

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**Efeitos crônicos da infecção pelo vírus da Chikungunya na modulação da
resposta imune e persistência viral**

Isabel Cristina Guerra Gomes

**RIBEIRÃO PETO – SP
2021**

Efeitos crônicos da infecção pelo vírus da Chikungunya na modulação da resposta imune e persistência viral

Isabel Cristina Guerra Gomes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências – Área: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. João Santana da Silva

Ribeirão Preto/SP
2021

Autorizo a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa desde que citada a fonte

FICHA CATALOGRÁFICA

Guerra-Gomes, Isabel Cristina
Efeitos crônicos da infecção pelo vírus da Chikungunya na modulação da resposta imune e persistência viral

Ribeirão Preto, 2021, p.109; 1l;

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Silva, João Santana.

1. Chikungunya; 2. Modelo animal crônico; 3. Resposta imune adaptativa; 4. Persistência viral.

Nome: Isabel Cristina Guerra Gomes

Título: Efeitos crônicos da infecção pelo vírus da Chikungunya na modulação da resposta imune e persistência viral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências – Área: Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: ___/___/_____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico esta tese a minha família e aos amigos que são família, pois, são sempre fonte de apoio e compreensão nos melhores e piores momentos.

Agradecimentos

Agradeço à Deus, pois, Tu que nas alegrias caminhaste ao meu lado, nas dificuldades colocaste-me em Teus braços para que eu nada temesse. Aos meus pais, Tiva e Kátia, meus primeiros professores, que me ensinaram os primeiros passos, jamais poderei retribuir todo apoio, renúncias e sacrifícios, que bem sei foram muitos. Esta conquista é de vocês.

À minha irmã de sangue, Kilma, e as minhas irmãs de alma Bruna de Gois e Tamara Rodrigues, obrigada por tornarem mais suaves as dificuldades. Obrigada pelas palavras de apoio, pelo olhar de incentivo, e por compartilharam as mesmas angústias e aspirações.

Ao meu orientador, João Santana, por me mostrar as possibilidades e ajudar-me a segui-las, por todo conhecimento partilhado, pela confiança antes mesmo de me conhecer, meu muito obrigado. Sem o seu apoio e confiança esse trabalho não seria possível. Aos integrantes e amigos do laboratório de Imunoparasitologia obrigada pela paciência e pelos conhecimentos partilhados, por terem de alguma forma contribuído nessa caminhada.

Ao professor Dr. Mark Marsh e a Dra. Michela Mazzon, que durante meu período sanduíche na *University College London* me receberam e partilharam de seus conhecimentos científicos. Obrigada por me proporcionar uma experiência profissional e de vida que jamais esquecerei!

Aos amigos Jefferson Leite, Ricardo Castro, Yugo Martins, Nathália Quadros, Maria Cláudia, Bruna Araújo, Gabriel Nogueira, Bárbara Soares e Kristin Vassileva, independente do tempo de convívio, obrigada a cada um por ter deixado uma marca significativa na pessoa que termina esse ciclo hoje.

Aos membros da banca examinadora que aceitaram fazer parte deste momento, pela disponibilidade e pelos comentários que tenham certeza só virão a engradecer esse trabalho. Obrigada também a todos os colaboradores e professores que me auxiliaram por diversas vezes tanto nessa pesquisa quanto na minha formação. Em especial a professora Vanessa Carregaro.

Aos funcionários e técnicos de laboratório pela eficiência e carinho com que conduzem seus trabalhos, obrigada por possibilitar a realização das nossas atividades do dia a dia.

À Ana Cristine, secretária do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, muito obrigada pelo acolhimento e disposição para auxiliar em todas as etapas do doutorado e da vida.

Aos camundongos que deram suas vidas para que essa pesquisa fosse realizada e para que todas as descobertas que tanto nos auxiliam hoje acontecessem, meu muito obrigada. Aos pacientes que humildemente acreditaram nesse estudo, ensinaram-me a ser um ser humano melhor com essa humildade e paciência.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), e ao *Center for Research in Inflammatory Diseases* (CRID) pelo apoio financeiro fundamental para desenvolvimento deste trabalho.

“If I were to wish for anything, I should not wish for wealth and power, but for the passionate sense of the potential, for the eye which, ever young and ardent, sees the possible. Pleasure disappoints, possibility never. And what wine is so sparkling, what so fragrant, what so intoxicating, as possibility!” **Søren Kierkegaard**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica pelos continentes das linhagens de chikungunya e de seus vetores primários	21
Figura 2. Diferenças entre infiltrados inflamatórias da fase aguda e crônica	25
Figura 3. Diagrama comparativo das respostas imunes durante a perda óssea induzida por alfavírus e RA	30
Figura 4. Desenvolvimento do modelo animal de infecção crônica por CHIKV	43
Figura 5. Estabelecimento da infecção por CHIKV em camundongos DBA1/J	51
Figura 6. Cinética de infecção por CHIKV para avaliar a expressão de genes polarizantes para o perfil Th17	53
Figura 7. Cinética de imunização por CIA para avaliar a expressão de genes polarizantes para o perfil Th17	54
Figura 8. Avaliação da incidência e surgimento dos sinais clínicos artríticos de camundongos DBA1/J durante infecção por CHIKV experimental.	56
Figura 9. A infecção por CHIKV é capaz de induzir a incidência dos sinais clínicos artríticos de camundongos DBA1/J CIA que não haviam desenvolvido a doença	57
Figura 10. Avaliação da incidência e surgimento dos sinais clínicos artríticos de camundongos DBA1/J entre a infecção por CHIKV ou ZIKV experimental	58
Figura 11. Avaliação dos genes polarizantes para o perfil Th17 no modelo crônico de chikungunya (CIA+CHIKV)	60
Figura 12. Avaliação dos genes reguladores de resposta de células no modelo crônico de chikungunya (CIA+CHIKV)	61
Figura 13. Estratégia de análise de células dos dLNs dos modelos animais experimentais	63
Figura 14. Avaliação de células T CD4+ e T CD8+ em um modelo crônico da infecção por CHIKV (CIA+CHIKV)	64
Figura 15. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD4+IL-17+ e T CD4+INF- γ + em um modelo crônico da infecção por CHIKV (CIA+CHIKV)	65
Figura 16. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD8+IL-17+ e T CD8+INF- γ + no modelo crônico da infecção por CHIKV (CIA+CHIKV)	66
Figura 17. Correlação das células Th17 com a gravidade dos sinais clínicos no modelo animal	68
Figura 18. Bloqueio a IL-17 durante a transferência de células de camundongos CIA+CHIKV reverte o fenótipo da transferência de células T CD4+	69
Figura 19. Avaliação dos genes inflamatórios e reguladores em humanos com artrite crônica da chikungunya	72
Figura 20. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD4+IL-17+ e T CD4+INF- γ + em humanos com artrite crônica da chikungunya	74
Figura 22. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD8+IL-17+ e T CD8+INF- γ + em humanos com artrite crônica da chikungunya	76
Figura 23. Avaliação por citometria de fluxo de células CD4+FOXP3+, T CD4+IL-10+ e T CD4+TGF- β + em humanos com artrite crônica da chikungunya	77
Figura 24. Não há internalização de alfavírus em células T primárias humanas	79
Figura 25. A infecção por RRV e CHIKV induzem a produção de IL-6 por macrófagos humanos	81
Figura 26. A infecção por RRV induz a resposta imune em uma co-cultura de macrófagos e células T	83

Figura 27. Macrófagos com menor expressão de IFITM3 são mais suscetíveis a infecção por RRV	85
Figura 28. Persistência viral nos tecidos sinoviais e dLN no modelo animal da artrite crônica induzida pelo CHIKV (CIA+CHIKV)	87

LISTA DE ABREVIATURAS

CHIKV – Vírus Chikungunya
RRV - Vírus Ross River
VEEV - Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
WEEV - Vírus da Encefalite Equina do Oeste
EEEV – Vírus da Encefalite Equina do Leste
RNA - Ácido ribonucleico
AR- Artrite Reumatóide
ORF - *open reading frames* (Fase de leitura aberta)
nsP - *nonstructural protein* (Proteína não estrutural)
NRAMP - *Natural resistance-associated macrophage protein* (Proteínas de Macrófagos Associadas à Resistência Natural)
LFA - *Lymphocyte function-associated antigen 1*
TLR – *Toll-Like Receptor* (Receptor do Tipo Toll)
RIG1 - *Retinoic Acid-Inducible Gene 1*
MXRA8 - *Matrix Remodeling Associated 8*
MDA5 - *Melanoma Differentiation-Associated Protein 5*
INF - Interferon
IFITMs – *Interferon Induced Transmembrane Protein 1* (Proteínas Transmembranares Induzidas por Interferon)
CCR2 - *C-C chemokine receptor* (Receptor de Quimiocina C-C)
ROS – Reactive Oxygene Species (Espécies Reativas de Oxigênio)
NETs - *Neutrophil extracellular traps* (Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos)
Dpi – Dias pós Infecção
pDCs - Células dendríticas plasmocitóides
DCs _ Células Dendríticas
DCIR - Imunoreceptor de Células Dendríticas
CD – *Cluster differentiation* (Grupo de Diferenciação)
IL - Interleucina
TNF - Fatores de Necrose Tumoral
MCP - *Monocyte chemoattractant protein-1* (Proteína Quimioattractante de Monócitos 1)
GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)
MTX - Metotrexato
MRI - Ressonância Magnética
CCL – Quimiocina CC
Th – *T helper*
CTLA-4 - Proteína citotóxica Linfócito T-Associada do tipo 4
PD-1 – Proteína de Morte Celular Programada 1
Tregs – Célula T reguladora
FR - Fatores Reumatóides
Tr1 - Células T reguladoras do tipo 1
CIA - *Collagen Induced Arthritis* (Artrite induzida por colágeno)
CFA - Adjuvante Completo de Freund
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade
BSA – Albumina de Soro Bovino

PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Célula Mononuclear do Sangue Periférico)

MOIs- *Multiplicity of Infection* (Multiplicidades de Infecção)

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

APC – Célula Apresentadora de Antígenos

PBS - Tampão Fosfato-Salino

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

PFA - Paraformaldeído

RESUMO

GUERRA-GOMES, IC. Efeitos crônicos da infecção pelo vírus da Chikungunya na modulação da resposta imune e persistência viral. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 2021, 109p.

A infecção pelo vírus da chikungunya (CHIKV) em humanos é geralmente caracterizada por um breve viremia, seguida de um rápido *clearance* viral. Apesar do quase imediato controle viral sistêmico, estudos sugerem a persistência do CHIKV em humanos e primatas não-humanos em reservatório imunológicos. A fase crônica da infecção por CHIKV e pelo vírus do Ross River (RRV), alfavírus artritogênicos, possui características similares à desregulação da resposta imune observada na artrite reumatoide (AR). O desenvolvimento de uma poliartralgia persistente em número considerável de pacientes possui um grande impacto social e econômico. Assim, potencialmente, a permanência viral pode estar relacionada com a manutenção da resposta inflamatória exacerbada por longos períodos. Sabe-se que a migração de células T CD4⁺ para a cápsula articular ocorre durante a primeira semana de infecção, e correlaciona-se negativamente com o pior prognóstico da chikungunya. Contudo, pouco se sabe sobre o papel dos subtipos das células T na fisiopatologia da doença. Uma vez que não existiam modelos de camundongos que permitissem o estudo da artrite crônica induzida pelo CHIKV, nosso objetivo foi desenvolver e caracterizar a resposta de células T e persistência viral em um modelo animal crônico. Portanto, em nosso estudo, desenvolvemos um novo modelo animal para o estudo da chikungunya crônica, que é capaz de recapitular os sinais comumente observados na artrite crônica da chikungunya em humanos. Os nossos resultados demonstram a importância das células T CD4⁺ para a patogenia da doença crônica da chikungunya em camundongos, especificamente células Th17, dados corroborados em humanos. Alguns dados sugerem que a infecção por CHIKV regula negativamente a produção de citocinas essenciais na regulação de resposta de células Th17, tais como, IL-10, IL-27 e IL-35. Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que, de forma dependente da expressão de IFITM3, os macrófagos e células sinoviais são reservatórios virais e passíveis a replicação viral de alfavírus artritogênicos. Macrófagos infectados mantêm o microambiente extremamente inflamatório através da produção de citocinas inflamatórias como o IL-6, e quimiocinas como CCL5 e CCL20, estimulando um maior recrutamento de infiltrado de células T na sinovias infectadas com o CHIKV, mesmo após o controle viral sistêmico. Em conclusão, esses dados demonstram que no nosso modelo animal a artrite crônica induzida por CHIKV é dependente da sinalização de IL-17 pelas células Th17, e que a persistência viral em macrófagos sinoviais mantém o microambiente inflamatório propício para a manutenção do recrutamento das células T para a região sinovial.

