9 in immunopathogenesis of viral infections. *Reviews in medical virology*. 2015;25(3):175-86.
175. Norling LV, Perretti M, Cooper D. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. *J Endocrinol*. 2009;201(2):169-84.
176. Sundblad V, Morosi LG, Geffner JR, Rabinovich GA. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *Journal of immunology*. 2017;199(11):3721-30.
177. Mendez-Huergo SP, Hockl PF, Stupirski JC, Maller SM, Morosi LG, Pinto NA, et al. Clinical Relevance of Galectin-1 and Galectin-3 in Rheumatoid Arthritis Patients: Differential Regulation and Correlation With Disease Activity. *Front Immunol*. 2018;9:3057.
178. Papaspyridonos M, McNeill E, de Bono JP, Smith A, Burnand KG, Channon KM, et al. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(3):433-40.
179. Liu FT, Yang RY, Hsu DK. Galectins in acute and chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1253:80-91.
180. Henderson NC, Sethi T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol Rev*. 2009;230(1):160-71.
181. ten Oever J, Giamarellos-Bourboulis EJ, van de Veerdonk FL, Stelma FF, Simon A, Janssen M, et al. Circulating galectin-3 in infections and non-infectious inflammatory diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(12):1605-10.

182. de Boer RA, van Veldhuisen DJ, Gansevoort RT, Muller Kobold AC, van Gilst WH, Hillege HL, et al. The fibrosis marker galectin-3 and outcome in the general population. *J Intern Med.* 2012;272(1):55-64.
183. Hokama A, Mizoguchi E, Mizoguchi A. Roles of galectins in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14(33):5133-7.
184. Nio-Kobayashi J. Tissue- and cell-specific localization of galectins, beta-galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int.* 2017;92(1):25-36.
185. Saussez S, Kiss R. Galectin-7. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(6):686-97.
186. Brinchmann MF, Patel DM, Iversen MH. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:9186940.
187. Xie Q, Ni M, Wang SC. Galectin-3, A Potential Therapeutic Target For Rheumatoid Arthritis? *Scand J Immunol.* 2018;87(2):108.
188. Pearson MJ, Bik MA, Ospelt C, Naylor AJ, Wehmeyer C, Jones SW, et al. Endogenous Galectin-9 Suppresses Apoptosis in Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Scientific reports.* 2018;8(1):12887.
189. Issa SF, Duer A, Ostergaard M, Horslev-Petersen K, Hetland ML, Hansen MS, et al. Increased galectin-3 may serve as a serologic signature of pre-rheumatoid arthritis while markers of synovitis and cartilage do not differ between early undifferentiated arthritis subsets. *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):80.
190. Dapat IC, Pascapurnama DN, Iwasaki H, Labayo HK, Chagan-Yasutan H, Egawa S, et al. Secretion of Galectin-9 as a DAMP during Dengue Virus Infection in THP-1 Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
191. Liu KT, Liu YH, Chen YH, Lin CY, Huang CH, Yen MC, et al. Serum Galectin-9 and Galectin-3-Binding Protein in Acute Dengue Virus Infection. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6).
192. Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, et al. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *The Journal of clinical investigation.* 2003;112(3):389-97.
193. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *Journal of immunology.* 2000;165(4):2156-64.
194. Kumar S, Jaffar-Bandjee MC, Giry C, Connen de Kerillis L, Merits A, Gasque P, et al. Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection. *Virology journal.* 2012;9:313.
195. Dhanwani R, Khan M, Bhaskar AS, Singh R, Patro IK, Rao PV, et al. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. *Virus research.* 2012;163(2):563-72.
196. Dhanwani R, Khan M, Alam SI, Rao PV, Parida M. Differential proteome analysis of Chikungunya virus-infected new-born mice tissues reveal implication of stress, inflammatory and apoptotic pathways in disease pathogenesis. *Proteomics.* 2011;11(10):1936-51.
197. Hussain KM, Lee RC, Ng MM, Chu JJ. Establishment of a Novel Primary Human Skeletal Myoblast Cellular Model for Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. *Scientific reports.* 2016;6:21406.
198. Sharma A, Balakathiresan NS, Maheshwari RK. Chikungunya Virus Infection Alters Expression of MicroRNAs Involved in Cellular Proliferation, Immune Response and Apoptosis. *Intervirology.* 2015;58(5):332-41.

199. Biomarkers Definitions Working G. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89-95.
200. Lesko LJ, Atkinson AJ, Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:347-66.
201. Lathia CD. Biomarkers and surrogate endpoints: how and when might they impact drug development? *Dis Markers.* 2002;18(2):83-90.
202. Dutta SK, Tripathi A. Association of toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. *Virology.* 2017;511:207-13.
203. Lohachanakul J, Phuklia W, Thannagith M, Thonsakulprasert T, Ubol S. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 with low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009-2010 outbreak in Thailand. *Microbiology and immunology.* 2012;56(2):134-8.
204. Chopra A, Saluja M, Venugopalan A. Effectiveness of chloroquine and inflammatory cytokine response in patients with early persistent musculoskeletal pain and arthritis following chikungunya virus infection. *Arthritis & rheumatology.* 2014;66(2):319-26.
205. Chang AY, Tritsch S, Reid SP, Martins K, Encinales L, Pacheco N, et al. The Cytokine Profile in Acute Chikungunya Infection is Predictive of Chronic Arthritis 20 Months Post Infection. *Diseases.* 2018;6(4).
206. Roques P, Thiberville SD, Dupuis-Maguiraga L, Lum FM, Labadie K, Martinon F, et al. Paradoxical Effect of Chloroquine Treatment in Enhancing Chikungunya Virus Infection. *Viruses.* 2018;10(5).
207. Ninla-Aesong P, Mitarnun W, Noipha K. Proinflammatory Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Persistent Arthralgia and Severe Disease After Chikungunya Virus Infection: A 5-Year Follow-Up Study in Southern Thailand. *Viral immunology.* 2019;32(10):442-52.
208. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg.* 2018;126(5):1763-8.
209. Lai X, Wang H, Cao J, Li Y, Dai Y, Xiang Y, et al. Circulating IL-27 Is Elevated in Rheumatoid Arthritis Patients. *Molecules.* 2016;21(11).
210. Neufert C, Becker C, Wirtz S, Fantini MC, Weigmann B, Galle PR, et al. IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. *Eur J Immunol.* 2007;37(7):1809-16.
211. Wojno ED, Hosken N, Stumhofer JS, O'Hara AC, Mauldin E, Fang Q, et al. A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations. *Journal of immunology.* 2011;187(1):266-73.
212. Peters A, Fowler KD, Chalmin F, Merkler D, Kuchroo VK, Pot C. IL-27 Induces Th17 Differentiation in the Absence of STAT1 Signaling. *Journal of immunology.* 2015;195(9):4144-53.
213. Kulkarni SP, Ganu M, Jayawant P, Thanapati S, Ganu A, Tripathy AS. Regulatory T cells and IL-10 as modulators of chikungunya disease outcome: a preliminary study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(12):2475-81.
214. Oh SA, Li MO. TGF-beta: guardian of T cell function. *Journal of immunology.* 2013;191(8):3973-9.
215. Javelle E, Gautret P, Simon F. Chikungunya, the emerging migratory rheumatism. *The Lancet Infectious diseases.* 2015;15(5):509-10.

216. Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, et al. Development and characterization of IL-21-producing CD4⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(6):1369-79.
217. Busman-Sahay KO, Walrath T, Huber S, O'Connor W, Jr. Cytokine crowdsourcing: multicellular production of TH17-associated cytokines. *J Leukoc Biol*. 2015;97(3):499-510.
218. Kared H, Fabre T, Bedard N, Bruneau J, Shoukry NH. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS pathogens*. 2013;9(6):e1003422.
219. Vivanco-Cid H, Maldonado-Renteria MJ, Sanchez-Vargas LA, Izaguirre-Hernandez IY, Hernandez-Flores KG, Remes-Ruiz R. Dynamics of interleukin-21 production during the clinical course of primary and secondary dengue virus infections. *Immunol Lett*. 2014;161(1):89-95.
220. Iannello A, Boulassel MR, Samarani S, Tremblay C, Toma E, Routy JP, et al. IL-21 enhances NK cell functions and survival in healthy and HIV-infected patients with minimal stimulation of viral replication. *J Leukoc Biol*. 2010;87(5):857-67.
221. Sierakowski S, Cutolo M. Morning symptoms in rheumatoid arthritis: a defining characteristic and marker of active disease. *Scand J Rheumatol Suppl*. 2011;125:1-5.
222. Chagan-Yasutan H, Ndhlovu LC, Lacuesta TL, Kubo T, Leano PS, Niki T, et al. Galectin-9 plasma levels reflect adverse hematological and immunological features in acute dengue virus infection. *J Clin Virol*. 2013;58(4):635-40.
223. Hernandez R, Brown DT, Paredes A. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. *Adv Virol*. 2014;2014:259382.
224. Lai JH, Luo SF, Wang MY, Ho LJ. Translational Implication of Galectin-9 in the Pathogenesis and Treatment of Viral Infection. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
225. Harwood NM, Golden-Mason L, Cheng L, Rosen HR, Mengshol JA. HCV-infected cells and differentiation increase monocyte immunoregulatory galectin-9 production. *J Leukoc Biol*. 2016;99(3):495-503.
226. Sehrawat S, Reddy PB, Rajasagi N, Suryawanshi A, Hirashima M, Rouse BT. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS pathogens*. 2010;6(5):e1000882.
227. Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(4):1557-61.
228. Forsman H, Islander U, Andreasson E, Andersson A, Onnheim K, Karlstrom A, et al. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(2):445-54.
229. Issa SF, Christensen AF, Lindegaard HM, Hetland ML, Horslev-Petersen K, Stengaard-Pedersen K, et al. Galectin-3 is Persistently Increased in Early Rheumatoid Arthritis (RA) and Associates with Anti-CCP Seropositivity and MRI Bone Lesions, While Early Fibrosis Markers Correlate with Disease Activity. *Scand J Immunol*. 2017;86(6):471-8.
230. Cao MY, Wang J, Gao XL, Hu YB. Serum galectin-3 concentrations in patients with ankylosing spondylitis. *J Clin Lab Anal*. 2019:e22914.