Palavras-chave: Chikungunya; Modelo animal crônico; Resposta imune adaptativa; Persistência viral.

ABSTRACT

GUERRA-GOMES, IC. **Chronic effects of Chikungunya virus infection on immune response modulation and viral persistence.** Doctoral thesis. Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 2021, 109p.

Chikungunya virus (CHIKV) infections in humans are usually characterized by brief viremia followed by rapid viral clearance. Despite the almost immediate systemic viral control, studies suggest the persistence of CHIKV in humans and non-human primates in immunological reservoirs. The chronic phase of infection by CHIKV and by Ross River virus (RRV), arthritogenic alphaviruses, has characteristics similar to the dysregulation of the immune response seen in rheumatoid arthritis (RA). The development of persistent polyarthralgia in a considerable number of patients has a significant social and economic impact. Thus, potentially, viral permanence may be related to the maintenance of the exacerbated inflammatory response for long periods. It was previously demonstrated that the migration of CD4+ T cells to the joint capsule occurs during the first week of infection, and it correlates with the worst prognosis of chikungunya. However, little is known about the role of T cell subtypes in the pathophysiology of the disease. Since there were no mouse models that would allow the study of CHIKV-induced chronic arthritis, we aimed to develop and characterize a new chronic animal model, followed by its T cell response and viral persistence. Therefore, in our study, we developed a new animal model for the chronic chikungunya understanding. Our model can induce the signs commonly seen in chronic chikungunya arthritis in humans. Our results demonstrate the importance of CD4+ T cells for the pathogenesis of chronic chikungunya disease in mice, specifically Th17 cells, data corroborated in humans. Some data suggest that CHIKV infection negatively regulates the production of essential cytokines in the regulation of Th17 cell response, such as IL-10, IL-27, and IL-35. Additionally, our results demonstrated that macrophages and synovial cells, in an IFITM3 expression-dependent manner, are viral reservoirs and susceptible to viral replication of arthritogenic alphaviruses. Infected macrophages maintain the extremely inflammatory microenvironment through the inflammatory cytokines production such as IL-6, and chemokines such as CCL5 and CCL20, stimulating greater recruitment of T cell infiltrate in CHIKV-infected synovia, even after systemic viral control. In conclusion, these data demonstrate that in our animal model CHIKV-induced chronic arthritis is dependent on IL-17 signaling by Th17 cells and that viral persistence in synovial macrophages maintains the inflammatory microenvironment conducive to the maintenance of T cell recruitment to the synovial region.

Keywords: Chikungunya; Chronic animal model; Adaptive immune response; Viral persistence.

INDICE

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Epidemiologia e manifestações clínicas da infecção por alfavírus artritogênicos	20
1.2 Estrutura e replicação viral	22
1.3 A imunopatologia da infecção pelo CHIKV	23
1.4 Resposta imune durante a chikungunya	26
1.4.1 Resposta de células da imunidade inata e adaptativa na chikungunya	26
1.4.2 Similaridades da resposta pró-inflamatória exacerbada da chikungunya e a artrite reumatoide.....	28
1.4.3 Resposta de células Th17 em infecções por alfavírus e sua regulação	29
1.4.6 Persistência viral e a artrite crônica da chikungunya.....	31
1.5 Modelo animal	33
2 Hipótese	36
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
3.2.1 PARTE 1:.....	38
3.2.2 PARTE 2:.....	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Animais de experimentação	41
4.2 Propagação e titulação viral	41
4.3 Ensaio de placa.....	41
4.4 Estabelecimento de novo modelo experimental de infecção com CHIKV	42
4.4.1 Indução de artrite experimental em modelo animal	42
4.4.2 Infecção com vírus da chikungunya em modelo animal	42
4.4.3 Modelo experimental de infecção de sinais crônicos da Chikungunya	42
4.4.4 Avaliação clínica da artropatia associada aos modelos utilizados.....	43
4.5 Transferência de células e bloqueio com anti-IL-17	44
4.6 Extração de RNA.....	44
4.7 Quantificação de RNA viral por qPCR do vírus da Chikungunya	44
4.8 Construção de cDNA.....	45
4.9 Reações de PCR em tempo real	45
4.10 Fenotipagem celular por citometria de fluxo	45
4.11 Isolamento de PBMC de pacientes e voluntários saudáveis	46

4.12 Cultura de macrófagos humano	46
4.13 Quantificação de citocinas por ELISA.	47
4.14 Imunofluorescência para marcação celular e internalização viral	47
4.15 Análise estatística	47
PARTE 1. O papel da célula Th17 na infecção crônica por CHIKV	50
5.1 DBA1/J são resistentes a infecção por CHIKV.....	50
5.2 Cinética de expressão de genes polarizantes para o perfil Th17	51
5.3 A infecção por CHIKV contribui para a suscetibilidade ao desenvolvimento dos sinais artríticos da chikungunya	55
5.4 O CHIKV é capaz de induzir o surgimento dos sinais clínicos em camundongos CIA que não haviam desenvolvido doença	55
5.5 A infecção por ZIKV, grupo experimental CIA+ZIKV, não é capaz de induzir os sinais clínicos observados no modelo CIA+CHIKV	57
5.6 O modelo crônico da chikungunya induz uma assinatura gênica inflamatória, associada a uma resposta reguladora ineficiente.	58
5.7 Camundongos CIA+CHIKV apresentam mais células Th17 nos linfonodos drenantes quando comparado a camundongos CIA	62
5.8 Células CD4 ⁺ , especificamente células Th17, correlacionam-se com a maior gravidade dos sinais clínicos em camundongos CIA+CHIKV	67
5.9 A transferência de células CD4 ⁺ recapitula o fenótipo observado com a infecção por CHIKV	67
5.10 Os dados de paciente crônicos corroboram o fenótipo observado no nosso modelo crônico da chikungunya	70
PARTE 2 – Papel da persistência viral na resposta imune na artrite crônica induzida pelo CHIKV	78
5.11 As células T humanas primárias não são permissíveis a infecção por alfavírus artritogênicos.....	78
5.12 Macrófagos humanos infectados por RRV e CHIKV regulam positivamente a produção de IL-6	80
5.13 Macrófagos humanos infectados induzem a resposta de células T na infecção pelo vírus do Ross River	82
5.14 Macrófagos humanos com menor expressão de IFITM3 são mais suscetíveis a infecção por RRV	84
5.15 Persistência viral no modelo animal crônico da artrite induzida por CHIKV (CIA+CHIKV).....	86
6 DISCUSSÃO	89
7 CONCLUSÃO	98
8 REFERÊNCIAS.....	100

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e manifestações clínicas da infecção por alfavírus artritogênicos

Arbovírus são divididos em cinco famílias virais: Bunyaviridae, Flaviviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae e Togaviridae (THEILER e DOWNS, 1970). O gênero dos alfavírus pertence à família Togaviridae, e possui cerca de 30 espécies de vírus conhecidos até o momento (NASAR et al., 2012). Entre as espécies medicamente relevantes dos alfavírus estão inclusos o vírus da chikungunya (CHIKV), vírus do ross river (RRV), e o vírus da encefalite equina venezuelana, do oeste e do leste (VEEV, WEEV e EEEV). Em humanos, alfavírus são caracterizados como causadores de infecções agudas com alta viremia e, em alguns casos, morbidade (SCHMALJOHN e MCCLAIN, 1996; SILVA e DERMODY, 2017).

Em humanos, a doença causada por alfavírus possui dois padrões significativamente distintos: os alfavírus neurotrópicos (novo mundo) comumente produzem danos graves ao sistema nervoso central e os alfavírus artritogênicos (RRV, mayaro e CHIKV), que causam dores articulares persistentes por variável período após a doença febril inicial (SCHMALJOHN e MCCLAIN, 1996).

O CHIKV é um patógeno emergente em diversas partes do globo (**Figura 1**) causando significativa morbidade em humanos (CHALAEM et al., 2016). Foi isolado pela primeira vez em um paciente febril durante um surto na Tanzânia, em 1952 (ROBINSON, 1955), enquanto os primeiros casos autóctones de CHIKV no Brasil foram confirmados em Oiapoque, estado do Amapá, em 13 de setembro de 2014 (NUNES et al., 2015). A infecção pelo CHIKV é causada por um vírus de RNA de cadeia simples positiva e é transmitido através do repasto sanguíneo dos mosquitos do gênero *Aedes* (DUIJL-RICHTER et al., 2015). Após a inoculação, o vírus invade células endoteliais e fibroblastos subcutâneos e se replica de forma ilimitada. A viremia pode chegar a 10^8 cópias/mL, níveis não observados em outras arboviroses. Nas fases iniciais, há uma infecção robusta, onde o vírus é transportado até os órgãos-alvo, incluindo músculos, articulações, fígado e cérebro (SOURISSEAU et al., 2007).

A chikungunya possui um período de incubação de aproximadamente 3-7 dias, e é caracterizada como uma doença febril acompanhada de vários sintomas, incluindo prurido cutâneo, cefaleia, mialgia, exantema e artralgia (SCHWARTZ e ALBERT, 2010;

PETITDEMANGE, WAUQUIER E VIEILLARD, 2015). Ademais, as dores articulares podem variar de moderada a grave, muitas vezes incapacitante, sendo esta a característica mais marcante da doença. A evolução da doença pode ser caracterizada por duas fases: aguda e crônica (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE; 2012). A definição de paciente com chikungunya só é caracterizada mediante teste positivo para Imunoglobulina M (IgM) específica para CHIKV, PCR positivo ou teste sorológico pós-exposição anti-CHIKV para IgG (WEAVER e LECUIT, 2015).

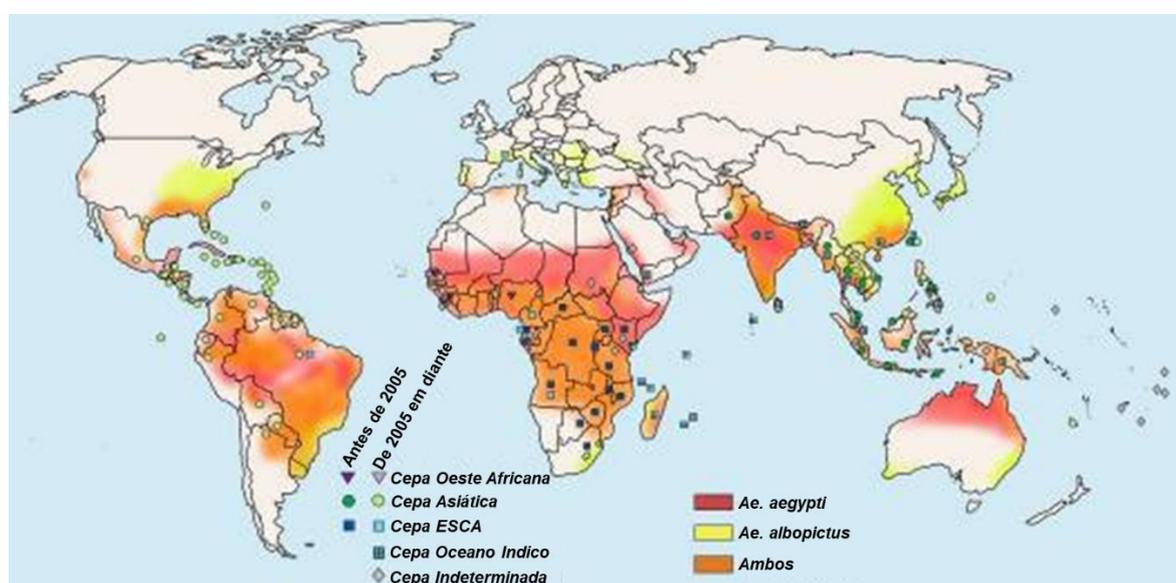


Figura 1. Distribuição geográfica pelos continentes das linhagens de chikungunya e de seus vetores primários. Linhagens do oeste africano, asiática, do leste-centro-sul africano (ECSA, do inglês *East-Central-South African*), e do oceano índico. Também é demonstrada a distribuição do vetor primário de infecção por região, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Adaptado: SILVA e DERMODY, 2017).

A fase aguda é caracterizada pelo acometimento de febre alta, poliartrite, exantema maculopapular com duração igual ou superior a 48 horas associados com dor de cabeça, náusea e vômito (WEAVER e LECUIT, 2015). A artralgia ocasionada pela infecção na fase aguda foi observada em 87-96% dos casos (THIBERVILLE et al., 2013). Apesar da maioria dos casos de chikungunya se resolver entre 5-14 dias, mais de 40% dos pacientes desenvolvem manifestações artritogênicas que duram mais de 3 meses após a fase aguda da doença. As características reumáticas incluem a poliartrite simétrica, geralmente nas mãos e pés, similar a artrite reumatoide (AR), artralgias não específicas consistentes com a artrite pós-viral, e artrite assimétrica

oligo ou mono-localizada semelhante a espondiloartrite. Fibromialgia, dor crônica nas articulações, fascite plantar e capsulite adesiva também podem ocorrer (BOUQUILLARD e COMBE, 2009; JAVELLE et al., 2015; RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2016). Quando essas manifestações artríticas duram mais que 3 meses, a doença pode ser caracterizada como artrite crônica da chikungunya (AMARAL, BINGHAM e SCHOEN, 2018).