9 APÊNDICES

APÊNDICE A

GRUPO CHIKUNGUNYA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa Marcadores moleculares nas manifestações musculoesqueléticas crônicas da febre chikungunya, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Nara Gualberto Cavalcanti, médica reumatologista do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n – Várzea – CEP 50670-901; telefones para contato: 21263576 ou 98648-2259, email: nara.gual@gmail.com.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores Claudia Diniz Lopes Marques, Laurindo Ferreira da Rocha Junior e Maria Galdino da Rocha Pitta, Telefone para contato: 21263576 e está sob a orientação de e Maria Galdino da Rocha Pitta, Telefone 2126-8947, e-mail mgrpitta@gmail.com. Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Descrição: Você possui manifestações articulares relacionadas a infecção pelo vírus Chikungunya e procurou atendimento no ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE. O objetivo desta pesquisa é estudar as características dos pacientes, utilizando um protocolo de investigação para avaliação da doença, como por exemplo o local e o tipo da artrite, as diferenças entre raças, diferenças entre os sexos, se tem outras manifestações da doença, quais tratamentos já foram realizados e qual o tratamento

atual, exames realizados e solicitados por nós. Além disso queremos estudar também como a doença compromete a vida do paciente e que consequências poderá trazer em curto, médio e longo prazo.

Procedimentos que serão realizados: Nas suas consultas de acompanhamento, você irá responder a uma série de perguntas relacionadas à sua doença e aos seus sintomas, e também ao seu tratamento. Logo depois você será examinado, e todos os seus dados serão arquivados em um sistema no computador (como um prontuário eletrônico). Serão feitos os exames laboratoriais de rotina pertinentes aos seu caso (incluindo a sorologia para o vírus Chikungunya). Existe a possibilidade de que, ao longo da pesquisa, seja solicitada coleta de sangue e/ou líquido sinovial (líquido retirado de dentro da articulação) para avaliação de substâncias específicas (citocinas) ou pesquisa de carga viral.

Período de participação no estudo: você será entrevistado e examinado em consultas planejadas com intervalos regulares durante 6 a 12 meses. Caso os sintomas permaneçam após este período, você seguirá sendo acompanhado neste serviço de reumatologia e seus dados continuarão sendo registrados. O pesquisador se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa e se for necessário utilizar os dados em uma outra pesquisa, será pedido um novo consentimento para você após aprovação no comitê de ética.

RISCOS diretos para o voluntário: os riscos que você pode correr ao participar desta pesquisa estão relacionados ao constrangimento que você pode sentir ao ser realizada a entrevista (dificuldade para responder determinadas questões) e o desconforto causado por um tempo mais prolongado de atendimento no dia da inclusão no estudo. Para minimizar estes riscos, as entrevistas serão realizadas por um único pesquisador, em uma sala reservada, com ar condicionado, e tentaremos fazer a entrevista e o exame físico da forma mais rápida possível, para reduzir o seu tempo de espera no ambulatório. Outro desconforto poderá ocorrer em virtude da coleta de sangue de veia periférica e/ou do líquido sinovial, ocasionando dor leve a moderada (a depender da sensibilidade individual) e equimose (arroxamento) na região da coleta. Para minimizar estes riscos, as coletas serão realizadas por pessoa treinada no procedimento e orientações serão dadas para evitar que os desconfortos ocorram.

BENEFÍCIOS diretos e indiretos para os voluntários: Você terá benefício direto pela sua participação no estudo, recebendo atendimento, tratamento e acompanhamento médico durante todo o período em que estiver participando. Como benefício indireto, sua participação no estudo e utilização de seus dados poderão ajudar no melhor entendimento das manifestações reumatológicas associadas à infecção pelo vírus Chikungunya, podendo enriquecer o conhecimento na literatura médica e beneficiar futuros pacientes afetados quanto ao seu manejo.

Você tem a liberdade de decidir se quer ou não ceder seus dados de prontuário para o presente estudo. Independente de você decidir (se quer ou não participar) isso não vai levar a nenhuma alteração no seu tratamento ou na maneira como você é tratado na instituição. Todos os dados levantados serão usados somente para essa pesquisa e nós garantimos o completo sigilo das informações. É garantida sua liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Você irá receber uma via deste termo de consentimento.

Armazenamento das informações: Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa obtidos de sua entrevista e dados do seu prontuário, ficarão armazenados em um sistema no computador sob a responsabilidade da pesquisadora Nara Gualberto Cavalcanti, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos.

O Sr./Sra. poderá solicitar, se assim quiser, o relatório final da pesquisa que fez parte. Também, cópias de todos os resultados dos exames complementares realizados nesta pesquisa poderão ser solicitadas ao pesquisador.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida Prof. Moraes Rego s/n – 3º Andar- Cidade Universitária, Recife- PE, Brasil CEP: 50670-420, Tel.: (81) 2126.3743 – e-mail: cephcufpe@gmail.com).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar da pesquisa Marcadores moleculares nas manifestações musculoesqueléticas crônicas da febre chikungunya, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:Nome:

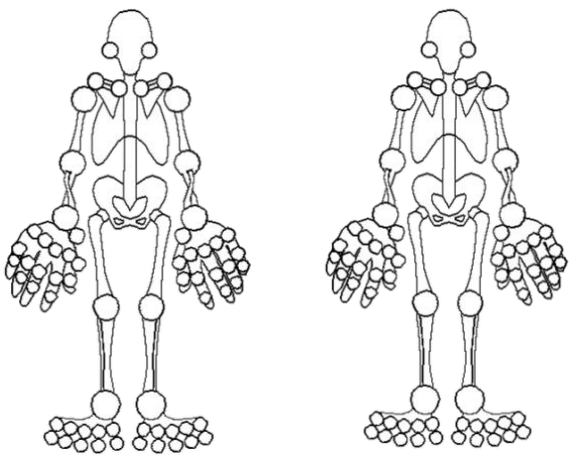
Assinatura: Assinatura:

APÊNDICE B

FICHA CLÍNICA CHIKUNGUNYA CONSULTA DE INCLUSÃO		
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO		
✓ Febre de início súbito maior que 38,5°C + artralgia ou artrite intensa de início agudo, não explicado por outras condições, sendo residente ou tendo visitado áreas endêmicas ou epidêmicas até duas semanas antes do início dos sintomas ou que tenha vínculo epidemiológico com caso confirmado		
CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO		
• Não consentimento em participar do estudo ou presença de outras doenças crônicas infecciosas ou neoplasias		
Data:	Registro:	ID:
Nome:		
Data de nascimento:		Idade:
Telefone:		
Cidade:	1. Zona urbana () 2. Zona rural ()	1. Fem () 2. Masc ()
Renda familiar mensal 1. < 1 SM () 2. 1 até 2 SM () 3. > 2 a 4 SM () 4. > 4 SM ()	Escolaridade 1. Analfabeto () 2. Ensino fundamental () completo () incompleto 3. Ensino médio () completo () incompleto 4. Ensino superior () completo () incompleto	
Cor: 1. Branca () 2. Preta () 3. Parda () 4. Amarela () 5. Indígena ()		
Ocupação:		
Afastado do trabalho pela Chikungunya? 1. Sim () 2. Não () Por quantos dias? Deixou de realizar atividades cotidianas/em casa devido à Chikungunya 1. Sim () 2. Não () Por quantos dias?		
COMORBIDADES PRÉVIAS (1 para SIM; 2 para NÃO)		
() HAS () DM () DLP () DCV () ICC () Tireoideopatia () Asma () DPOC () Psoríase () Olho seco () Uveíte () Obesidade () DRC Outra: _____ () Tabagismo atual () Tabagismo inativo () Nunca fumou Carga tabágica (maços/dia x anos) _____ Etilismo: 1. Sim 2. Não () (15 doses/semana para os homens e 10 doses/semana para mulheres - Uma dose equivale a aproximadamente 285 ml de cerveja, 120 ml de vinho e aproximadamente 30 ml de destilado (whisky, vodka, pinga)).		

Em caso de doença reumatológica prévia, preencher TAMBÉM o ANEXO A			
ANAMNESE GERAL			
Data de início dos sintomas ____ / ____ / ____			
Febre	1. Sim () 2. Não ()	Úlceras*	1. Sim () 2. Não ()
Perda de peso	1. Sim () 2. Não () Quantificar:	Edema de MMII	1. Sim () 2. Não ()
Anorexia	1. Sim () 2. Não ()	Edema de MMSS	1. Sim () 2. Não ()
Exantema	1. Sim () 2. Não ()	Alteração cor extremidades*	1. Sim () 2. Não ()
Prurido	1. Sim () 2. Não ()	Dor nas costas	1. Sim () 2. Não ()
Fadiga	1. Sim () 2. Não ()	Queixas oculares*	1. Sim () 2. Não ()
Xerose	1. Sim () 2. Não ()	Diarreia	1. Sim () 2. Não ()
Bolhas	1. Sim () 2. Não ()	Náuseas	1. Sim () 2. Não ()
Queilite	1. Sim () 2. Não ()	Vômitos	1. Sim () 2. Não ()
Cefaleia	1. Sim () 2. Não ()		
Parestesias	1. Sim () 2. Não () (se sim, responder o DN4- ANEXO B) Resultado:		
*Caso o paciente apresente úlceras, alteração de cor de extremidades ou queixas oculares, descreva as características:			
ANAMNESE - QUADRO ARTICULAR			
Duração total em semanas:			
Intensidade da dor inicial (EVA 0-10):			
Intensidade da dor atual (EVA 0-10):			
Artralgia	1. Sim () 2. Não ()	Cervicalgia	1. Sim () 2. Não ()
Artrite	1. Sim () 2. Não ()	Lombalgia	1. Sim () 2. Não ()

Padrão de acometimento articular	1. Mono () 2. Oligo () 3. Poli ()	Dorsalgia	1. Sim () 2. Não ()
Forma de acometimento articular	1. Migratório () 2. Aditivo ()		
Rigidez pós repouso (matinal)	1. Sim () 2. Não ()	Duração	1. <30min () 2. 30-60min () 3. >1h ()
Intensidade (EVA 0-10):			
MEDICAÇÕES INICIADAS APÓS A INFECÇÃO			
Analgésicos	1. Não () 2. Prévio () 3. Atual ()	Corticosteróides	1. Sim () 2. Não ()
AINEs	1. Não () 2. Prévio () 3. Atual ()	Qual? 1.() Pred 2.() Dexa 3.() Outro _____	
Opióides	1. Não () 2. Prévio () 3. Atual ()	Dose: mg/dia	
		Tempo: dias	
Antimalárico	1. Não () 2. Prévio () 3. Atual ()	Houve melhora?	1. Sim () 2. Não () 3. Parcial ()
Antineuropático [#]	1. Não () 2. Prévio () 3. Atual ()	Mais de um curso?	1. Sim () 2. Não ()
Relaxante muscular	1. Não () 2. Prévio () 3. Atual ()	Quantos?	1. Dois () 2. Três () 3. > Três ()
[#] Amitriptilina, gabapentina, pregabalina, carbamazepina			
EXAME FÍSICO			
PA=			
Pele			
Eritema	1. Sim () 2. Não ()	Úlcera oral	1. Sim () 2. Não ()
Rash morbiliforme	1. Sim () 2. Não ()	Lesões vesicobolhosas	1. Sim () 2. Não ()
Hiperpigmentação (recente)	1. Sim () 2. Não ()	Descamação das palmoplantar	1. Sim () 2. Não ()
Eritema multiforme	1. Sim () 2. Não ()	Pápulas	1. Sim () 2. Não ()
Eritema nodoso	1. Sim () 2. Não ()	Erupções liquenóides	1. Sim () 2. Não ()
Petéquias	1. Sim () 2. Não ()		

Piora de lesões cutâneas pré-existentes – (descreva):			
Vascular			
Edema	1. Sim () 2. Não ()	Linfangite	1. Sim () 2. Não ()
Localização 2. MMSS ()	1. MMII ()	Úlcera	1. Sim () 2. Não ()
Quantificar: (1+ a 4+)			
Articular			
CONTAGEM ARTICULAR <i>(relate todas as articulações dolorosas/edemaciadas, não apenas as do DAS28).</i>			
		Outras alterações de exame físico? 1. Sim () 2. Não ()	
DOR: _____		EDEMA: _____	
EVA médico: _____		EVA paciente: _____	
COMPLICAÇÕES			
Complicações pós infecciosas (descreva qualquer alteração neurológica, quadros atípicos, sinais de gravidade usando a maior quantidade de informação possível):			
EXAMES LABORATORIAIS			
<i>Preencha este quadro caso o paciente tenha algum exame na primeira consulta que tenha sido realizado após o início do quadro infeccioso</i>			
Exame	Resultado	Data	OUTROS
Ht/ Hb			
Leucócitos			
LT (numero)			
Segmentados			
Plaquetas			

proteína C reativa/VSH			
Ureia			
Creatinina			
TGO			
TGP			
Gama-GT			
FA			
DHL			
CPK			
CONDUTA			
Solicitar os seguintes exames laboratoriais: Hemograma; VSH; proteína C reativa; TGO; TGP; gama-GT; FA; Ureia; Creatinina; CPK; DHL; Colesterol total e frações Outros a critério clínico:			
<i>Caso o paciente tenha mais de três de meses de evolução, solicitar RX de mãos, pés ou área comprometida</i> RX de mãos () RX dos pés () RX_____ () USG () Local:			
Medicações prescritas			
() Prednisona	Dose:	() SSZ	Dose:
() HCQ	Dose:	() AINE	
() Metotrexate	Dose:	() Antineuropático	Qual? Dose:
() Analgésico comum	Qual? Dose?	() Analgésico opióide	Qual? Dose?
Observações			
Foi coletado sangue? () sim () não Hora da coleta:_____			

QUESTIONÁRIO PARA DIAGNÓSTICO DE DOR NEUROPÁTICA (DN4)

O questionário é composto por 4 grupos de perguntas. A partir das respostas dadas às perguntas, ao final do questionário é calculado um escore (com valor entre 0 e 10). Cada resposta afirmativa a uma pergunta acrescenta um ponto ao escore; as respostas negativas não influenciam o valor do escore. **Um escore maior ou igual a 4 é um indicativo de dor neuropática.**

Por favor, nas quatro perguntas abaixo, complete o questionário marcando uma resposta para cada número.

1. A sua dor tem uma das seguintes características?

Queimação: ☐ sim ☐ não

Frio doloroso: ☐ sim ☐ não

Choque elétrico: ☐ sim ☐ não

2. Há presença de um ou mais dos seguintes sintomas na mesma área de sua dor?

Formigamento ☐ sim ☐ não

Alfinetada ou agulhada ☐ sim ☐ não

Adormecimento ☐ sim ☐ não

Coceira ☐ sim ☐ não

3. A dor está localizada numa área onde o exame físico pode revelar uma ou mais das seguintes características?

Hipoestesia ao toque ☐ sim ☐ não

Hipoestesia a picada de agulha ☐ sim ☐ não

4. Na área dolorosa, a dor pode ser causada ou aumentada por:

Escovação ☐ sim ☐ não

ESCORE TOTAL:

ANEXOS

A) Manuscrito publicado *Acta Tropica*

IL-27 in patients with Chikungunya Fever: a possible chronicity biomarker?

B) Manuscrito publicado *Virus Research*

Increased serum levels of galectin-9 in patients with chikungunya fever



IL-27 in patients with Chikungunya fever: A possible chronicity biomarker?

Nara Gualberto Cavalcanti^{1,2,*}, Kamila Melo Vilar², Angela Luzia Branco Pinto Duarte^{1,2},
Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo², Michelly Cristiny Pereira², Ivan da Rocha Pitta²,
Claudia Diniz Lopes Marques¹, Maira Galdino da Rocha Pitta²

1- Serviço de Reumatologia – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2 - Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino (Nupit-SG)/ UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife, PE, CEP: 50670-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Chikungunya fever

IL-27

IL-17A

TGF- β

IL-29

Chronic Chikungunya fever symptoms

ABSTRACT

Background/purpose: Although many patients with chikungunya virus disease (CHIKVD), an arboviral disease characterized by sudden fever and incapacitating polyarthralgia, develop chronic articular symptoms, the mechanisms involved in CHIKVD's chronification and its possible biomarkers remain poorly understood. Interleukin (IL)-17A, IL-21, IL-22, IL-29, and transforming growth factor (TGF)- β have been implicated in the pathogenesis of other inflammatory joint diseases, including rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis. Since chronic manifestations of CHIKVD share many clinical and immunological characteristics with those diseases, we assessed the serum levels of those cytokines and analyzed their associations with clinical manifestations in patients with CHIKVD.

Methods: We evaluated 45 patients (36 female, mean age: 55.2 ± 13.8 years) with CHIKVD serologically confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), articular manifestations upon evaluation, and no previous history of inflammatory rheumatologic diseases, along with 49 healthy age- and sex-matched controls. We tested anti-Chikungunya IgM and IgG antibodies and measured IL-17A, IL-21, IL-22, IL-27, IL-29, and TGF- β serum levels with specific ELISA kits.

Results: IL-27, IL-17A, and IL-29 appeared in most patients but not in controls. IL-27 serum levels were higher in patients with chronic symptoms (median: 523.0 pg/mL [62.5–1,048]) than in ones in the acute or subacute stage (median: 62.5 pg/mL [62.5–483.8], $p = .008$). In patients with CHIKVD, we found significant correlations between IL-27 levels and tender joint counts ($r = .32$, $p = .006$), along with associations between IL-17A levels and swollen joint counts ($r = .315$, $p = .0352$). Furthermore, patients with arthritis had higher IL-17A levels (median: 23.14 pg/mL [20.6–25.86]) than ones without (median: 20.29 pg/mL [3.91–22.43], $p = .0352$). We did not detect IL-22 in either group or IL-21 in patients with CHIKVD.

Conclusion: Serum levels of IL-17A, IL-27, and IL-29 were high in patients with CHIKVD and had important associations with articular manifestations, which might indicate the inflammatory nature of Chikungunya infection in patients with joint symptoms and the roles of those cytokines in the disease's pathophysiology.

1. Introduction

Chikungunya (CHIK) fever, caused by an RNA alpha virus of the Togaviridae family and transmitted by the mosquitoes *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Deeba et al., 2016), is characterized by a high chronification rate of musculoskeletal symptoms. Whereas patients with CHIKVD may develop relapsing or persistent arthritis, some may develop erosive arthritis, similar to rheumatoid arthritis, or an enthesopathic disease resembling either psoriatic arthritis or spondyloarthritis

(Bouquillard and Combe, 2009; Chaaithanya et al., 2014). However, the immunological mechanisms causing persistent articular symptoms in patients with CHIKVD remain unclear, given the clinical diversity and variable characteristics of the disease's phases that could indicate different immunological mechanisms at play. Since interleukin (IL)-17A, IL-21, IL-22, IL-29, and transforming growth factor (TGF)- β have been implicated in the pathogenesis of other inflammatory joint diseases, we measured the levels of those cytokines and analyzed their associations with clinical manifestations in subacute and chronic phases of CHIKVD arthropathy.

* Corresponding author.

Email address: nara.gual@gmail.com (N.G. Cavalcanti1,2)

2. Methods

We evaluated 45 patients, all older than 18 years, with musculoskeletal manifestations of CHIKVD. To investigate whether the phase of clinical presentation was associated with differences in cytokine levels, we studied cytokine levels in patients in the subacute (3–12 weeks) and chronic phases (>12 weeks) of CHIKVD, serologically confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA - Euroimmun, Luebeck, Germany) of IgM, IgG, or both. We excluded individuals diagnosed with rheumatological disease or with any history of previous joint complaints from our sample. We also recruited 49 age- and sex-matched healthy individuals without any clinical history of CHIKVD symptoms as controls. Trained rheumatologists examined all participants and collected blood samples, after which participants completed a questionnaire addressing clinical manifestations.

We collected serum samples between April 2016 and February 2017 and measured the serum levels of IL-17A (detection limit [dL]: 3.91–500 pg/mL), IL-21 (dL: 7.81–1000 pg/mL), IL-22 (dL: 15.63–1000 pg/mL), IL-27 (dL: 62.5–8000 pg/mL), IL-29 (dL: 7.81–1000 pg/mL), and TGF- β (dL: 15.63–1000 pg/mL) by ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA). We also analyzed clinical and cytokine-related data with GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA) and recorded results as medians with interquartile variance for nonparametric data and as means with standard deviation (SD) for parametric data. We analyzed differences between groups with the Mann–Whitney *U* test, in which *p* < .05 indicated statistical significance. For correlation analyzes, we used Spearman's coefficient index. Since symptoms of CHIKVD may wax and wane over time, we also aimed to investigate the levels of measured cytokines for associations with other clinical aspects, including reported recent history of arthritis, presence of arthritis or joint pain upon clinical evaluation, and global level of pain measured by the visual analog scale (VAS).

We conducted the study according to the principles of the Declaration of Helsinki, and the local ethics committee approved our study design (CEP/CCS/UFPE; CNS resolution no. 466/2012, CAE 54275516.9.1001.5208, n1.479.853, 06/04/2016). Each participant consented to participate by signing an informed consent form.

3. Results

Our sample comprised 45 patients with CHIKVD aged 55.2 ± 13.8 years on average, of whom 36 (80%) were women, along with 49 controls aged 51 ± 8.95 years on average, of whom 37 (74.51%) were women. Mean disease duration was 12 weeks (range: 8.5–20); 24 (53.33%) patients were in the subacute phase of the disease, whereas 21 (46.67%) were in the chronic phase. All patients with CHIKVD tested positive for CHIKV IgG and 28 (62.22%) tested positive for CHIKV IgM. All patients reported experiencing persistent joint pain, and the median number of painful joints upon clinical evaluation was eight (range: 3.0–21.5), whereas the median number of swollen joints

Table 1

Serum cytokine levels in patients with chikungunya virus disease (CHIKVD) and healthy controls.