1.2 Estrutura e replicação viral

Alfavírus são vírus envelopados, onde o invólucro proteico externo do vírion é composto por 240 heterodímeros das proteínas do envelope viral E2 e E1, que formam partículas esféricas pequenas (~70 nm) com uma simetria icosaédrica (KIELIAN, CHANEL-VOS e LIAO, 2010). O genoma do alfavírus é um RNA de fita simples positiva, com aproximadamente 11.8kbp de comprimento (STRAUSS e STRAUSS, 1994).

O genoma possui duas *open reading frames* (ORF) que codificam as proteínas estruturais e não estruturais. Sendo quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) e uma única poliproteína estrutural. Esta, após processamento proteolítico, gera três proteínas estruturais principais: o capsídeo, as glicoproteínas do envelope E2 e E1, e um pequeno polipeptídeo 6K. As proteínas estruturais são codificadas pela ORF extremidade 5' do genoma, e as proteínas não estruturais são codificadas na ORF extremidade 3' (JOSE, SNYDER e KUHN, 2009).

As glicoproteínas se dispõem no vírion como um heterodímero E1/E2. O E2 é responsável pela ligação viral a célula alvo do hospedeiro, enquanto E1 é uma proteína de fusão viral de classe II que após a dissociação de E2, trimeriza e medeia a fusão das membranas celulares do vírus e do hospedeiro (DUIJL-RICHTER et al., 2015). As proteínas não estruturais (nsP1-4), por sua vez, estão envolvidas na transcrição e tradução viral (JOSE, SNYDER e KUHN, 2009).

Os vírus desse gênero adentram as células através da interação entre a proteína E2 e receptores proteicos, presentes na superfície celular, e são então submetidos à endocitose mediada por clatrina (KIELIAN, CHANEL-VOS e LIAO, 2010). O receptor específico que é usado na infecção varia entre as espécies de alfavírus, por exemplo, para o SINV é NRAMP2 (Proteína de Macrófagos Associados à Resistência Natural 2) (ROSE et al., 2011; PANDA et al., 2013), enquanto para o

SFV, ainda não está identificado (BROWN, WAN e KIELIAN, 2018). Recentemente, os receptores utilizados pelo CHIKV foram descobertos. O CHIKV utiliza a molécula MXRA8 (do inglês *Matrix Remodeling Associated 8*) para infectar a célula (ZHANG et al., 2018) enquanto a molécula LFA-1 é essencial para a replicação viral na célula (MEERTENS et al., 2019).

A entrada viral ocorre em vacúolos endossomais acidificados onde *spikes* da glicoproteína E1 sofrem alterações conformacionais e proporcionam a fusão que libera o RNA genômico para o citoplasma. A replicação viral ocorre no citoplasma, em um processo de duas fases simultâneas. Uma fase em que ocorre a tradução das proteínas não estruturais pelo RNA genômico. As proteínas não estruturais, através da formação de complexo de replicação, vão utilizar o próprio RNA viral para gerar outro RNA mensageiro (RNAm) de carga negativa que servirá de molde para a subsequente síntese dos RNAs subgenômico e genômico (SCHMALJOHN & MCCLAIN, 1996).

Em outra fase, o intermediário de RNA de fita negativa produz um RNAm de fita positiva 26S (RNA subgenômico) que codifica as proteínas estruturais. A tradução do RNAm 26S produz uma poliproteína que é clivada proteoliticamente nas três proteínas: C, pE2, E1 e em um pequeno peptídeo 6K (que pode ser uma sequência sinal para o translocamento de E1). O complexo pE2-6K-E1 é então transportado para o retículo endoplasmático, e em sequência, para o complexo de golgi para finalizar o processamento e maturação. A formação dos novos vírions ocorre por brotamento de nucleocapsídeos pré-formados através de regiões da membrana plasmática (SCHMALJOHN & MCCLAIN, 1996; SOLIGNAT et al., 2009). Durante todo esse processo de replicação viral, alguns receptores intracelulares da célula infectada tais como, TLR3, TLR7, RIG1 e MDA5 podem reconhecer o vírus e iniciar a formação de uma resposta imune antiviral.

1.3 A imunopatologia da infecção pelo CHIKV

A infecção aguda por CHIKV se inicia com a transmissão do vírus através do repasto sanguíneo de um mosquito infectado para a pele do hospedeiro, onde se replica em células suscetíveis, incluindo fibroblastos e macrófagos. O vírus se dissemina através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais típicos (articulações, pele e músculos) e atípicos (cérebro e fígado) de replicação primária

(SILVA e DERMODY, 2017) (**Figura 2**). Teng et al. (2015) correlacionaram a carga viral do CHIKV com a artralgia característica da doença através de assinatura mediada principalmente por citocinas pró-inflamatórias, observando os padrões de infiltração leucocitária, produção de citocinas e ativação de complemento.

Dessa forma, a infecção aguda provoca uma resposta inflamatória em tecidos infectados caracterizada por uma extensa infiltração de células do sistema imune em tecidos. Esse processo ocorre em parte devido a liberação de moléculas quimioatraentes, como CCL2 (MCP-1), induzido durante a infecção pelo CHIKV por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e epiteliais (DESHMANE et al., 2009; GARDNER et al., 2010; RULI et al., 2011). Dentro dos tecidos da articulação, devido ao infiltrado celular e liberação de mediadores pró inflamatórios a hiperplasia sinovial se inicia (SILVA e DERMODY, 2017).

A doença crônica causada por CHIKV pode persistir por meses ou anos após a infecção aguda, mas geralmente é limitada a articulações mais distais. A doença crônica é provavelmente mediada pela infecção viral e inflamação persistentes. Os possíveis locais de persistência do CHIKV incluem células endoteliais no fígado e outros órgãos, células mononucleares no baço, macrófagos no líquido sinovial e tecidos circundantes e células satélites no músculo. Na articulação cronicamente infectada, a presença contínua de um subconjunto de células infiltrantes (principalmente macrófagos, monócitos e linfócitos) e mediadores pró-inflamatórios específicos (IL-6 e CCL2) no líquido sinovial provavelmente contribuem para a persistência da doença inflamatória (SILVA e DERMODY, 2017). Hoarau et al. (2010) observaram o CHIKV em macrófagos sinoviais durante a artrite crônica da chikungunya. A patologia crônica das articulações se assemelha à da AR, com hiperplasia e angiogênese significativas, mas sem demonstrar sua relação com a erosão da cartilagem e erosão óssea comumente observada na AR autoimune (SILVA e DERMODY, 2017).

O'nyong'nyong, mayaro, e ross river vírus, estão antigenicamente relacionados ao CHIKV e causam manifestações clínicas semelhantes ou idênticas, enquanto o vírus Sindbis causa sintomas semelhantes, porém mais leves. A artralgia migratória, característica dessas doenças virais, envolve principalmente as pequenas articulações e é mais proeminente em adultos que em crianças. Em casos mais graves, as articulações envolvidas estão edemaciadas e sensíveis, e os sinais e

sintomas reumáticos podem persistir por semanas ou meses após a doença aguda, desenvolvendo uma artropatia crônica (SCHMALJOHN e MCCLAIN, 1996).

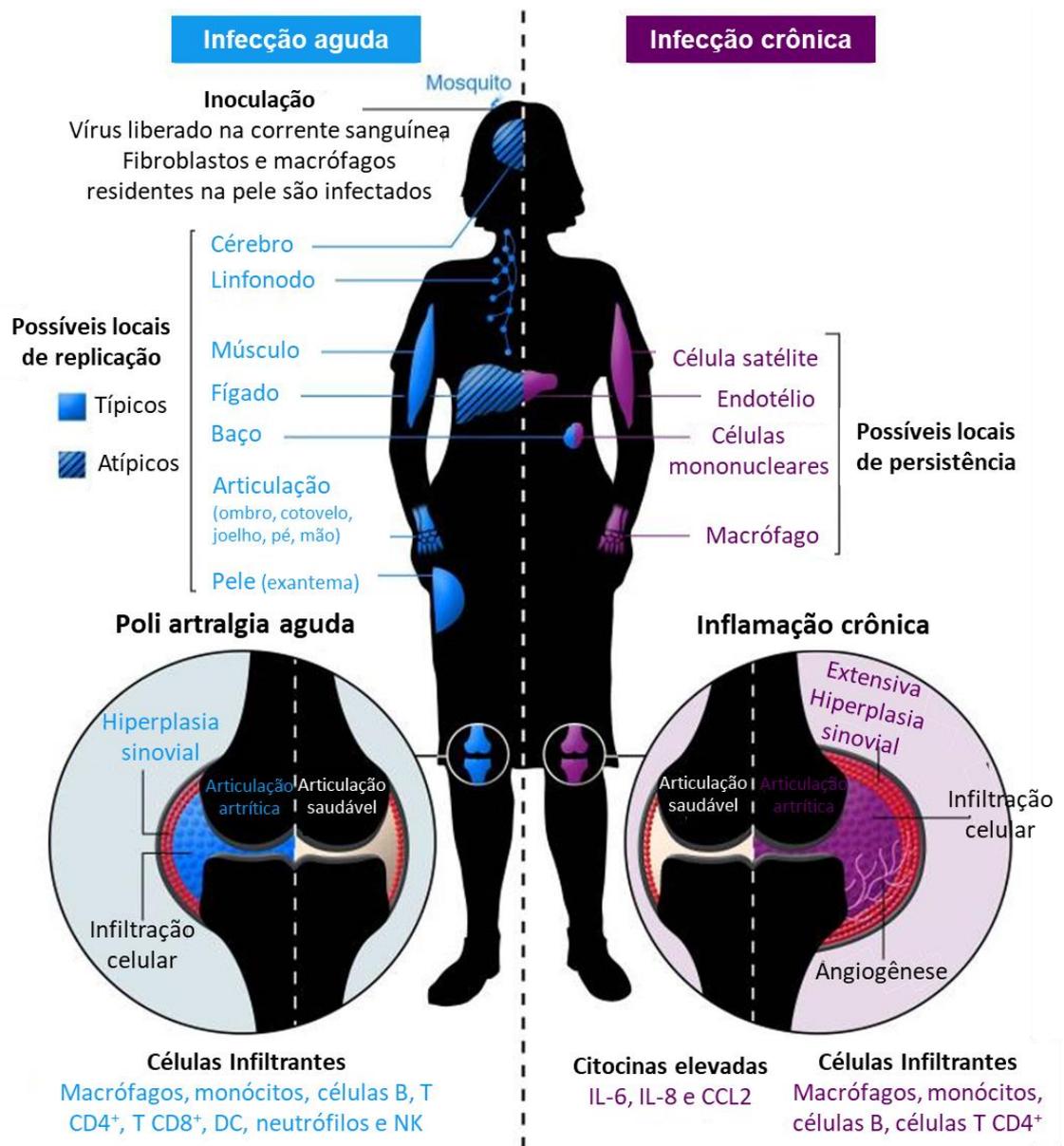


Figura 2. Diferenças entre infiltrados inflamatórios da fase aguda e crônica. O vírus se dissemina através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais típicos (legenda: azul sólido) e atípicos (legenda: azul hachurado) de replicação primária. A infecção aguda provoca uma resposta inflamatória em tecidos infectados, caracterizada por extensa infiltração, principalmente de macrófagos e monócitos, mas também neutrófilos, células NK e linfócitos em tecidos-alvo (indicados em azul). Dentro dos tecidos da articulação, a hiperplasia sinovial se inicia. A replicação viral e as respostas imunes do hospedeiro causam mialgia e poli artralgia nas articulações distais. Os possíveis locais de persistência do CHIKV incluem células endoteliais no fígado e outros órgãos, células mononucleares no baço, macrófagos no líquido sinovial e tecidos circundantes e células satélites no músculo (indicadas em roxo). (Adaptado: SILVA e DERMODY, 2017).

Portanto, os sintomas persistentes, incluindo artralgia, mialgia e artrite; consistentemente encontrados em vários grupos de pacientes infectados com o

CHIKV e outros vírus artritogênicos, sugerem a persistência do vírus em órgãos-alvo ou o estabelecimento de um mecanismo deletério autossustentado que desencadeia danos aos tecidos, provavelmente de natureza inflamatória. Atualmente, pouco se sabe sobre o mecanismo envolvido na persistência da sintomatologia clínica da chikungunya, sendo ainda necessários muitos estudos para a melhor compreensão dessa doença.