Serum cytokine ^a	Patients with CHIKVD	Controls	<i>p</i> ^{**}
IL-27 (pg/mL)	210.0 (62.5–667.5)	62.5 (62.5–62.5)	<.0001
IL-17A (pg/mL)	22.29 (20–25.43)	3.91 (3.91–3.91)	<.0001
IL-29 (pg/mL)	62.5 (62.5–1040.0)	7.81 (7.81–7.81)	<.0001
TGF- β (pg/mL)	40.4 (52.61–358.4)	59.0 (15.63–100.0)	.0032
IL-21 (pg/mL)	7.81 (7.81–7.81)	57.17 (7.81–140.1)	<.0001
IL-22 (pg/mL)	15.63 (15.63–15.63)	15.63 (15.63–15.63)	0.4825

^a Median/interquartile range. IL- interleukin, TGF- β – transforming growth factor beta.

was two (range: 0.0–3.5). Thirty-four patients (75%) reported previously using corticosteroids and 28 (62.22) reported previously using nonsteroidal anti-inflammatory drugs. No patient reported using corticosteroids at the time of blood sample collection.

In patients with CHIKVD, levels of IL-27, IL-17A, IL-29, and TGF- β were significantly greater than in controls, whereas we detected IL-21 only in controls. No difference in IL-22 levels emerged between patients and controls (Table 1).

3.1. Symptom persistence and cytokine levels

We found difference only for IL-27, levels of which were significantly higher in the chronic than in the subacute phase of CHIKVD. In fact, symptom persistence (in weeks) directly correlated with IL-27 levels ($R = .441$, $p = .024$), as shown in Fig. 1A, as did testing positive for IgM ($R = .404$, $p = .0059$). Other cytokines analyzed did not reveal any correlation with symptom persistence (IL-17: $R = .103$, $p = .5$; IL-29: $R = .149$, $p = .32$; TGF- β : $R = .12$, $p = .46$).

3.2. Clinical aspects and cytokine levels

An inverse correlation emerged between IL-27 levels and the number of painful joints upon clinical evaluation ($R = .298$, $p = .0466$), as well as between IL-17A levels and the number of swollen joints upon clinical evaluation ($R = .315$, $p = .0352$). Patients with moderate or intense pain, measured with the visual analogue scale (VAS), had higher IL-27 levels than patients with no or low levels of pain. Although IL-29 and TGF- β levels did not correlate with any tested clinical data, patients with arthritis had higher IL-17A levels (median: 23.14 pg/mL [20.6–25.86]) than those who did not (median: 20.29 pg/mL [3.91–22.43] pg/mL). We did not observe age- or sex-related variations in cytokine levels.

4. Discussion

Our results indicate that IL-27 levels are high in patients with CHIKVD and may relate to the disease's chronification. IL-17A, IL-29, and TGF- β levels were also elevated in the subacute and chronic phases of the disease.

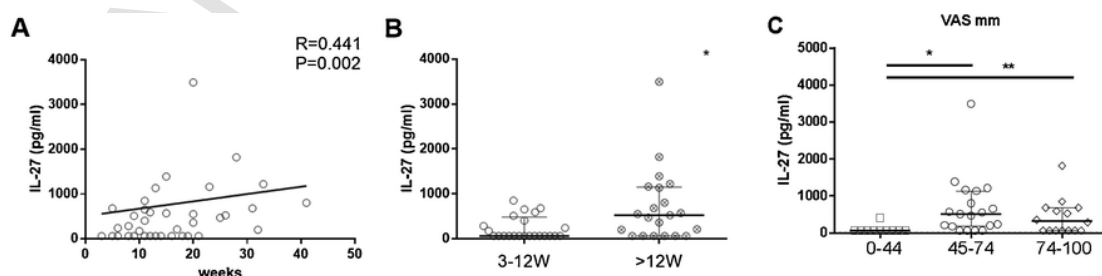


Fig. 1. (A) Correlation between disease duration and interleukin (IL)-27; (B) IL-27 levels by subgroup (subacute $\times$ chronic); (C) IL-27 levels by visual analog scale (VAS) rating of pain (0–44: no or mild pain, 45–74: moderate pain, 75–100: intense pain); **p* < .01.

In literature on CHIKVD, we could not find any data contextualizing the roles of IL-27, IL-22, IL-21, and IL-29 in the pathophysiological process of CHIKVD chronification or in its acute or subacute phases. The production of IL-27, a member of the IL-6 and IL-12 family, may be initiated in antigen presenting cells, from monocytic/macrophagic lineages, which may function in chronic CHIKVD as a reservoir for the virus or as catalysts of inflammation processes amid the presence of a viable virus, viral RNA, or viral antigens inside cells (Labadie et al., 2010). IL-27 is a pleiotropic cytokine which may act in a pro-inflammatory manner, downregulating the Treg response by inhibiting the generation of Foxp3-expressing Treg (Wojno et al., 2011); by increasing Th1 response (which occurs during initial phases of CHIKVD, and during CHIKVD's progression); or by enhancing Th17 response in the absence of STAT1 (Peters et al., 2015). In an anti-inflammatory manner, IL-27 may be involved in downregulating Th17 response via STAT1 (Peters et al., 2015), and may signal to T naïve cells in a STAT-3 dependent manner, promoting differentiation to IL-10 producing CD4 + Tr-1 lymphocytes (Wojno et al., 2011). The last mechanism in particular may play a role in the negative correlation between IL-27 and number of painful joints. We hypothesize that the Th17 response may play a role in CHIKVD; however, because we did not design our study to address that relationship, additional studies are necessary to investigate the immunopathological mechanisms involved in the rise of IL-27.

Data purporting cytokine production during the chronic phase of CHIKVD remain limited, for most researchers have focused on the acute or subacute phases (Chirathaworn et al., 2010, 2013; Ng et al., 2009; Teng et al., 2015). Concerning IL-17A, for example, Lohachanakul et al. did not observe any difference in IL-17A levels between patients with CHIKVD and controls (Lohachanakul et al., 2012); however, they collected serum samples at Days 1 and 30 of the disease, and as demonstrated by Chow, the rise in IL-17A levels occurs only after Week 4 (Chow et al., 2011). The Th17 response and, more specifically, IL-17A are involved in the immunopathogenesis of other chronic inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and psoriatic arthritis, and anti-IL-17 antibodies are even used to treat the last two diseases (Miossec, 2009).

As demonstrated in animal models, higher TGF- β levels appear to relate to increased susceptibility to viral persistence and, consequently, to chronic forms of viral diseases, especially among elderly individuals. Uhrlaub et al. observed the decreased production of CXCL9 and increased TGF- β in old mice, both associated with impairments in B and T cell responses, failure to produce an effective specific neutralizing antibody response, and, consequently, impaired response in virus cleaning (Uhrlaub et al., 2016). Some of those alterations improved by blocking TGF- β , which reduced later swelling of the joint or fat pad. The authors also did not found regulatory T cells (Tregs) in CHIKV-infected mice, which suggests that observed improvements were direct effects of the cytokine milieu. However, the authors did not specify whether they sought Tregs in the blood, lymph nodes, swollen joints, or all of those sources, or in which phase of the disease, even though Tregs may increase only at sites of inflammation and does not appear to increase during acute viral infections (Veiga-Parga et al., 2013).

In humans, Kulkarni et al. found higher TGF- β levels in PBMC culture of patients with acute or chronic CHIKVD than in PBMC's of controls, with high levels even in recovered patients, among whom previously low levels of Tregs and IL-10 also increased (Kulkarni et al., 2017). In studies of genic expression, other authors have observed the upregulation of genes involved in the TGF- β pathway (Saxena et al., 2013; Parashar et al., 2018). We found high titers of TGF- β in patients with subacute or chronic CHIKVD, although no correlation with age or other clinical data. The pleiotropic function of TGF- β complicates analyzing its precise role in CHIKVD's immunopathogenesis, for it may act directly upon T cells by either inducing tolerance or promoting the higher survival of naïve T cells in the peripheral blood. Indirectly, TGF-

β can also induce T cell tolerance by stimulating the regulatory response of Tregs or, in the opposite direction, by stimulating the inflammatory response after inducing the Th17 pathway (Oh and Li, 2013). In any case, the direction of TGF- β 's action depends upon the environment, the cytokine pool, and the stimulatory cell predominance. For instance, under IL-2 and retinoic acid stimuli, TGF- β induces the T regulatory response, while the increase of IL-6 directs TGF- β 's action toward stimulating Th17 differentiation (Yang et al., 2008). In the immunopathogenesis of CHIKVD, both IL-6 and IL-2 levels have been found high (Ng et al., 2009; Chang et al., 2018).

Since chronic CHIKVD usually presents as intermittent periods of inflammatory activity in the joints, the imbalance of inflammatory and suppressive scenarios could play a physiopathogenic role, and investigating those scenarios could illuminate understandings and even treatments of chronic CHIKVD, as suggested by Lee et al. (Lee et al., 2015).

Interesting, our data also indicated an absence of elevated IL-21 levels in patients with CHIKVD, whose IL-21 levels were significantly lower than those of controls. IL-21 is involved in inflammation and autoimmunity via lymphocyte differentiation, proliferation, and increased activation. In the Th17 response, IL-21 may also function as an inflammatory amplifier in a positive feedback loop; it is produced by Th17 lymphocytes but also stimulates the Th17 path by decreasing IL-2, which shifts Th17 production to Tregs, and by inducing IL-17's production in synergy with TGF- β . Accordingly, its elevation is expected in patients with CHIKVD. It is also known that IL-21 plays a crucial role in controlling and resolving viral infections and that, in its absence, at least in animal models, viral infections become chronic (Vivanco-Cid et al., 2014; Iannello et al., 2010). As Suto et al. have suggested (Suto et al., 2008), high levels of TGF- β might be involved in the lower levels of IL-21, meaning that the role of IL-21 suppression in chronic CHIKVD warrants additional research, as do its levels in patients with CHIKVD who did not experience chronic forms of the disease.

5. Conclusion

Serum levels of IL-27 were significantly higher in patients with CHIKVD than in controls and correlated with the persistence of CHIKVD and arthralgia. IL-17A, IL-29, and TGF- β were also significantly elevated in patients, and in particular, IL-17A correlated with arthritis. Such findings might reflect the high inflammatory character of CHIKVD and, in any case, recommend additional investigations of the role of the Th17 pathway in the pathogenesis of CHIKVD, since many of the examined cytokines are involved therein.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.005>.

References

- Bouquillard, E., Combe, B., 2009. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. *Joint Bone Spine revue du rhumatisme* 76 (6), 654–657.
- Chaaithanya, I.K., Muruganandam, N., Raghuraj, U., Sugunan, A.P., Rajesh, R., Anwesh, M., et al., 2014. Chronic inflammatory arthritis with persisting bony erosions in patients following chikungunya infection. *Indian J. Med. Res.* 140 (1), 142–145.
- Chang, A.Y., Tritsch, S., Reid, S.P., Martins, K., Encinales, L., Pacheco, N., et al., 2018. The cytokine profile in acute Chikungunya infection is predictive of chronic arthritis 20 months post infection. *Diseases* 6 (4).
- Chirathaworn, C., Rianthavorn, P., Wuttirattanakowit, N., Poovorawan, Y., 2010. Serum IL-18 and IL-18BP levels in patients with Chikungunya virus infection. *Viral Immunol.* 23 (1), 113–117.
- Chirathaworn, C., Poovorawan, Y., Lertmaharit, S., Wuttirattanakowit, N., 2013. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. *Asian Pacific J. Trop. Med.* 6 (8), 631–634.
- Chow, A., Her, Z., Ong, E.K., Chen, J.M., Dimatatac, F., Kwek, D.J., et al., 2011. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-

- 6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Infect. Dis.* 203 (2), 149–157.
- Deeba, F., Islam, A., Kazim, S.N., Naqvi, I.H., Broor, S., Ahmed, A., et al., 2016. Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. *Pathogens Dis.* 74 (3).
- Iannello, A., Boulassel, M.R., Samarani, S., Debbeche, O., Tremblay, C., Toma, E., et al., 2010. Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. *J. Immunol.* 184 (1), 114–126.
- KamLPokK.Y.EngK.E.TanL.K.KaurS.W.W.. *Negl. Trop. Dis.*
- Kulkarni, S.P., Ganu, M., Jayawant, P., Thanapati, S., Ganu, A., Tripathy, A.S., 2017. Regulatory T cells and IL-10 as modulators of chikungunya disease outcome: a preliminary study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36 (12), 2475–2481.
- Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., et al., 2010. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J. Clin. Invest.* 120 (3), 894–906.
- Lohachanakul, J., Phuklia, W., Thannagith, M., Thonsakulprasert, T., Ubol, S., 2012. High concentrations of circulating interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1 with low concentrations of interleukin-8 were associated with severe chikungunya fever during the 2009-2010 outbreak in Thailand. *Microbiol. Immunol.* 56 (2), 134–138.
- Miossec, P., 2009. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes Infect. Institut Pasteur.* 11 (5), 625–630.
- Ng, L.F., Chow, A., Sun, Y.J., Kwek, D.J., Lim, P.L., Dimatatac, F., et al., 2009. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. *PloS One* 4 (1), e4261.
- Oh, S.A., Li, M.O., 2013. TGF-beta: guardian of T cell function. *J. Immunol.* 191 (8), 3973–3979.
- Parashar, D., Paingankar, M.S., More, A., Patil, P., Amdekar, S., 2018. Altered microRNA expression signature in Chikungunya-infected mammalian fibroblast cells. *Virus Genes*
- Peters, A., Fowler, K.D., Chalmin, F., Merkler, D., Kuchroo, V.K., Pot, C., 2015. IL-27 induces Th17 differentiation in the absence of STAT1 signaling. *J. Immunol.* 195 (9), 4144–4153.
- Saxena, T., Tandon, B., Sharma, S., Chameettachal, S., Ray, P., Ray, A.R., et al., 2013. Combined miRNA and mRNA signature identifies key molecular players and pathways involved in chikungunya virus infection in human cells. *PLoS One* 8 (11), e79886.
- Suto, A., Kashiwakuma, D., Kagami, S., Hirose, K., Watanabe, N., Yokote, K., et al., 2008. Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 205 (6), 1369–1379.
- Teng, T.S., Kam, Y.W., Lee, B., Hapuarachchi, H.C., Wimal, A., Ng, L.C., et al., 2015. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute Chikungunya virus infection. *J. Infect. Dis.* 211 (12), 1925–1935.
- Uhrlaub, J.L., Pulko, V., DeFilippis, V.R., Broeckel, R., Streblow, D.N., Coleman, G.D., et al., 2016. Dysregulated TGF-beta production underlies the age-related vulnerability to Chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 12 (10), e1005891.
- Veiga-Parga, T., Sehwat, S., Rouse, B.T., 2013. Role of regulatory T cells during virus infection. *Immunol. Rev.* 255 (1), 182–196.
- Vivanco-Cid, H., Maldonado-Renteria, M.J., Sanchez-Vargas, L.A., Izaguirre-Hernandez, I.Y., Hernandez-Flores, K.G., Remes-Ruiz, R., 2014. Dynamics of interleukin-21 production during the clinical course of primary and secondary dengue virus infections. *Immunol. Lett.* 161 (1), 89–95.
- Wojno, E.D., Hosken, N., Stumhofer, J.S., O'Hara, A.C., Mauldin, E., Fang, Q., et al., 2011. A role for IL-27 in limiting T regulatory cell populations. *J. Immunol.* 187 (1), 266–273.
- Yang, L., Anderson, D.E., Baecher-Allan, C., Hastings, W.D., Bettelli, E., Oukka, M., et al., 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human TH17 cells. *Nature* 454, 350



Increased serum levels of galectin-9 in patients with chikungunya fever

Nara Gualberto Cavalcanti^{a,b,*}, Kamila Melo Vilar^b, Angela Luzia Branco Pinto Duarte^{a,b}, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo^{b,c}, Michelly Cristiny Pereira^{c,d}, Ivan da Rocha Pitta^{b,c}, Claudia Diniz Lopes Marques^a, Maira Galdino da Rocha Pitta^{b,c}

^a Rheumatology Department, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT)/ UFPE, Brazil

^c Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Sueli Galdino (Nupit-SG), Brazil

^d Pharmacology and Physiology Department/ UFPE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Chikungunya Fever
CHIK
musculoskeletal symptoms
Galectin-9
Galectin-3
chronic viral diseases.

ABSTRACT

Chikungunya fever (CHIKF) is an arboviral disease that has caused an epidemic burst of chronic inflammatory joint disease in Latin America in the last few years. Efforts are being spent in understanding the mechanisms by which it may cause such articular damage and in determining possible biomarkers of the disease. Galectins (GAL) are a family of animal lectins with an affinity for beta-galactosides. They have multiple functions including working as receptors in innate immunity and as a control for inflammatory responses in both innate and adaptive immunity. They regulate functions of immune cells, such as lymphocytes and macrophages, which have a main role in the chikungunya inflammatory process. Galectins are also involved in chronification of viral diseases, participate in the immunopathogenesis of chronic joint diseases such as rheumatoid arthritis, and have a role in inflammation in other arboviral diseases, such as dengue. Thus, we intended to determine the serum levels of galectin-1, -3, -4, -7, and -9 in patients with subacute and chronic articular manifestations of CHIKF and to evaluate their associations with clinical manifestations. We evaluated 44 patients with clinical manifestations of CHIKF and serological confirmation with IgM and/or IgG chikungunya virus (CHIKV) antibodies. Forty-nine age- and gender-matched healthy individuals served as controls. Anti-CHIKV IgM and IgG antibodies and galectins serum levels were measured by ELISA. We found higher levels of GAL-9 (patients median 2192 [1500–2631] pg/mL, controls median 46.88 [46.88–46.88] pg/mL, $p < 0.0001$) and lower levels of GAL-3 (patients median 235.5 [175.5–351.8] pg/mL, controls median 2236.0 [1256.0–2236.0] pg/mL, $p < 0.0001$) in patients than in controls. There was no statistical difference in levels of GAL-1, -4 and -7 between patients and control groups. There was no difference in GAL-9 serum levels between patients with subacute or chronic symptoms (median 2148 [1500–2722] pg/mL x 2212 [1844–2500] pg/mL, $p = 0.3626$). A significant association of GAL-9 with joint stiffness, both in its duration and intensity, was found. These results may reflect the participation of GAL-9 in the immunopathogenesis of the inflammatory process in chikungunya fever, as morning stiffness may reflect the systemic inflammatory process.

1. Introduction

Chikungunya fever (CHIKF) is an arboviral disease caused by the chikungunya virus (CHIKV), and it recently caused an outbreak of continental proportions. The epidemic burst spanned all Latin America, including Brazil, where 700,000 individuals were infected from 2014 to 2019 (Ministério da Saúde, Brasil, 2020). These arboviruses are characterized by acute, intense inflammatory manifestations, evolving with a high symptom chronification rate, with musculoskeletal manifestation

predominance, causing critical physical disability and significantly impacting patients' quality of life.

In the physiopathologic mechanisms of CHIKV disease, the following participate: pro-inflammatory cytokines (IFNs I α and β , IFN γ , IL-4, IL-6, IL-2, TNF- α , TGF- β , IL-12, IL-17A, IL-18, and IL-27), anti-inflammatory cytokines (IL-1Ra, IL-10, and IL-13), chemokines (MCP-1, -2 and -3, MIP-1 α and MIP-1 β), and growth factors (GM-CSF) (Teng et al., 2015; Cavalcanti et al., 2019). From a cellular point of view, the participation of fibroblastic, neutrophilic, and monocytic-macrophagic

* Corresponding author at: Serviço de reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), prédio dos ambulatórios, térreo. Brazil. Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife - PE.
E-mail address: nara.gual@gmail.com (N. Gualberto Cavalcanti).

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198062>

Received 26 December 2019; Received in revised form 19 May 2020; Accepted 10 June 2020

Available online 18 June 2020

0168-1702/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

lineages T CD4, CD8, NK, and B lymphocytes and osteoclastic activation occur in different degrees of intensity, according to the phase of the disease (Thanapati et al., 2017; Thangamani et al., 2010; Teo et al., 2013; Tanabe et al., 2018).

The chronification process is not completely understood. Autoimmune and auto-inflammatory mechanisms are considered to take part in its development, possibly induced by molecular mimicry to viral antigens. This hypothesis is supported by clinical and physiopathological resemblances between chronic chikungunya and rheumatoid diseases such as rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis (Tanay, 2017; Arroyo-Avila and Vila, 2015).

Galectins (GAL) are of the family of animal origin Lectins, with high affinity for beta-galactosides. They have multiple functions in the regulation of cellular and tissular homeostasis and are capable of recognizing glycidic chains in glycolipids and glycoproteins. They are, for instance, involved in the modulation of cell-cell and cell-matrix interactions (adhesion and signaling) (10). They participate in the process of embryonic development, angiogenesis, tissue regeneration, regulation of cell cycle, adipogenesis, and homeostatic control of tissues. Such diversity of function is dependent on the biochemical conditions of the medium and presence or absence of specific ligands in the tissue microenvironment. The galectin concentration is also relevant for its function, as in high concentration a galectin may bind to an increased number of different ligands, and in low concentration the possible ligands on the cell surface and tissue matrix are more limited (Almkvist and Karlsson, 2002; Barondes et al., 1994; Boscher et al., 2011; Cummings et al., 2015). Galectins play multiple roles in the immunological system. They may function as pathogen- or damage-associated molecular pattern (PAMP/DAMP) receptors, taking part in the antiviral and antimicrobial innate response. Galectins may also exert a regulatory role over innate and adaptive immune responses (Vasta, 2009), including the participation of GAL-9 in Th1/Th17 mediated autoimmunity mechanisms (de la Fuente et al., 2012) and involvement of GAL-1, -3 e -9 in viral infections (Merani et al., 2015).