1.4 Resposta imune durante a chikungunya

1.4.1 Resposta de células da imunidade inata e adaptativa na chikungunya

A resistência inicial à infecção viral é conferida através de defesas não-específicas, tais como a resposta de interferon. Para tal, o sistema imune inato e adaptativo humano utiliza uma variedade de mecanismos para detectar patógenos infecciosos, tais como ativação de sensores virais citosólicos (RIG-I e MDA5) ou a detecção de ácidos nucleicos virais (TLR). Esses mecanismos geralmente resultam na expressão de interferons do tipo I e II (FRIEDAN et al., 1984; REID et al., 1989).

Os interferons promovem a transcrição de genes para várias proteínas antivirais, as quais agem interrompendo penetração viral, síntese de proteínas virais, transcrição de RNAm virais, replicação do genoma viral e agrupamento e liberação da progênie (SEN, 2001). Além de agir em diferentes etapas da replicação viral, o interferon do tipo I (IFN I) também é essencial em fases mais crônicas da doença mediando a produção e função de citocinas pró-inflamatórias (IVASHKIV e DONLIN, 2014).

Além das formas secretadas do interferon, as IFITMs (proteínas transmembrana induzidas por interferon) compreendem fatores antivirais muito importantes na inibição da infecção celular de um amplo número de vírus envelopados, já que são expressos constitutivamente em muitas células, incluindo células epiteliais de barreira, e podem ser reguladas positivamente por interferons do tipo I e II (FRIEDAN et al., 1984; REID et al., 1989).

Humanos expressam três proteínas IFITM antivirais (IFITM 1-3) (FRIEDAN et al., 1984; REID et al., 1989). Estudos já demonstraram alguns papéis dessas proteínas em alfavírus, onde a expressão aumentada de IFITMs foi capaz de inibir a infecção pelo CHIKV. Weston et al. (2016) demonstraram que alfavírus, como SFV e

SINV, são restringidos por IFITM3, e em níveis menores por IFITM2, mas não por IFITM1. Apesar de não existirem estudos detalhados para a maioria dos vírus, um estudo sobre a influenza A (IAV) sugere que IFITM3 inibe a entrada viral ao interferir com a fusão endossomal mediada por pH ácido (LI et al., 2013; DESAI et al., 2014).

Portanto, tendo em vista a relevância do mecanismo das proteínas IFITM na transmissão viral, em especial o IFITM3 por interferir com fusão endossomal que é essencial para alfavírus, sugere-se a importância de avaliar o impacto dessa molécula na transmissão viral inicial e da transmissão células e, possivelmente, a manutenção crônica da infecção em células imunes.

Macrófagos e monócitos migram para o sítio da infecção por CHIKV formando, junto com neutrófilos, o complexo das principais células do infiltrado inflamatório nas articulações tanto em humanos quanto em modelos de animais (COUDERC et al. 2008, GARDNER et al. 2010, RULLI et al. 2011, HER et al. 2014). Essas células infiltrantes são responsáveis pela produção de mediadores como IL-6, TNF- α e GM-CSF, moléculas chave para o desenvolvimento da doença.

Os neutrófilos são células importantes durante a infecção viral. Uma vez nos tecidos, os neutrófilos são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros mediadores citotóxicos que favorecem a eliminação viral (AGRAZ-CIBRIAN et al., 2017). Os neutrófilos também são responsáveis pela liberação de NETs (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*), que por sua vez, foram caracterizadas como um fator contribuinte para o controle da fase aguda da infecção por CHIKV, tendo um efeito antiviral que auxilia no controle sistêmico dos níveis virais (HIROKI et al., 2019). Alguns estudos demonstraram que um maior edema nas articulações de camundongos TLR3^{-/-} (HER et al. 2014) e CCR2^{-/-} (POO et al. 2014) infectados com CHIKV está associado com maior infiltrado de neutrófilos.

Células dendríticas plasmocitóides (pDCs) são rapidamente ativadas em pacientes durante a infecção aguda (HOURAU et al., 2010), uma vez que são produtores essenciais de IFN I durante infecções virais (SIEGAL et al., 1999). No entanto, pouco se sabe sobre o papel de células dendríticas (DCs) durante a infecção por CHIKV.

As células T parecem apresentar importantes funções no desenvolvimento da doença aguda e crônica durante a infecção por CHIKV. Sabe-se que as células T CD4⁺ e células T CD8⁺ estão presentes no infiltrado inflamatório das articulações em

vários modelos utilizando camundongos infectados com CHIKV (MORRISON et al., 2011). Recentemente, demonstrou-se que células T CD8⁺ estão relacionadas à forte ativação na resposta inicial à infecção por CHIKV em humanos (WAUQUIER et al., 2011), enquanto a resposta T CD4⁺ predomina em estágios mais tardios da doença (WAUQUIER et al., 2011) e tem sido demonstrado por contribuir para a imunopatologia da CHIKV (NAKAYA et al., 2012; TEO et al., 2013) de forma independente de IFN γ (POO et al., 2014). Em contrapartida, o estudo de Hoarau et al. 2010 sugere que existe uma associação entre a doença crônica e uma resposta inflamatória mais exacerbada de células Th1 durante a artrite crônica da chikungunya.

Células B e produção de anticorpos são de extrema importância para o controle da infecção pelo CHIKV (LUM et al., 2013). Contudo, o entendimento do papel dessas células ainda é escasso e superficial. Os anticorpos neutralizantes, apesar de não depender apenas dessa frente imunológica, são associados à proteção duradoura contra o vírus (SCHMALJOHN & MCCLAIN, 1996; LUM et al., 2013).

1.4.2 Similaridades da resposta pró-inflamatória exacerbada da chikungunya e a artrite reumatoide

A manutenção da regulação da resposta imune é necessária para permitir a ativação durante um processo infeccioso, mas também é necessária para controlar os processos inflamatórios desencadeados pela infecção. A desregulação desse balanço pode culminar em uma disfunção imune, por exemplo, uma autoimunidade. Um exemplo desse fenômeno é uma doença que compartilha muitos fatores com a chikungunya, a AR, que é caracterizada pelo aumento da produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, e/ou IL-17 (YIN et al., 2015). A chikungunya aguda, por sua vez, induz uma resposta pró-inflamatória muito similar a observada nos casos de AR, envolvendo predominantemente IFNs tipo I, IL-6, IL-12, TNF- α e MCP-1, GM-CSF e IL-17 (CHAAITANYA et al. 2011; CHOW et al. 2011). Na artrite crônica da chikungunya, também são observados níveis elevados de IL-6 e GM-CSF em pacientes com artralgia persistente comparado com aqueles que se recuperaram (DUPUIS-MAGUIRAGA et al. 2012).

A IL-6 é conhecidamente importante para a inflamação articular na AR, além de estimular à produção de enzimas destruidoras de cartilagem (CHAAITANYA et al. 2011). A similaridade na patogenia pode explicar a efetividade do tratamento da artrite

crônica da chikungunya com tratamentos conhecidos da AR, por exemplo, o metotrexato - MTX (JAVELLE et al., 2015; AMARAL, BINGHAM E SCHOEN, 2018). Na AR, o MTX induz o aumento extracelular da adenosina, e regulação negativa das citocinas pró-inflamatórias (TIAN e CRONSTEIN, 2007).

Apesar de controversos, vários relatos de casos sugerem que a erosão óssea focal ocorre em um pequeno número de pacientes infectados com CHIKV. Os pacientes infectados com CHIKV sem história prévia de artrite mostraram evidências por ressonância magnética (MRI) de inflamação das articulações (PAROLA et al., 2006) e erosão óssea (MALVY et al., 2009) nas mãos e captação anormal de marcadores radioativos nos punhos e tornozelos (CHEN et al., 2015). A capacidade de infecções por alfavírus possuírem um efeito direto na saúde do esqueleto foi também corroborada em um estudo em camundongos infectados com o RRV (CHEN et al., 2014).

1.4.3 Resposta de células Th17 em infecções por alfavírus e sua regulação

A ativação de células T possuem um papel essencial na interação entre os sistemas imune e esquelético. Estudos em modelo animal indicam que células Th17 podem ser um fator de extrema importância no desenvolvimento da artrite autoimune. O potente efeito artritogênico da célula Th17 está diretamente ligado ao efeito pleiotrópico da principal citocina produzida por ela, a IL-17. Ao agir em macrófagos e fibroblastos sinoviais, a IL-17 potencializa a produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-6, IL-1 e TNF α . (JOVANOVIC et al., 1998; MIOSSEC, 2003; KOLLS e LINDEN, 2004). A IL-17 promove a diferenciação de osteoclastos, acarretando na erosão óssea e na destruição da cartilagem. Dessa forma, as células Th17 medeiam o desenvolvimento da artrite através da sinergia da inflamação tecidual, danos na cartilagem e erosão óssea (SATO et al., 2006).

O papel das células Th17 também foi demonstrado no alfavírus Sindbis neuroadaptado (NSV) onde a rápida evolução clínica da doença é decorrente do maior infiltrado de células Th17 no sistema nervoso central (SNC), associado a ausência de IL-10. O exacerbado infiltrado de células Th1 e Th17 também induzem uma maior produção de GM-CSF (KULCSAR et al., 2014).

Portanto, considerando as semelhanças dos perfis imunológicos e produção de diferentes citocinas envolvidas na diferenciação de células T CD4⁺ produtoras de IL-

17 (Th17) por alfavírus e AR (MCINNES e SCHETT, 2011; TANEJA, 2015), e sabendo que as Th17 são reconhecidas como um subtipo associado ao desenvolvimento da AR (HASHIMOTO, 2017), acreditamos que este subtipo celular também esteja envolvido no processo de desenvolvimento da artrite crônica da chikungunya (**Figura 3**).

A ativação de células inflamatórias, tais como a Th17, precisa ser controlada em condições fisiológicas normais para prevenir o desenvolvimento de doenças autoimunes (SAKAGUCHI, 2000). As células T reguladoras (Treg) são um subtipo de célula T CD4⁺, que possuem o potencial de atenuar a resposta imunológica excessiva desencadeada por agentes patogênicos, como a de células T CD4⁺ efetoras, minimizando os danos ao hospedeiro. Esse é um papel fundamental na manutenção da homeostasia imunológica (LEE et al., 2015).

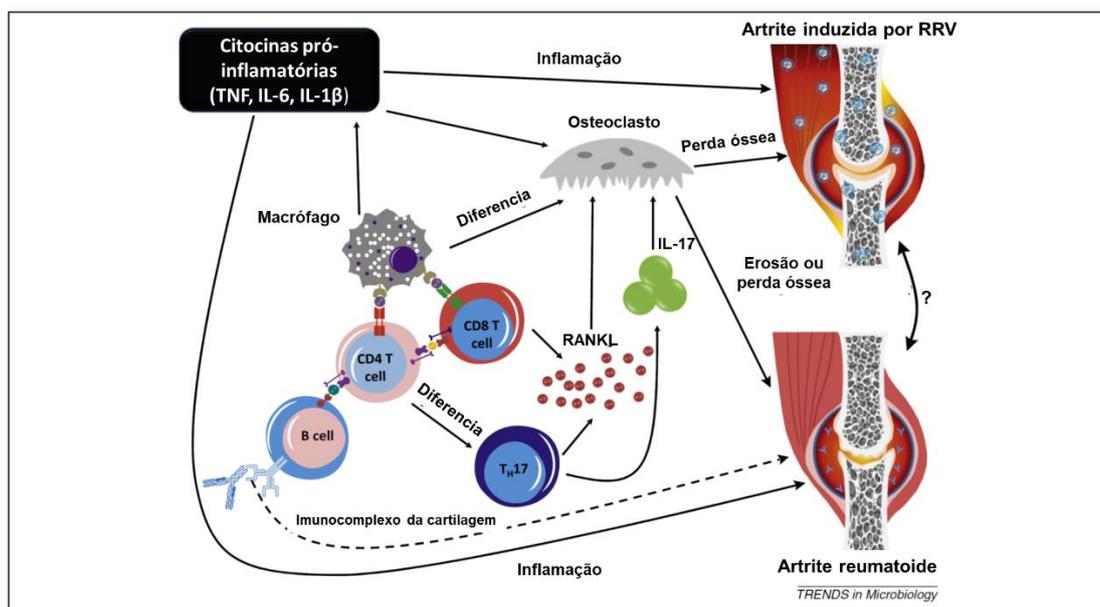


Figura 3. Diagrama comparativo das respostas imunes durante a perda óssea induzida por alfavírus e RA. A expressão de fatores pró-inflamatórios do hospedeiro durante a infecção de alfavírus e na AR pode afetar vários parâmetros imunológicos. Durante a inflamação, os macrófagos assumem uma função central para facilitar várias vias imunológicas que contribuem para os resultados clínicos. Após a ativação, os macrófagos apresentam antígeno para as células T CD4 auxiliares, que por sua vez ativam as células T CD8 citotóxicas e B. Células T CD8 + *naives* também podem ser ativadas por células apresentadoras de antígenos, como macrófagos. Na AR, as células B são uma fonte de fatores reumatóides (FR) e autoanticorpos, que contribuem para a erosão óssea radiológica. As células T CD4 auxiliares *naives* podem se diferenciar em subconjuntos auxiliares T do tipo 17 (Th17) que produzem IL-17 e RANKL. Os macrófagos também podem expressar fatores pró-inflamatórios (IL-6, IL-1 β e TNF- α) que têm a capacidade de aumentar a osteoclastogênese. Tanto na AR quanto na artrite por alfavírus, o aumento da osteoclastogênese é fundamental na indução de patologias ósseas (Adaptado: CHEN et al., 2015).