The participation of galectins in the physiopathological process of rheumatologic inflammatory diseases such as RA (Xie et al., 2018; Pearson et al., 2018; Issa et al., 2017a) and other arboviral diseases such as dengue (Dapat et al., 2017; Liu et al., 2016) drives the interest in evaluating their involvement in the pathogenesis of CHIKF. Beyond that, galectins play an established role in the control of diverse macrophagic and lymphocytic functions (Almkvist and Karlsson, 2002; Sano et al., 2000; Liu et al., 2012; Sano et al., 2003), cells that are intensely involved in the pathogenic process of chikungunya arthropathy (Gardner et al., 2010; Kumar et al., 2012). Being a key regulator of apoptosis, galectins may have a role in the process of chikungunya chronic arthropathy, as experimental evidence points to a deregulated apoptotic process in the genesis of this chronic viral infection (Dhanwani et al., 2012, 2011; Hussain et al., 2016; Sharma et al., 2015).

2. Methods

We conducted a cross-sectional study to examine the serum levels of galectin-1, -3, -4, -7, and -9 in patients with subacute and chronic articular manifestations of CHIKF and to evaluate their associations with clinical manifestations. The recruited individuals had visited the rheumatology outpatient clinic at the Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, from April 2016 to February 2017, with complaints of chronic musculoskeletal symptoms or persistent arthralgia/arthritis. Patients originated from areas reporting large chikungunya outbreaks. They had previous histories of abrupt onset fever as well as chills/rigors associated with severe arthralgia or acute arthritis not explained by other conditions. These individuals were screened for the presence of chikungunya-specific IgM and/or IgG antibodies in serum samples (ELISA - Euroimmun, Luebeck, Germany), interviewed, and clinically examined by a rheumatologist. The study

population included a convenience sample of 44 serologically confirmed patients.

All selected individuals were above 18 years of age and had persisting musculoskeletal manifestations of CHIKF: joint pain with or without articular/periarticular edema. The patients were in the period after the acute febrile syndrome, in the subacute (3–12 weeks of disease) or chronic phase of the disease (> 12 weeks of disease). Patients with other rheumatic diseases, previous chronic musculoskeletal complaints, or a known past of chronic serious illness were excluded. As a control group, age- and sex-paired healthy individuals without previous CHIKV infection were selected. The patients and controls were examined by trained rheumatologists; blood samples were collected, and the patients were interviewed regarding clinical manifestations.

Serum levels of GAL-1, -3, -4, -7, and -9 were measured with specific ELISA kits (R&D, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's protocol. The detection limits were Gal-1 156.25–20000 pg/mL, Gal-3 31.25–4000 pg/mL, Gal-4 15.625–2000 pg/mL, Gal-7 93.8–6000 pg/mL, and Gal-9 156–10000 pg/mL.

The statistical analysis of galectins levels and their variation according to clinical manifestations were made with Prisma software version 6.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, San Diego, CA, USA, available online: www.graphpad.com). We presented recorded results as medians with interquartile variance for nonparametric data and as means with standard deviation (SD) for parametric data. We analyzed differences between groups with the Mann–Whitney *U* test. For correlation analysis, we used Spearman's coefficient index. The value of $p < .05$ indicated statistical significance.

We conducted the study according to the principles of the Declaration of Helsinki, and the local ethics committee approved our study design (CEP/CCS/UFPE; CNS resolution no. 466/2012, CAE 54275516.9.1001.5208, n1.479.853, 06/04/2016). Each participant consented to participate by signing an informed consent form.

3. Results

3.1. Clinic-epidemiological data

We evaluated 44 patients over 18 years old with musculoskeletal manifestations of CHIKF in the subacute (3–12 weeks) and chronic phases (> 12 weeks), and 49 controls, age- and sex-paired. The clinical and epidemiologic data of patients and controls are exhibited in Table 1.

GAL-9 was detected in most patients (median 2192 [1500–2631] pg/mL) but not in the controls (median 46.88 [46.88–46.88] pg/mL), $p < 0.0001$. We found decreased serum levels of GAL-3 in patients (median 235.5 [175.5–351.8] pg/mL) compared to controls (median 2236.0 [1256.0–2236.0] pg/mL), $p < 0.0001$. No significant statistical difference in GAL-1, GAL-4, or GAL-7 levels was found between patients and controls (Fig. 1). We did not find correlations between galectins 3

Table 1
Demographic data and clinical aspects of groups.

Demographic / Clinical Data	CHIKF Patients (n = 44)	Controls (n = 49)
Female Sex n(%)	36 (80 %)	37 (74.51 %)
Age (media, years)	55.2 ± 13.8	51 ± 8.95
Disease duration (weeks)*	12 (8.5–20)	
Patients in subacute phase (n,%)	23 (53.33 %)	
Patients in chronic phase (n,%)	21 (46.67 %)	
IgG + (n,%)	44 (100 %)	
IgM + (n,%)	28 (62.22 %)	
Swollen joints (n)**	8 (3–21.5)	
Painful joints (n)**	2 (0–3.5)	
Previous corticosteroid use	34 (75 %)	
Previous NSAIDs use (n,%)	28 (62.22 %)	

* Median / interquartile variation.

** Physical exam.

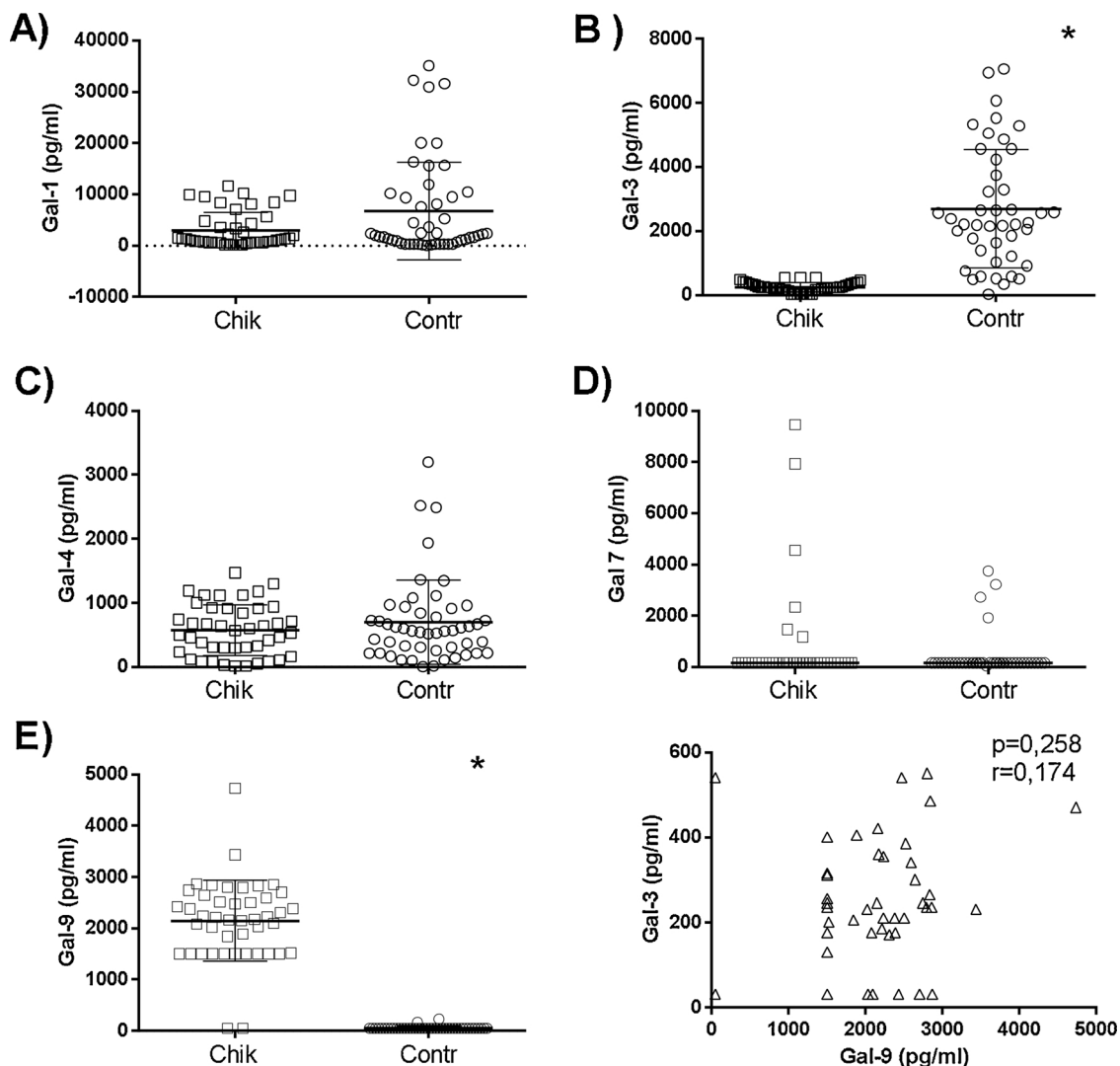


Fig. 1. Serum levels of Galectins -1 (A), -3 (B), -4 (C), -7 (D), and -9 (E) in chikungunya fever arthropathy patients and controls. (F) Absence of correlation between GAL-9 and GAL-3. * $P < 0.0001$.

and 9 (Fig. 1).

3.2. Clinical correlation of galectins

When the patients were classified into subacute (3–12 weeks) (median 2148 [1500–2722] pg/mL) and chronic (> 12 weeks) (median 2212 [1844–2500] pg/mL), no statistically significant difference in serum levels of GAL-9 was found. We found moderate correlation of GAL-9 with morning stiffness intensity ($p = 0.024$, $r = 0.459$) and significant association with morning stiffness duration (> 30 min $x < 30$ min ($p = 0.020$)), as shown in Fig. 2. No correlation of GAL-9 was found with chosen treatment or with other clinical aspects of the disease such as pain index and painful or swollen joint count.

We did not find correlations of GAL-1, -3, -4, and -7 with clinical aspects of the disease or with treatment.

4. Discussion

We found increased GAL-9 serum levels positively correlated with morning stiffness and associated with greater than 30 min of morning stiffness. Morning stiffness is considered a symptom related to the intensity of joint inflammation and is used as an index sign of disease activity for inflammatory joint diseases such as rheumatoid arthritis

(Sierakowski and Cutolo, 2011); therefore, this positive correlation indirectly reflects the liaison of GAL-9 with joint inflammation.