Recentemente identificada, a IL-35 é membro da família de citocinas da IL-12, e compreende duas subunidades heterodiméricas, IL-12 cadeia α p35 e cadeia β IL-27 (EBI3) (COLLISON et al., 2007). IL-35 é uma das citocinas mais efetivas secretadas pelas Tregs e possui importantes funções inibidoras em doenças infecciosas e autoimunes (GUAN et al., 2017). Sua alta expressão está associada com atividade antiviral contra várias infecções virais (WANG et al., 2016).

Outro membro identificado da família da IL-12 é a citocina IL-27, esta compreende a cadeia β IL-27 (EBI3) e a subunidade p28 (ADAMOPOULOS e PFLANZ, 2013). As funções anti-inflamatórias de IL-27 ocorrem via indução de IL-10 por subtipos celulares como Tr1 (células T reguladoras do tipo 1). A IL-27 sinaliza por stat1, stat3, EGR-2, Blimp-1 para induzir essa produção de IL-10 (BOSMANN e WARD, 2013). Ademais, estudos demonstraram que a IL-27 promove proteção à AR pois suprime as células Th17 e estimula a diferenciação de células Tregs (MOON et al. 2013).

Portanto, visto que a infecção com o CHIKV desencadeia um ambiente pró-inflamatório exacerbado induzido por células Th17, a imunopatogenia da artrite crônica da chikungunya também pode ser decorrente da ausência ou regulação diminuída de células Tregs (CTLA-4, PD-1, IL-10, IL-35), ou até mesmo através da deficiência da resposta de IL-27.

1.4.6 Persistência viral e a artrite crônica da chikungunya

A coletânea de dados da imunopatologia da chikungunya demonstra que mediadores inflamatórios estão relacionados tanto a fase aguda quanto ao estabelecimento da artrite crônica da chikungunya. Na maioria dos indivíduos, a resposta inflamatória a infecção por CHIKV resulta na eliminação viral da circulação sanguínea e na recuperação clínica (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). Contudo, ainda não está elucidado qual é o fator etiológico determinante no desenvolvimento da artrite crônica da chikungunya.

Um questionamento essencial na artrite crônica da chikungunya é se a infecção persistente é responsável pelos sintomas reumáticos crônicos. Hoarau et al. 2010 relataram altos níveis de carga viral em pacientes crônicos, enquanto uma tendência oposta foi observada por Chow et al., 2011 em Singapura. Alguns estudos sugerem que a fase de recuperação, que ocorre entre a fase aguda e a fase crônica, é crítica

para o desenvolvimento da doença crônica. Uma vez que durante esse período mecanismos reguladores são ativados para a resolução da inflamação. Esses mecanismos comumente envolvem macrófagos (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012).

Durante a fase de recuperação, 2-3 meses após a fase aguda, os níveis séricos de CCL-2 se assemelham aos de indivíduos não infectados. A completa recuperação de pacientes foi correlacionada com a produção em altos níveis de eotaxina (quimiocina antagonista de CCR-2) e HGF (inibidor de produção de CCL-2) (CHOW et al., 2011). Além disso, um estudo em modelo animal também demonstrou benefícios na inibição de CCR2 na recuperação de pacientes (RULLI et al., 2011).

Chow et al., 2011 demonstrou altas concentrações de GM-CSF em pacientes que, subsequentemente, desenvolveram sintomas crônicos em comparação com os pacientes que se recuperaram ou com o grupo controle. Corroborando tanto o papel do GM-CSF como um mediador pró-inflamatório em AR (BOYD et al., 2010), e ativação de monócitos e macrófagos (PORCHERAY et al., 2005). Esses dados sugerem que a recuperação requer a inibição da sinalização *downstream* de CCR-2, prevenindo assim o recrutamento de macrófagos para os tecidos.

O HGF também tem efeitos benéficos na regeneração muscular. Ele regula o balanço IL-6 / IL-10 a favor da IL-10 em vários modelos (KAMIMOTO, MIZUNO E NAKAMURA, 2009). Dessa forma, um déficit de HGF pode ser responsável pela persistência de níveis elevados de IL-6 na fase crônica, tanto sistemicamente (CHAAITANYA ET AL., 2011) como localmente (HOARAU et al., 2010). A IL-6 está envolvida na dor nas articulações e aumenta a produção de enzimas destruidoras da cartilagem (KLARESKOG, CATRINA E PAGET, 2009). A ativação do tipo Th1 também foi observada em tecidos articulares alterados, nos quais está associada à persistência viral em macrófagos (HOARAU et al., 2010). Esses dados destacam o papel dos macrófagos na artralgia crônica e na artrite, atuando como reservatório de vírus e como o principal tipo de célula local envolvida na regulação da inflamação e resposta T auxiliar.

Além da teoria da persistência viral, existem outras teorias sobre os possíveis mecanismos pelos quais vírus podem ser implicados na etiopatogenia da artrite viral. Uma delas é a hipótese de que os vírus podem causar ou exacerbar doenças reumáticas pré-existentes de maneira mais geral. Por exemplo, a infecção por

parvovírus B19 pode mimetizar o lúpus eritematoso sistêmico clinicamente e pode desempenhar um papel na patogênese da doença (NAIDES, 1998).

Alternativamente também existe a hipótese que envolve mimetismo molecular entre antígenos do hospedeiro e proteínas virais. Isso pode levar à perda de tolerância imunológica e causar artrite como consequência da sinalização de citocinas e da regulação positiva de outros fatores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF- α (ALBERT e INMAN, 1999).

Um estudo utilizando ferramentas de bioinformática identificou peptídeos da proteína E1 que exibem similaridades a componentes do hospedeiro. Dois peptídeos (A e B) foram sintetizados e utilizados para validar os resultados obtidos *in silico*. Os camundongos injetados com os peptídeos mostraram reatividade em graus variados e foram capazes de induzir inflamação significativa nos músculos, de forma semelhante com os camundongos infectados apenas com o CHIKV. Validando assim a hipótese que o mimetismo celular contribui para a patologia da infecção por CHIKV (REDDY et al., 2017), corroborando com a hipótese de que a persistência viral apresenta um papel chave para a patologia crônica da chikungunya.

Dessa forma, podemos teorizar que não exista apenas um fator determinante para o desenvolvimento da artrite crônica da chikungunya, mas um conjunto de fatores que determinam o desenvolvimento clínico da doença.

1.5 Modelo animal

Atualmente não existe um modelo animal que reproduza a artrite crônica da chikungunya, fato este que dificulta a compreensão do mecanismo envolvido na persistência do sintoma artrítico na infecção pelo CHIKV (CHOW et al., 2011). Modelos utilizados para a pesquisa da chikungunya incluem zebrafish, várias espécies de camundongo, e primatas não humanos (NHPs). Modelos de animais pequenos são importantes para estudos iniciais para identificar mecanismos e opções de intervenção terapêutica.

Camundongos deficientes de receptor de interferon (A129 ou AG129) desenvolvem rápida mortalidade devido à ausência de sinalização de IFN I durante a infecção (COURDEC et al., 2008). Tendo em vista a necessidade do maior conhecimento desta doença Gardner et al. (2010) desenvolveu um modelo adulto em um camundongo imunocompetente que mimetiza a patogenia e os sintomas artríticos

da fase aguda da chikungunya, contudo não induz uma poliartrite ou artrite recorrente típica da doença em humanos.

Sendo assim, a aplicabilidade de um modelo com DBA1/J, modelo de estudo estabelecida de indução de artrite (TRENTHAM, TOWNES e KANG, 1977; DAGLEY et al., 2014), associado com a infecção pelo CHIKV é de interesse para tornar possível a recapitulação das características da doença. Dessa forma, possibilita o entendimento da imunopatologia da doença e possíveis tratamentos que objetivam o controle viral e a doença articular associada, como é observado em pacientes crônicos da infecção por chikungunya.

Modelos animais de artrite autoimune têm-se demonstrado como uma ferramenta valiosa para o estudo dos mecanismos patogênicos dessa doença. Um dos modelos mais estabelecidos é a CIA (do inglês *Collagen Induced Arthritis*). A CIA é induzida em linhagens de camundongos geneticamente suscetíveis, como camundongos DBA1/J, por imunização com colágeno do tipo II (CII) emulsificado em adjuvante completo de Freund (CFA) (TRENTHAM, TOWNES E KANG, 1977).

A patogênese desencadeada pela CIA compartilha diversas características patológicas com a AR, incluindo hiperplasia sinovial, infiltração de células mononucleares, degradação da cartilagem e, como a AR, a suscetibilidade está ligada à expressão de genes específicos do MHC de classe II. No entanto, nesse modelo não há presença do fator reumatoide como na AR (BOISSIER et al., 1987; LONDEI et al., 1989).

Dessa forma, inicialmente consideramos o compilado de dados que sugerem que as manifestações patogênicas e clínicas da artrite crônica da chikungunya como uma mímica da artrite reumatoide. Além disso, sabendo da ausência de um modelo animal que seja capaz de recapitular os sinais clínicos crônicos da chikungunya e acreditando que a artrite crônica da chikungunya pode ser um processo inflamatório pós-infeccioso que necessita de uma espécie de predisposição para o desenvolvimento dos sinais clínicos, desenvolvemos um modelo crônico através da associação do modelo CIA e a infecção por CHIKV. Dessa forma, a compreensão dos paralelos e diferenças entre os modelos que recapitulam a artrite crônica da chikungunya e a AR em um modelo animal pode oferecer novas perspectivas sobre o processo de persistência da chikungunya.

HIPÓTESE

2 Hipótese

A infecção pelo CHIKV em humanos é caracterizada geralmente por uma viremia breve, seguida de rápido *clearance* viral. Apesar disto, existe um relapso da sintomatologia artrítica em uma parcela considerável dos pacientes infectados pelo CHIKV (RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2016). Quando essas manifestações artríticas duram mais que 3 meses, podemos caracterizar a doença como artrite crônica da chikungunya (AMARAL, BINGHAM E SCHOEN, 2018). No entanto, os mecanismos relacionados a evolução da fase aguda para a crônica permanecem obscuros. Diante do crescimento espantoso da incidência de doenças causadas por arboviroses em todo o território brasileiro, principalmente alfavírus artritogênicos, afetando uma quantidade considerável da população com um acometimento físico incapacitante, fica ainda mais evidente as lacunas de conhecimento referente ao processo de desenvolvimento da artrite crônica da chikungunya. Neste contexto, compreender a fisiopatologia desta doença é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes e, conseqüentemente, melhor prognóstico da doença. Nossa hipótese é que as células T, na presença da infecção por CHIKV, diferenciam preferencialmente para um perfil inflamatório de células Th17, e que esse processo é dependente da persistência viral em macrófagos residentes nos tecidos-alvo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver e caracterizar um modelo animal de artrite crônica induzida pelo vírus da chikungunya.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 PARTE 1:

- a) Desenvolver e caracterizar o modelo animal crônico de chikungunya através da associação do modelo CIA e modelo de infecção CHIKV – modelo CIA+CHIKV;
- b) Determinar especificidade do fenótipo clínico gerado pelo CHIKV utilizando o ZIKV como controle;
- c) Avaliar a expressão dos genes inflamatórios e reguladores de resposta no modelo crônico de chikungunya (CIA+CHIKV);
- d) Caracterizar fenotipicamente as células Th1, Th17, Treg em animais e pacientes infectados com CHIKV na fase crônica *in vivo* e *ex vivo*;
- e) Determinar a correlação entre as células Th17 com os diferentes níveis de gravidade do desenvolvimento dos sinais clínicos da artrite crônica induzida pelo CHIKV *in vivo*;
- f) Confirmar funcionalmente o envolvimento das células T CD4⁺ no fenótipo clínico gerado pela infecção com CHIKV;
- g) Demonstrar se há comprometimento de mecanismos de inflamação e regulação em células de pacientes crônicos incubados com CHIKV *in vitro*.

3.2.2 PARTE 2:

- h) Avaliar *in vitro* o tropismo da infecção por alfavírus artritogênicos (CHIKV e RRV) em células T e macrófagos em células primárias de camundongos e humanas;
- i) Avaliar o papel de macrófagos na modulação da resposta de células T na infecção pelo RRV;
- j) Investigar o papel de macrófagos na produção de citocinas como IL-6, IL-10, e IL-12 frente a infecção por RRV e CHIKV *in vitro*;

- k) Investigar o impacto das IFITM3 na permissividade da infecção por alfavírus *in vitro*.
- l) Avaliar a persistência viral em macrófagos murinos *in vitro* e em modelo animal da artrite crônica induzida pelo CHIKV (CIA+CHIKV).

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos IFNAR^{-/-}, com aproximadamente 4 a 6 semanas de idade. Além de camundongos machos DBA1/J com idades entre 6 e 12 semanas. Os animais foram mantidos em ambiente de temperatura controlada (22 a 25°C) e receberam água e ração *ad libitum* no biotério do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). O projeto foi realizado mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Experimentação Animal (CEUA: 245/2017) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

4.2 Propagação e titulação viral

O vírus da chikungunya utilizado foi isolado do soro de um paciente atendido no hospital universitário da Universidade Federal de Pernambuco. Através do sequenciamento observou-se que o vírus é associado ao genótipo da cepa asiática. A cepa virulenta de RRV (estirpe T48) foi obtida do laboratório do Dr. Mark Marsh (London, UK).

Para a propagação e titulação viral do CHIKV foram utilizadas as células Vero (fibroblastos de rim de macaco verde africano) em DMEM (GIBCO) suplementado com 2% soro fetal bovino (SFB) (GIBCO). E para o RRV foram utilizadas as células BHK-21 (fibroblastos de renais de hamster) em RPMI 1640 suplementado com 2% SFB. A infecção foi mantida por 48-72h para avaliação do efeito citopático e então coleta do vírus.

A titulação do estoque de CHIKV foi de 1×10^7 pfu/ml e RRV foi de 1.1×10^{10} pfu/ml por ensaio de placa, conforme descrito abaixo. Os vírus obtidos foram aliquotados em eppendorfs e mantidos em freezer a -70°C até à realização dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados a partir do estoque viral obtido de uma única propagação viral.

4.3 Ensaio de placa

Para avaliação de carga viral e formação de nova progênie viral em diferentes experimentos, foi utilizado o método de formação de placa. Para isso, foram utilizadas células Vero e BHK-21, conforme o vírus utilizado. As células foram tripsinizadas e

plaqueadas em placas de 24 poços na quantidade aproximada de 3×10^5 células por poço e deixadas *overnight* para aderência. Logo, as células foram lavadas com solução de PBS para retirada do soro e incubadas com uma diluição seriada do vírus em meio DMEM em estufa, por 2 horas, a 37°C e 5% de CO₂, sendo completado com uma solução de meio DMEM, com 2% de carboximetilcelulose, até 0,5mL e mantidas em estufa por dois dias. Após esse período, o meio foi aspirado e as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por meia hora. Após a retirada do paraformaldeído e lavagem com solução de PBS, as células foram incubadas com solução cristal violeta 2% por meia hora, lavadas e a formação das placas foram contadas.

4.4 Estabelecimento de novo modelo experimental de infecção com CHIKV

4.4.1 Indução de artrite experimental em modelo animal

A artrite experimental foi induzida com colágeno do tipo II (CII) conforme descrito anteriormente (BRAND, LATHAM e ROSLONIEC, 2007). Cada animal recebeu uma concentração de 200 µg de CII bovino (Sigma) diluído em ácido acético e emulsificado em adjuvante completo de Freund's (Sigma) através de inoculação intradérmica (i.d.) na base da cauda no dia 0. Uma dose de reforço será aplicada i.d. no 21º dia com colágeno (diluído em ác. acético) emulsificado em adjuvante incompleto de Freund's (Sigma) (**Figura 4A**). No entanto, o protocolo padrão necessita de uma complementação com micobacterium para a indução da artrite de forma ótima. Como o nosso objetivo era avaliar o papel do CHIKV utilizamos um protocolo sub-ótimo que funcionasse apenas como um trigger para o desenvolvimento dos sinais clínicos.

4.4.2 Infecção com vírus da chikungunya em modelo animal

Os camundongos foram infectados com uma concentração de 1×10^5 pfu CHIKV em 50µl na região ventral da pata traseira esquerda. Os camundongos controles sem infecção foram injetados com 50µl do MOCK (sobrenadante da Vero não infectada) na região ventral da pata traseira esquerda.

4.4.3 Modelo experimental de infecção de sinais crônicos da Chikungunya

Para a criação do modelo animal crônico de chikungunya associamos o protocolo CIA com a infecção com CHIKV. Inicialmente foram criados dois grupos em

potencial. O grupo CIA+CHIKV (**Figura 4B**), onde a infecção com o vírus ocorre simultaneamente com o desafio com o colágeno do tipo II. Além desse, também foi criado o grupo CHIKV►CIA (**Figura 4C**), neste grupo a infecção é realizada antes do processo de imunização com o CII.

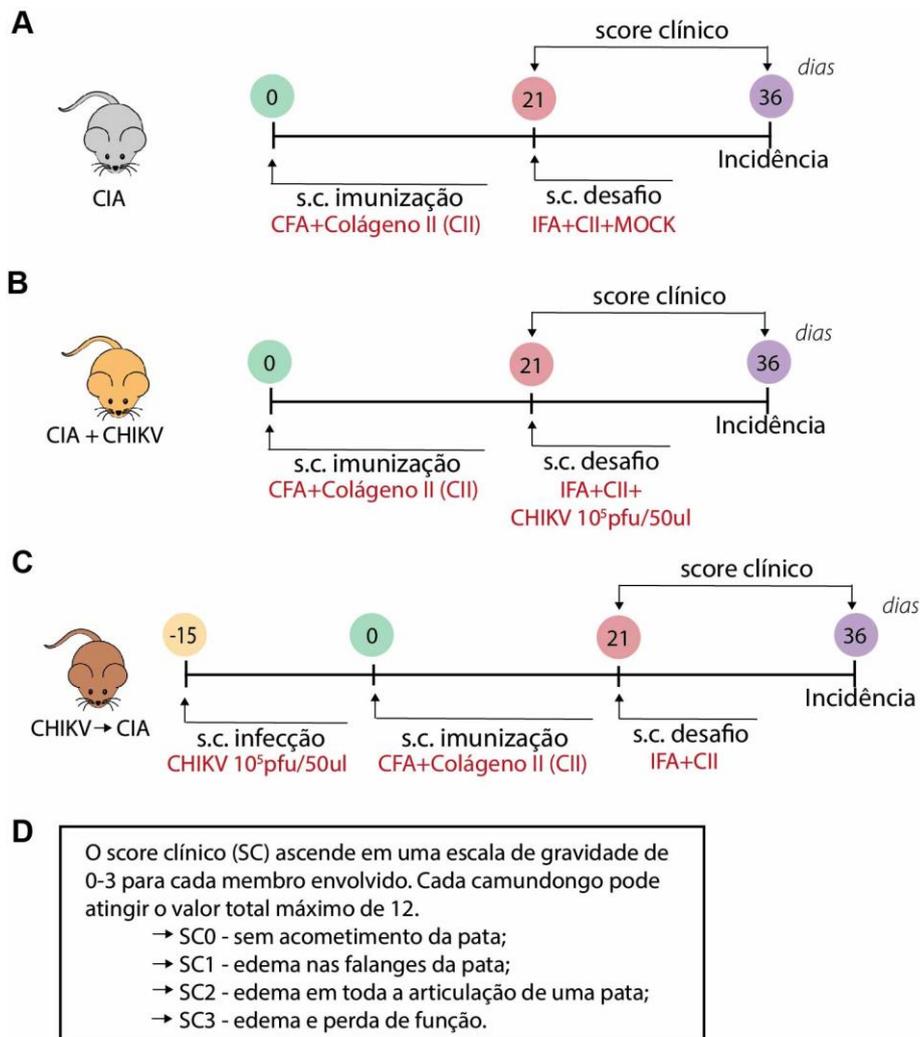


Figura 4. Desenvolvimento do modelo animal de infecção crônica por CHIKV. A ilustração esquemática mostra o protocolo experimental. (A) Camundongos DBA1/J foram imunizados pelo protocolo CIA, a imunização com CII+CFA no dia 0 e o desafio com CII+IFA no dia 21. Para a criação do modelo animal crônico de chikungunya a infecção com CHIKV foi realizada no (B) 21º dia, logo após ao desafio e (C) antes da imunização no -15º dia do protocolo CIA. (D) Os sinais clínicos foram avaliados em todas as patas de cada camundongo (a escala de gravidade varia de 0-3).

4.4.4 Avaliação clínica da artropatia associada aos modelos utilizados

Os sinais clínicos foram avaliados em todas as patas de cada camundongo de acordo com uma escala de gravidade de 0-3. 0 = sem acometimento de nenhum sinal na pata; 1 = edema e eritema nas falanges da pata; 2 = edema e eritema envolvendo

toda a pata; 3 = membro com inflamação máxima, edema na pata e articulações subjacentes e perda de função (CARREGARO et al., 2011). Todos os camundongos foram pontuados e avaliados diariamente (**Figura 4D**).

4.5 Transferência de células e bloqueio com anti-IL-17

Foram realizados experimentos de transferência de células T CD4⁺ (1x10⁶), obtidas de linfonodos (LN) de camundongos CIA e camundongos CIA+CHIKV, através da purificação por beads de CD4⁺ (Miltenyi Biotec, USA), conforme descrito pelo fabricante. Essas células foram injetadas via intravenosa (i.v.) nos camundongos recipientes CIA, que não desenvolveram sinais clínicos 1 mês após o desafio (s.c.). Os camundongos foram acompanhados por 15 dias para avaliar a incidência de sinais. Os animais foram então sacrificados e suas articulações coletadas para histologia.

Para validar o papel da IL-17 na exacerbação do modelo CIA frente a infecção por CHIKV, camundongos recipientes foram tratados com mAb anti-IL-17A de camundongos (BE0173, BIOXCELL) 200µg/camundongo no dia da transferência de células, 3^o e 6^o dia pós transferência de células (POLLINGER et al., 2011).

4.6 Extração de RNA

A extração do RNA total das amostras do linfonodo drenante (poplíteo e inguinal) e do baço foi realizada utilizando o kit de extração de RNA (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram eluídas em 50µl de água deionizada e livre de Rnase, sendo então armazenadas a -70 C. A quantificação da concentração de RNA foi determinada utilizando o aparelho NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.7 Quantificação de RNA viral por qPCR do vírus da Chikungunya

O RNA viral das amostras de soro e sangue foi extraído através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. A técnica de qPCR com TaqMan® descrita por Lanciotti et al (2007) foi utilizada para detecção do vírus da Chikungunya, através de *primers* CHIKV 6856F (5' TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA 3') e CHIKV 6981R (5' TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC 3') e sonda CHIKV 6919 P (FAM 5' AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG 3'). As reações de foram realizadas no equipamento GeneAmp 7700 da Applied Biosystems (Thermo Scientific, USA). Para

quantificação da carga viral construímos uma curva padrão a partir de diluições seriadas do RNA do nosso vírus de estoque (CHIKV).

4.8 Construção de cDNA

Para construção do cDNA, 500ng do RNA extraído foi utilizado no kit de transcrição reversa High Capacity cDNA (Applied Biosystems, Thermo Scientific, USA), 5µl de cDNA foram utilizados por reação para a avaliação da expressão quantitativa dos genes de interesse.

4.9 Reações de PCR em tempo real

A expressão quantitativa dos genes das moléculas: IL12p35, IL27, EBI3, dos fatores de transcrição: Tbet, FOXP3, RORγt, Stat3, das citocinas: IL-23, IL-17, IL-6, TFG-β e IL-10, e quimiocinas CCL2, CCL5 e CCL20, foi analisada através de reações de PCR em tempo real, utilizando-se os sistemas SYBR Green em um aparelho GeneAmp 7700 (Applied Biosystems, USA). Primers adequados para tais reações foram criados a partir do programa Primer Express (Applied Biosystems) (Sequências específicas de cada primers estão dispostas em anexo). Os valores de ΔCt para cada uma das amostras avaliadas foram calculados da seguinte maneira: $\Delta Ct = CT \text{ gene interesse} - CT \text{ gene referência (Hprt)}$. A expressão relativa do RNA mensageiro (RNAm) amostral em relação ao grupo controle foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ controle}$.