Galectin-9 is produced by activated T cells. It exerts a chemo-attractive influence over eosinophils (Liu et al., 2012) and promotes activation of dendritic cells by stimulating their ability to secrete IL-12, driving TH1 cytokine production by TCD4+ cells (Thiemann and Baum, 2016). On the other hand, it may stimulate the T regulatory function through different actions: inducing TH1 cell apoptosis by TIM3 reception interaction, stimulating production of regulatory T cells, and diminishing TH17 cell production (Merani et al., 2015; Sundblad et al., 2017). It also reduces TNF- α and IL-1 β and increases IL-10 production by activated macrophages (Henderson and Sethi, 2009). The GAL-9-induced T CD8+ cell apoptosis in a nephritis animal model has been described. In an experimental model, GAL-9 induced “fibroblasts-like” synovial cell apoptosis, contributing to the resolution of the inflammatory process (Liu et al., 2012). The overexpression of GAL-9 has been reported in various chronic viral infections (Thiemann and Baum, 2016; Merani et al., 2015; Norling et al., 2009; Liu et al., 2012).

In the current literature, there are no references to the participation of any galectin in the pathophysiology of chikungunya disease. Galectins are animal proteins (lectins) specialized in the recognition of complex carbohydrates (mainly β -galactosides: galactoses containing carbohydrates) and carbohydrate chains in glycolipids and

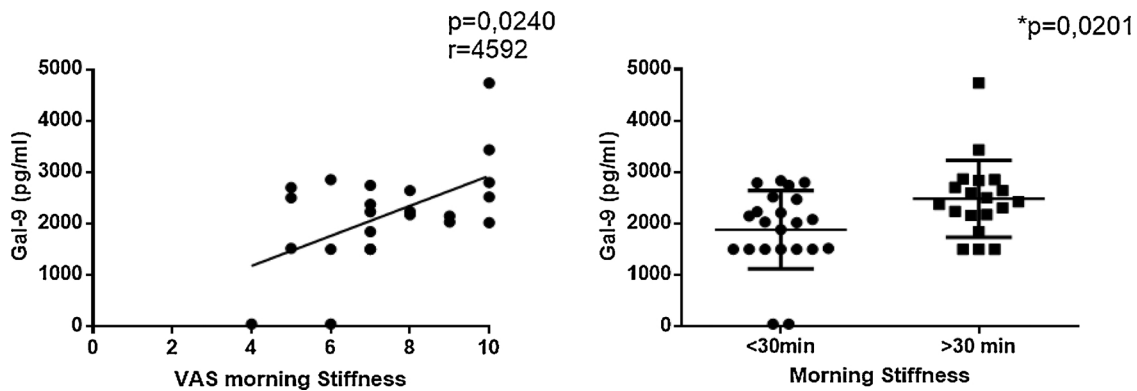


Fig. 2. (A) Correlation of morning stiffness intensity and (B) Association of morning stiffness duration with serum levels of GAL-9.

glycoproteins.

Evaluating the role of GAL-9 in other arboviruses, dengue studies have demonstrated the stimulation of GAL-9 production by monocytes as a response to the cellular damage induced by the dengue virus (Dapat et al., 2017). Chagan-Yasultan et al. found a GAL-9 increase in serum levels and an association with acute dengue disease severity in 65 patients (Chagan-Yasutan et al., 2013). There were also reports of increased GAL-9 and GAL-3 BP (binding protein) in dengue disease, while levels of GAL-1 and -3 were not found to rise (Liu et al., 2016). Although dengue and chikungunya viruses are not from the same family (Flaviviridae and Togaviridae, respectively), both share the ability to infect arthropods and mammals' mechanisms of transmission and gateways, and they have structural similarities such as envelope proteins E, E1, and Gc, which may influence the immune response (Hernandez et al., 2014).

The participation of GAL-9 in the pathophysiological process of chronic viruses is already well defined (Lai et al., 2017). Although GAL-9's primary role in antiviral response varies depending on the target cell, its role in the pathogenesis of some viruses leading to chronicity has already been demonstrated. Such is the case of HCV infection, where Kared et al. demonstrated that progression to persistent infection is associated with an increase in serum GAL-9 levels and expansion of the subpopulation of Gal-9-expressing Tregs. In HCV infection, mice depleted for the GAL-9 gene developed an intense and prolonged TCD8+ response against the virus. Administration of Gal-9 reduced the T-CD8+ specific response and delayed viral clearance (Kared et al., 2013).

Many of the actions of galectins occur through their relevant role in the control of apoptosis (mainly in the extrinsic pathway of apoptosis, not dependent on mitochondrial function) through interaction with death receptors (DR) and cell surface signaling glycoproteins (Vasta et al., 2017; Seyrek et al., 2019). This has been well demonstrated for GAL-3, which blocks the apoptosis signal via interaction with the TRAIL-Rs receptor and induces apoptosis via interaction with CD95 (Fukumori et al., 2004; Mendez-Huergo, 2018 #2171). GAL-1 also interacts with CD95-inducing apoptosis (Mendez-Huergo et al., 2018), whereas GAL-9 can induce apoptosis via interaction with DR receptors in various cell types or specifically via interaction with Tim-3 in adaptive immunity (Sehrawat et al., 2009). Other mechanisms for galectin induction of apoptosis have been demonstrated, such as the direct GAL-3 action upon mitochondria and its interaction with other cellular receptors such as CD29 / CD7 in T cells (Brinchmann et al., 2018; Vasta et al., 2017).

The major GAL-9 actions on the immune system are due to its interaction with the type 1 Th cell receptor, Tim-3, leading to cell death by calcium influx or suppressing effector functions of T lymphocytes. The increase in Tim-3 expression and serum GAL-9 levels could decrease persistent T-cell activation in chronic viral infections, while blocking the interaction between GAL-9 and Tim-3 would lead to a

more effective antiviral immune response. Corroborating the favoring of the infectious process by Galectin-9, its gene depletion in rats generated a more effective viral clearance in both acute and chronic viral infections such as herpes simplex (Sehrawat et al., 2010). Relevant roles of viral replication-dependent apoptosis induction in CHIKF pathogenesis have been described regarding in vitro infection models (HeLa cell cultures and fibroblasts) (Krejchich-Trotot et al., 2011). Given the pro-apoptotic role of GAL-9 on fibroblasts and our results demonstrating the increase of GAL-9 in the subacute and chronic phases of chikungunya disease, it would be interesting to investigate the role of galectin in inducing apoptosis in the initial infection process. It may be of relevance to treatment as inhibition of apoptosis greatly reduces viral replication (Krejchich-Trotot et al., 2011).

In 1995 Rosen et al. (1995) demonstrated the presence of Sindbis virus capsid antigens within autoantigen-associated apoptotic vesicles such as ribonucleoprotein SS-A (RO). This coexistence, by the association of autoantigens with immunogenic viral glycoproteins, could lead to a breakdown in self-tolerance, leading in turn to the persistence of joint symptoms and the development of inflammatory joint diseases after viral infection. Sindbis is an alphavirus of the same genus as the chikungunya virus, with similar capsid proteins E1 and E2 (Rosen et al., 1995) and with many clinical and pathophysiological similarities with CHIKV, including similarities in the chronification of musculoskeletal manifestations. They are likely to share this pathophysiology as well, which deserves further investigation.

GAL-3 may have pro- or anti-inflammatory functions, depending on concentration, cell target, and location (intra- or extra-cellular). It acts upon the resolution of the inflammatory process by stimulating cell debris phagocytosis (e.g., apoptotic neutrophils). On the other hand, by acting as a receptor of bacterial surface carbohydrate patterns (as a PAMP) or as a cell damage pattern receptor (as a DAMP), it favors the pro-inflammatory process. It also stimulates leukocyte adhesion, induces pro-inflammatory cytokine production (e.g., IL-1, IL-2, and IL-8), and facilitates neutrophil degranulation. It acts as a chemotactic factor on monocytes and macrophages (Sano et al., 2000) and induces macrophage activation (Papaspnyridonos et al., 2008) and T cell apoptosis (Liu et al., 2012; Henderson and Sethi, 2009).

Regarding the decreased levels of GAL-3 in patients, it would be interesting to measure its presence in synovial tissue as increased GAL-3 expression in conditions with inflammatory synovitis, such as RA and osteoarthritis, has been reported. Moreover, intra-articular administration of GAL-3 led to the development of synovitis in an animal model (Forsman et al., 2011). Several studies reported the participation of GAL-3 in chronic inflammatory processes, but they were associated with tissue fibrosis, which is not usually found in patients with chikungunya arthropathy. Other chronic pathologies with synovial inflammation show increased GAL-3, as demonstrated in an animal model (Forsman et al., 2011) and in patients with RA (Mendez-Huergo et al., 2018) and ankylosing spondylitis (Issa et al., 2017a, b; Cao et al.,

2019). Unlike previous RA studies and similarly to our findings, recent work has found a reduction in serum GAL-3 levels in RA patients compared to controls, attributing the difference to the disease treatment. In our study, none of the patients were on corticosteroids, and we found no difference in GAL-3 or GAL-9 levels regarding DMARDs use (Forsman et al., 2011). It is important to note that, although there are clinical similarities in some aspects of the pathophysiology of the chronic forms of chikungunya with RA, there are several discordant points between these diseases regarding cellular and molecular behavior.

5. Conclusions

Compared with healthy individuals, we found an increase in GAL-9 levels in chikungunya patients with subacute and chronic musculoskeletal manifestations, with higher levels among chronic phase patients. GAL-3 levels were decreased compared to controls in our analysis. GAL-9 levels correlated with the intensity of morning stiffness and were associated with its duration. As a link between innate and adaptive immunity, and by its relation to the chronicity of viral diseases, galectin-9 may be an interesting therapeutic target. Further studies that elucidate its action on the pathophysiology of the disease may provide crucial information for understanding its evolution.

CRedit authorship contribution statement

Nara Gualberto Cavalcanti: Conceptualization, Methodology, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Project administration, Software. **Kamila Melo Vilar:** Investigation, Methodology. **Angela Luzia Branco Pinto Duarte:** Investigation. **Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo:** Resources, Visualization, Validation. **Michelly Cristiny Pereira:** Resources, Visualization, Writing - review & editing. **Ivan da Rocha Pitta:** Funding acquisition. **Claudia Diniz Lopes Marques:** Investigation, Writing - review & editing, Supervision. **Maira Galdino da Rocha Pitta:** Conceptualization, Methodology, Data curation, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank the research funding agencies and CNPq, CAPES and FACEPE for the scholarships granted to the researchers participating in the study,

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198062>.