4.10 Fenotipagem celular por citometria de fluxo

As células extraídas dos órgãos foram caracterizadas fenotipicamente, empregando-se diversos marcadores: CD3, CD4, CD8, FoxP3, RORγt, IFN-γ, IL-17, IL-10 e E2 alfavírus. Para a caracterização das citocinas intracelulares, 2×10^6 células foram previamente cultivadas por 4 horas na presença de PMA (50 ng/ml) (Sigma, St. Louis, MO, EUA), ionomicina (500 ng/mL) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e brefeldina A (100 ng/mL) (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Para a marcação das células, elas foram lavadas com PBS, ressuspensas em 100µl de PBS e incubadas com fc block diluída 1:1, por 20 minutos a 4°C. Em seguida, após lavagem as células foram incubadas com o mix de anticorpos monoclonais específicos (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). As células foram mantidas por 30 minutos a 4°C, lavadas com 1 mL de PBS 1x e centrifugadas a 400 xg por 1 minuto. As aquisições foram realizadas no

aparelho FACSCanto II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), e as análises realizadas usando os *softwares* “FACSdiva” (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) e “FlowJo” (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

4.11 Isolamento de PBMC de pacientes e voluntários saudáveis

Amostras de sangue periférico de indivíduos foram obtidos em tubo contendo anticoagulante EDTA e pipetadas cuidadosamente em um gradiente de Ficoll, centrifugadas por 30 minutos, a 650g, temperatura ambiente. Em seguida, as células mononucleares foram isoladas, lavadas com PBS1x, ressuspendidas em meio RPMI-1640 suplementado com 0.1% de BSA e contadas em câmara de Neubauer.

As amostras de PBMC de pacientes (n=3) e seus controles pareados de sexo e idade (n=3) foram utilizadas para análises de expressão de mRNA e marcações de citometria de fluxo (conforme descrito anteriormente). As amostras (PBMC) dos indivíduos saudáveis foram sorteados através de beads magnéticas para obtenção de células T CD4⁺ (Seleção negativa de CD4, BD, UK), e para obtenção de monócitos CD14⁺ (Seleção negativa de monócitos, BD, UK), conforme descrito pelo fabricante. Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste trabalho participaram voluntariamente da pesquisa, sendo esclarecidos sobre a importância do trabalho.

4.12 Cultura de macrófagos humano

Os monócitos (CD14⁺), obtidos do PBMC, foram ressuspendidos em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro humano, 100u/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Para a diferenciação de macrófagos humanos, os monócitos foram colocados em cultura com o M-CSF (20ng/mL). Os meios foram trocados ao terceiro dia de cultura para ambas os subtipos celulares. A cultura foi mantida à 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ por 7 dias.

Essas células foram então infectadas com diferente MOI (50, 10, 2) do RRV, MOI (1) do ZIKV e MOI (20, 5,1) do CHIKV por 48 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de citocinas IL-6, IL12p70 e IL-10 pelo método de ELISA, e as células foram submetidas à imunofluorescência para marcação da internalização viral. Também foram realizadas co-culturas entre as APCs e células T ativadas (4:1) para dosagem de IL-17 e INF-γ por 72 horas.

4.13 Quantificação de citocinas por ELISA.

A presença de citocinas IFN- γ (DY285B-05), IL-10 (DY217B-05), IL-12 (DY1270-05) IL-6 (DY206-05), IL-17(DY317-05) nos linfonodos, baço, sobrenadante de culturas e soro de pacientes foram analisadas pelo método de ELISA com kits específicos para tais dosagens, de acordo com as especificações do fabricante (R&D System, Minneapolis, USA). Quando a quantificação foi realizada em homogeneizado dos tecidos utilizou-se uma solução contendo inibidores de protease. utilizando. Os valores de absorbância foram quantificados em espectrofotômetro Spectra Max 190 em filtro de comprimento de onda de 450 nm (Molecular Devices, EUA).

4.14 Imunofluorescência para marcação celular e internalização viral

Macrófagos de humanos, foram isolados pelo protocolo já descrito e infectados com o CHIKV, RRV e ZIKV por 48 horas. Após o período de incubação da infecção as células nas lamínulas foram lavadas e fixadas com PFA 4%. No modelo animal também foram obtidas células do dLN e do líquido sinovial [CIA+CHIKV e CIA], que foram plaqueadas e fixadas. Logo, as amostras foram lavadas e “quenched” com 50 mM NH₄Cl em PBS1x, e permeabilizadas com 0.1% de Triton X-100 em um tampão de bloqueio (6mg/mL de IgG humano purificado e 0.5% BSA em PBS). Células foram incubadas com os anticorpos primários (90min) e secundários (60 min) à temperatura ambiente, protegidos da luz e sendo levemente roçados. A lista de anticorpos e suas concentrações estão determinadas abaixo. O núcleo das células foi corado e as lamínulas montadas com ProLong™ Gold Antifade Mountant com DAPI (Invitrogen™). As imagens do confocal foram adquiridas com o microscópio confocal Leica TCS SPE3 e SPE5, objetiva de imersão com óleo 63x (Leica Microsystems, Milton Keynes, UK). As imagens foram processadas utilizando o ImageJ (NIH, USA).

4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5 (versão 5.0.0; GraphPad Software Inc., EUA). Para análise comparativa entre os diferentes grupos foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos de indivíduos não infectados, e os infectados pelo vírus Chikungunya na fase crônica. O teste *one-way* ANOVA com *post-test* Bonferroni foram usados para avaliar os efeitos de apenas 1 parâmetro entre

mais de 2 grupos. O teste T não pareado foi realizado para comparar 2 grupos. Foram consideradas significativas as comparações em que $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

PARTE 1. O papel da célula Th17 na infecção crônica por CHIKV

5.1 DBA1/J são resistentes a infecção por CHIKV.

Os modelos animais, camundongos especificamente, são uma poderosa ferramenta nos estudos de diversos aspectos da infecção por CHIKV. No entanto, até o momento os modelos não são capazes de reproduzir aspectos específicos da infecção humana, tais como, a fase crônica da chikungunya (CHOW et al., 2011). Dessa forma, para elucidar a fisiopatologia da artrite crônica da chikungunya, um dos nossos objetivos foi desenvolver um modelo animal que melhor reproduzisse os sinais comumente associados a fase crônica da doença causada pelo CHIKV em humanos. Utilizamos o camundongo DBA1/J devido a sua predisposição para desenvolver AR. Esses animais possuem HLA que conferem suscetibilidade à artrite induzida pela CIA (BOISSIER et al., 1987; BRAND, LATHAM e ROSLONIEC, 2007).

Inicialmente, duas linhagens de camundongos, DBA1/J e IFNAR^{-/-}, foram inoculados com CHIKV na pata esquerda para avaliarmos a suscetibilidade, replicação e disseminação viral (**Figura 5A**). As cargas virais foram quantificadas por qPCR em diversos tecidos e tempos pós infecção e a sobrevivência desses camundongos avaliada por até 30 dias pós-infecção (dpi).

Os resultados demonstram que camundongos IFNAR^{-/-} são suscetíveis ao CHIKV, sucumbindo 2 a 3 dpi, enquanto os camundongos DBA1/J são resistentes a infecção (**Figura 5B**). A quantificação por qPCR demonstra a presença de RNAm viral desde o primeiro até o 7º dia dpi em todos os tecidos avaliados (**Figura 5C-5F**). Nos camundongos DBA1/J, o pico da carga viral foi entre 1-2 dpi na pata, cérebro, fígado e baço. Dessa forma, apesar dos camundongos DBA1/J sobreviverem a infecção, os dados mostram que são passíveis a infecção por CHIKV e, portanto, ideais para o desenvolvimento do modelo animal crônico da chikungunya.

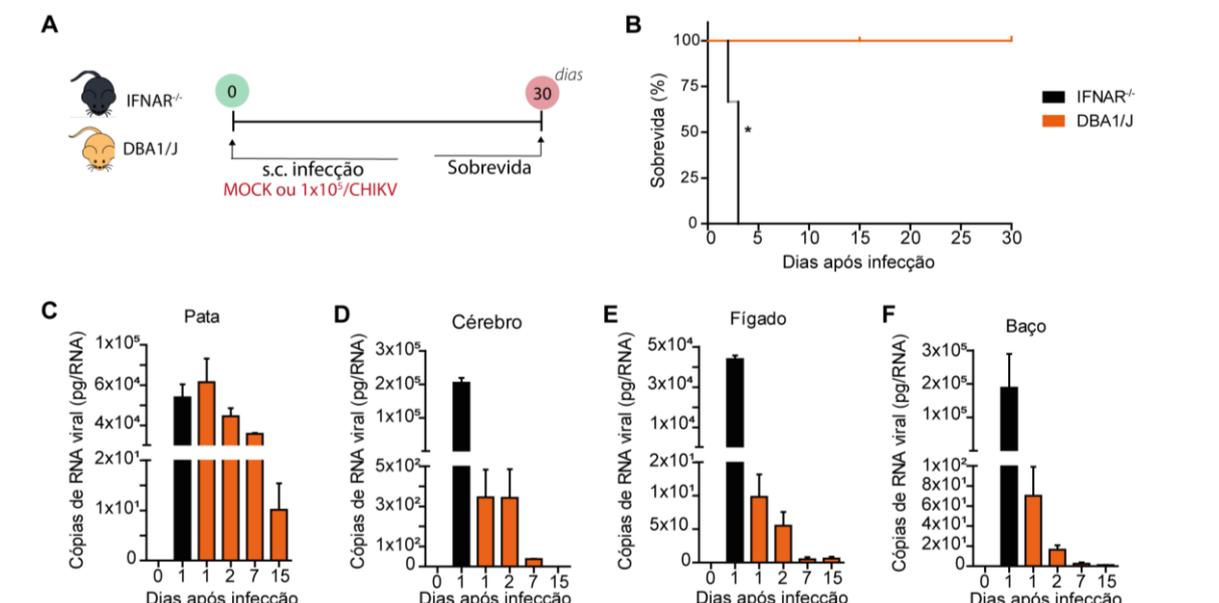


Figura 5. Estabelecimento da infecção por CHIKV em camundongos DBA1/J. Os camundongos DBA1/J, e IFNAR^{-/-} foram infectados na região ventral da pata traseira com 10⁵/CHIKV em 50μL de MOCK, conforme a ilustração esquemática (A), e a sobrevivência avaliada (B). A cinética da expressão de RNA do CHIKV em pg/RNA foi realizada na pata (C), cérebro (D), fígado (E), baço (F). Os dados foram expressos como médias ± SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com **p* < 0,05. Todos os grupos possuem dados significantes (*p* < 0,05) entre si, desde que não esteja especificado o contrário (ns = não significativo). Dados representativos de dois experimentos independentes.

5.2 Cinética de expressão de genes polarizantes para o perfil Th17

Células produtoras de IL-17, principalmente as Th17, são reconhecidamente associadas à AR (JOVANOVIĆ et al., 1998; MIOSSEC, 2003; KOLLS e LINDEN, 2004). Diversos estudos demonstram semelhanças nos perfis imunológicos entre a infecção por chikungunya e a AR (CHAAITANYA et al. 2011; CHOW et al. 2011, JAVELLE et al., 2015; AMARAL, BINGHAM E SCHOEN, 2018). Com base nisso, os subtipos de células T produtoras de IL-17, e, conseqüentemente, suas citocinas polarizadoras, podem estar diretamente envolvidas na patogênese crônica da chikungunya.

Sendo assim, inicialmente, experimentos foram realizados a fim de investigar a expressão de genes associados as células Th17 durante o protocolo de infecção por CHIKV (**Figura 6**) e da CIA (**Figura 7**), uma vez que o nosso modelo animal crônico utilizou a associação de ambos os protocolos. Para isso, realizamos uma cinética de expressão do RNAm de IL-6, IL-17, IL-1β e IL23p19 em LN drenantes (dLN) (**Figuras 6A e 7A**) e região ventral da pata traseira (**Figuras 6F e 7F**).

Nossos resultados com camundongos infectados por CHIKV demonstram um aumento significativo da expressão gênica de IL-6 nos dLN com 1 dpi (**Figura 6B**), IL-1 β entre 1-2 dpi (**Figura 6C**), e IL-23 entre 2-5 dpi (**Figura 6D**). Não se observou a expressão de IL-17 (**Figura 6E**) em relação ao grupo MOCK nos tempos avaliados. Corroborando esses dados, localmente na região da pata a expressão gênica do IL-17 tem seu ápice de expressão no 5 dpi (**Figura 6J**). Localmente, a IL-1 β (**Figura 6H**) é expressa mais tardiamente, 10 dpi, e a expressão de IL-23 (**Figura 6I**) encontra-se diminuída até 15 dpi, quando ocorre um aumento da expressão dessa molécula em comparação com 1 dpi-10 dpi. A expressão de IL-6 se mantém aumentada por todo tempo avaliado na cinética, com o pico de expressão 10 dpi na região da pata (**Figura 6G**).