References

- Almkvist, J., Karlsson, A., 2002. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj. J.* 19 (7–9), 575–581.
- Arroyo-Avila, M., Vila, L.M., 2015. Rheumatic manifestations in patients with chikungunya infection. *P. R. Health Sci. J.* 34 (2), 71–77.
- Barondes, S.H., Cooper, D.N., Gitt, M.A., Galectins, Leffler H., 1994. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* 269 (33), 20807–20810.
- Boscher, C., Dennis, J.W., Nabi, I.R., 2011. Glycosylation, galectins and cellular signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 (4), 383–392.
- Brinckmann, M.F., Patel, D.M., Iversen, M.H., 2018. The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2018, 9186940.
- Cao, M.Y., Wang, J., Gao, X.L., Hu, Y.B., 2019. Serum galectin-3 concentrations in patients with ankylosing spondylitis. *J. Clin. Lab. Anal.*, e22914.
- Cavalcanti, N.G.V.K., Duarte, A., Rêgo, M., Pereira, M., Pitta, I.R., Marques, C., Pitta, M., 2019. IL-27 in patients with chikungunya Fever: a possible chronicity biomarker? *Acta Trop.* 196 (online publication ahead printing).
- Chagan-Yasutan, H., Ndhlovu, L.C., Lacuesta, T.L., Kubo, T., Leano, P.S., Niki, T., et al., 2013. Galectin-9 plasma levels reflect adverse hematological and immunological features in acute dengue virus infection. *J. Clin. Virol.* 58 (4), 635–640.
- Cummings, R.D., Liu, F.T., Vasta, G.R., et al., 2015. Galectins. *Rd In: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W. (Eds.), Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor, NY, pp. 469–480.
- Dapat, I.C., Pascapurnama, D.N., Iwasaki, H., Labayo, H.K., Chagan-Yasutan, H., Egawa, S., et al., 2017. Secretion of galectin-9 as a DAMP during dengue virus infection in THP-1 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (8).
- de la Fuente, H., Perez-Gala, S., Bonay, P., Cruz-Adalia, A., Cibrian, D., Sanchez-Cuellar, S., et al., 2012. Psoriasis in humans is associated with down-regulation of galectins in dendritic cells. *J. Pathol.* 228 (2), 193–203.
- Dhanwani, R., Khan, M., Alam, S.I., Rao, P.V., Parida, M., 2011. Differential proteome analysis of chikungunya virus-infected new-born mice tissues reveal implication of stress, inflammatory and apoptotic pathways in disease pathogenesis. *Proteomics* 11 (10), 1936–1951.
- Dhanwani, R., Khan, M., Bhaskar, A.S., Singh, R., Patro, I.K., Rao, P.V., et al., 2012. Characterization of chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. *Virus Res.* 163 (2), 563–572.
- Forsman, H., Islander, U., Andreasson, E., Andersson, A., Onnheim, K., Karlstrom, A., et al., 2011. Galectin 3 aggravates joint inflammation and destruction in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 63 (2), 445–454.
- Fukumori, T., Takenaka, Y., Oka, N., Yoshii, T., Hogan, V., Inohara, H., et al., 2004. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. *Cancer Res.* 64 (10), 3376–3379.
- Gardner, J., Anraku, I., Le, T.T., Larcher, T., Major, L., Roques, P., et al., 2010. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J. Virol.* 84 (16), 8021–8032.
- Henderson, N.C., Sethi, T., 2009. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol. Rev.* 230 (1), 160–171.
- Hernandez, R., Brown, D.T., Paredes, A., 2014. Structural differences observed in arboviruses of the alphavirus and flavivirus genera. *Adv. Virol.* 2014, 259382.
- Hussain, K.M., Lee, R.C., Ng, M.M., Chu, J.J., 2016. Establishment of a novel primary human skeletal myoblast cellular model for Chikungunya virus infection and pathogenesis. *Sci. Rep.* 6, 21406.
- Issa, S.F., Duer, A., Ostergaard, M., Horslev-Petersen, K., Hetland, M.L., Hansen, M.S., et al., 2017a. Increased galectin-3 may serve as a serologic signature of pre-rheumatoid arthritis while markers of synovitis and cartilage do not differ between early undifferentiated arthritis subsets. *Arthritis Res. Ther.* 19 (1), 80.
- Issa, S.F., Christensen, A.F., Lindegaard, H.M., Hetland, M.L., Horslev-Petersen, K., Stengaard-Pedersen, K., et al., 2017b. Galectin-3 is persistently increased in early rheumatoid arthritis (RA) and associates with Anti-CCP seropositivity and MRI bone lesions, while early fibrosis markers correlate with disease activity. *Scand. J. Immunol.* 86 (6), 471–478.
- Kared, H., Fabre, T., Bedard, N., Bruneau, J., Shoukry, N.H., 2013. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog.* 9 (6), e1003422.
- Krejchich-Trotot, P., Denizot, M., Hoarau, J.J., Jaffar-Bandjee, M.C., Das, T., Gasque, P., 2011. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *FASEB J.* 25 (1), 314–325.
- Kumar, S., Jaffar-Bandjee, M.C., Giry, C., Connec de Kerillis, L., Merits, A., Gasque, P., et al., 2012. Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection. *Virol. J.* 9, 313.
- Lai, J.H., Luo, S.F., Wang, M.Y., Ho, L.J., 2017. Translational implication of Galectin-9 in the pathogenesis and treatment of viral infection. *Int. J. Mol. Sci.* 18 (10).
- Liu, F.T., Yang, R.Y., Hsu, D.K., 2012. Galectins in acute and chronic inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253, 80–91.
- Liu, K.T., Liu, Y.H., Chen, Y.H., Lin, C.Y., Huang, C.H., Yen, M.C., et al., 2016. Serum Galectin-9 and Galectin-3-Binding protein in acute dengue virus infection. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (6).
- Mendez-Huergo, S.P., Hockl, P.F., Stupirski, J.C., Maller, S.M., Morosi, L.G., Pinto, N.A., et al., 2018. Clinical relevance of Galectin-1 and Galectin-3 in rheumatoid arthritis patients: differential regulation and correlation with disease activity. *Front. Immunol.* 9, 3057.
- Merani, S., Chen, W., Elahi, S., 2015. The bitter side of sweet: the role of Galectin-9 in immunopathogenesis of viral infections. *Rev. Med. Virol.* 25 (3), 175–186.
- Ministério da Saúde, Brasil. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018.
- Norling, L.V., Perretti, M., Cooper, D., 2009. Endogenous galectins and the control of the host inflammatory response. *J. Endocrinol.* 201 (2), 169–184.
- Papaspriidonos, M., McNeill, E., de Bono, J.P., Smith, A., Burnand, K.G., Channon, K.M., et al., 2008. Galectin-3 is an amplifier of inflammation in atherosclerotic plaque progression through macrophage activation and monocyte chemoattraction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (3), 433–440.
- Pearson, M.J., Bik, M.A., Ospelt, C., Naylor, A.J., Wehmeyer, C., Jones, S.W., et al., 2018. Endogenous Galectin-9 suppresses apoptosis in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Sci. Rep.* 8 (1), 12887.
- Rosen, A., Casiola-Rosen, L., Ahearn, J., 1995. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J. Exp. Med.* 181 (4), 1557–1561.
- Sano, H., Hsu, D.K., Yu, L., Apgar, J.R., Kuwabara, I., Yamanaka, T., et al., 2000. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J. Immunol.* 165 (4), 2156–2164.
- Sano, H., Hsu, D.K., Apgar, J.R., Yu, L., Sharma, B.B., Kuwabara, I., et al., 2003. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J. Clin. Invest.* 112 (3), 389–397.

- Sehrawat, S., Suryawanshi, A., Hirashima, M., Rouse, B.T., 2009. Role of Tim-3/galectin-9 inhibitory interaction in viral-induced immunopathology: shifting the balance toward regulators. *J. Immunol.* 182 (5), 3191–3201.
- Sehrawat, S., Reddy, P.B., Rajasagi, N., Suryawanshi, A., Hirashima, M., Rouse, B.T., 2010. Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8 T cell response. *PLoS Pathog.* 6 (5), e1000882.
- Seyrek, K., Richter, M., Lavrik, I.N., 2019. Decoding the sweet regulation of apoptosis: the role of glycosylation and galectins in apoptotic signaling pathways. *Cell Death Differ.*
- Sharma, A., Balakathiresan, N.S., Maheshwari, R.K., 2015. Chikungunya virus infection alters expression of MicroRNAs involved in cellular proliferation, immune response and apoptosis. *Intervirology* 58 (5), 332–341.
- Sierakowski, S., Cutolo, M., 2011. Morning symptoms in rheumatoid arthritis: a defining characteristic and marker of active disease. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* 125, 1–5.
- Sundblad, V., Morosi, L.G., Geffner, J.R., Rabinovich, G.A., 2017. Galectin-1: a jack-of-All-Trades in the resolution of acute and chronic inflammation. *J. Immunol.* 199 (11), 3721–3730.
- Tanabe, I.S.B., Tanabe, E.L.L., Santos, E.C., Martins, W.V., Araujo, I., Cavalcante, M.C.A., et al., 2018. Cellular and molecular immune response to chikungunya virus infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 345.
- Tanay, A., 2017. Chikungunya virus and autoimmunity. *Curr. Opin. Rheumatol.* 29 (4), 389–393.
- Teng, T.S., Kam, Y.W., Lee, B., Hapuarachchi, H.C., Wimal, A., Ng, L.C., et al., 2015. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. *J. Infect. Dis.* 211 (12), 1925–1935.
- Teo, T.H., Lum, F.M., Claser, C., Lulla, V., Lulla, A., Merits, A., et al., 2013. A pathogenic role for CD4+ T cells during chikungunya virus infection in mice. *J. Immunol.* 190 (1), 259–269.
- Thanapati, S., Ganu, M.A., Tripathy, A.S., 2017. Differential inhibitory and activating NK cell receptor levels and NK/NKT-like cell functionality in chronic and recovered stages of chikungunya. *PLoS One* 12 (11), e0188342.
- Thangamani, S., Higgs, S., Ziegler, S., Vanlandingham, D., Tesh, R., Wikel, S., 2010. Host immune response to mosquito-transmitted chikungunya virus differs from that elicited by needle inoculated virus. *PLoS One* 5 (8), e12137.
- Thiemann, S., Baum, L.G., 2016. Galectins and immune responses-just how do they do those things they do? *Annu. Rev. Immunol.* 34, 243–264.
- Vasta, G.R., 2009. Roles of galectins in infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7 (6), 424–438.
- Vasta, G.R., Feng, C., Gonzalez-Montalban, N., Mancini, J., Yang, L., Abernathy, K., et al., 2017. Functions of galectins as self/non-self-recognition and effector factors. *Pathog. Dis.* 75 (5).
- Xie, Q., Ni, M., Wang, S.C., 2018. Galectin-3, a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis? *Scand. J. Immunol.* 87 (2), 108.