Quanto ao modelo CIA, os resultados demonstram que os genes de IL-1 β são expressos com 1 dia pós desafio (dpd) (**Figura 7C**); IL-23 no 1 dpd e entre 10-15 dpd (**Figura 7D**); e IL-17 no 1 dpd (**Figura 7E**), enquanto a expressão gênica de IL-6 não é observada nos dLNs no período avaliado (**Figura 7B**). Na região da pata, a expressão de IL-17 (**Figura 7J**) ocorre no 15 dpd, ou seja, sua expressão é mais tardia quando comparada a IL-17 local do modelo CHIKV (**Figura 6J**). Localmente, os genes da IL-1 β (**Figura 7H**) também são expressos 1 dpd, enquanto a expressão de IL-23 (**Figura 7I**) 1-15 dpd encontra-se regulada negativamente comparada ao *naive*. IL-6 na CIA é expressa de forma similar ao observado no CHIKV, sendo expressa entre 1-15 dpd (**Figura 7G**), mas em menores níveis quando comparado ao CHIKV na região plantar (**Figura 6G**).

Desta forma, estes dados sugerem que as citocinas associadas a polarização e manutenção de perfil de Th17 estão expressas nos LN drenantes (poplíteo e axilar) e localmente na região da pata durante os estágios iniciais de ambos os modelos, porém em tempos diferentes.

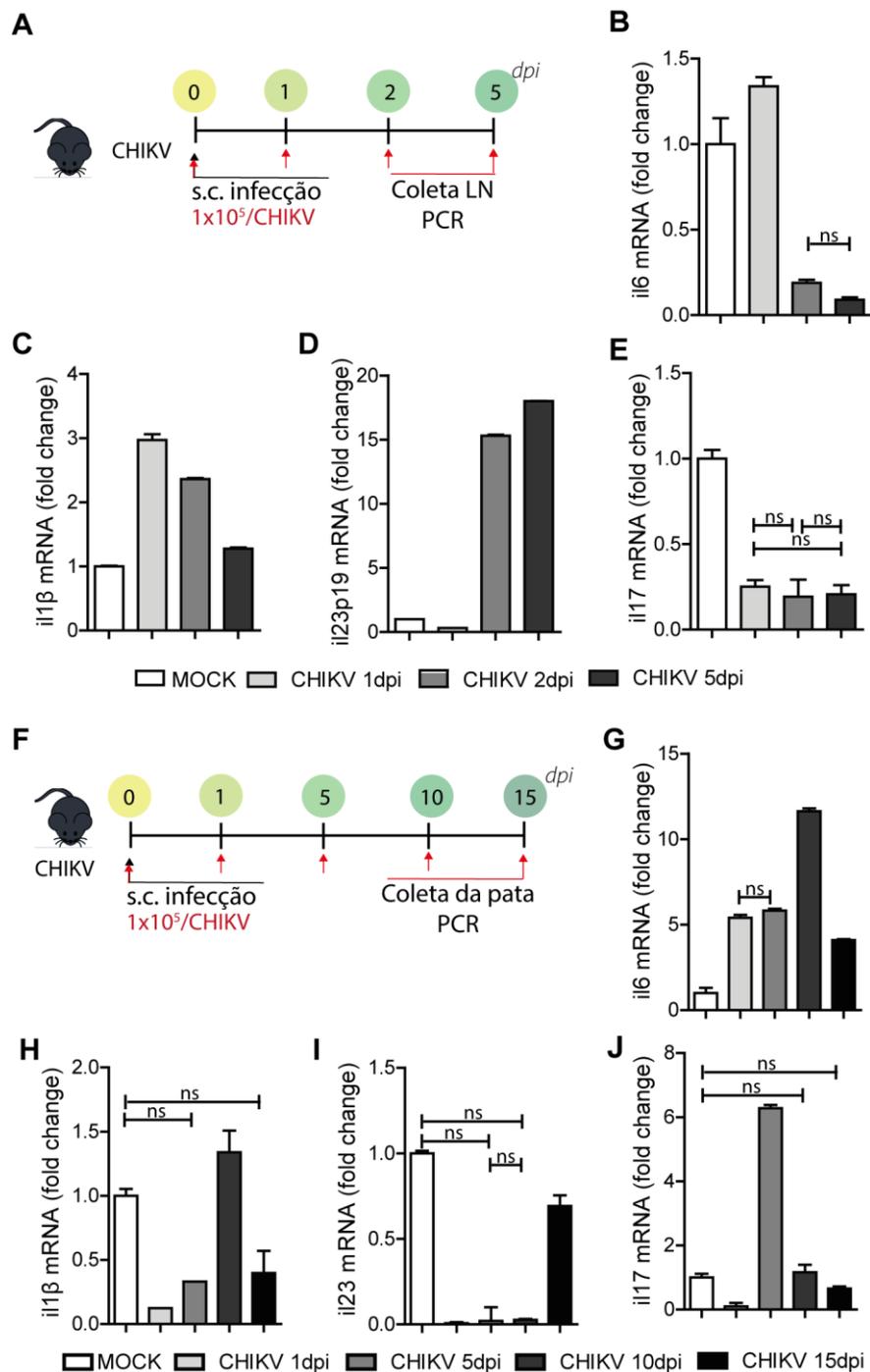


Figura 6. Cinética de infecção por CHIKV para avaliar a expressão de genes polarizantes para o perfil Th17. Os camundongos DBA1/J foram infectados na região ventral da pata traseira com 10^5 /CHIKV ou MOCK em $50\mu\text{L}$ e os dLNs e patas foram coletados conforme a ilustração esquemática (A) e (F), respectivamente. A cinética da expressão foi avaliada no dLN dos genes IL-6 (B), IL-1 β (C), IL23p19 (D) e IL-17(E). A cinética de expressão também foi realizada localmente na pata dos genes IL-6 (G), IL-1 β (H), IL23p19 (I) e IL-17 (J). Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $*p < 0,05$. Todos os grupos possuem dados significantes ($p < 0,05$) entre si, desde que não esteja especificado o contrário (ns = não significante). Naive $n=4$; CIA 1dpd $n=4$; CIA 2dpd $n=3$; CIA 5dpd $n=4$; CIA 10dpd $n=4$; CIA 15dpd $n=4$.

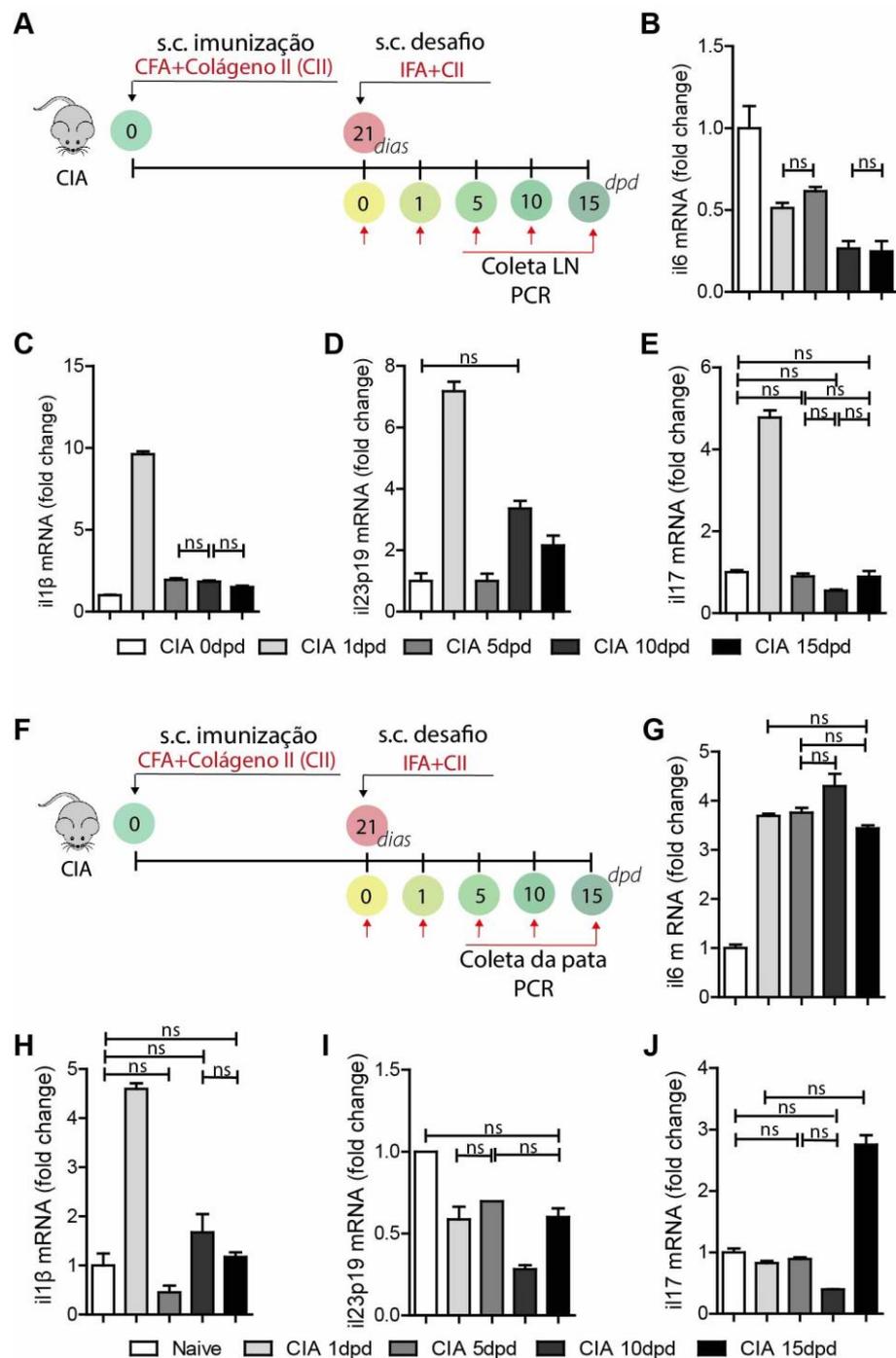


Figura 7. Cinética de imunização por CIA para avaliar a expressão de genes polarizantes para o perfil Th17. Os camundongos DBA1/J foram imunizados pelo protocolo CIA e os dLNs e patas foram coletados conforme a ilustração esquemática (A) e (F), respectivamente. A cinética da expressão foi avaliada no dLN dos genes IL-6 (B), IL-1 β (C), IL23p19 (D) e IL-17(E). A cinética de expressão também foi realizada localmente na pata dos genes IL-6 (G), IL-1 β (H), IL23p19 (I) e IL-17 (J). Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $*p < 0.05$. Todos os grupos possuem dados significantes ($p < 0,05$) entre si, desde que não esteja especificado o contrário (ns = não significante). Naive n=4; CIA 1dpd n=4; CIA 5dpd n=4; CIA 10dpd n=4; CIA 15dpd n=4.

5.3 A infecção por CHIKV contribui para a suscetibilidade ao desenvolvimento dos sinais artríticos da chikungunya

O protocolo de indução de artrite por colágeno (CIA) já é um modelo bem estabelecido no estudo da artrite experimental em camundongos (TRENTHAM, TOWNES E KANG, 1977; BOISSIER et al., 1987; LONDEI et al., 1989). Para avaliarmos do papel do CHIKV no desenvolvimento de artropatias como ocorre em humanos, os camundongos DBA1/J machos foram imunizados e desafiados com CII via subcutânea, isto é, utilizando o protocolo CIA adaptado (conforme detalhado na metodologia), na presença ou ausência da infecção por CHIKV em diferentes tempos - 15 dias pré-imunização ou 21° pós-imunização (**Figura 8A**). O aparecimento e a gravidade da doença foram aferidos através dos critérios de score clínico descritos anteriormente na metodologia.

Os nossos resultados demonstram que a presença do CHIKV aumenta a incidência de desenvolvimento dos sinais clínicos [CIA+CHIKV] com 70% (n=7) dos camundongos afetados, em comparação com o grupo CIA com 20% (n=2) (**Figura 8B**). Podemos observar um adiantamento no surgimento dos sinais em ambos os grupos infectados com o CHIKV, onde os sinais artríticos começam a ser observados 7-9dpd, em comparação com os camundongos tratados apenas com o CIA cujos sinais surgem entre 15-17dpd (**Figura 8C-D**). Ademais, o grupo CIA+CHIKV apresenta uma maior média de patas afetadas em comparação a todos os grupos (**Figura 8C**). Portanto, os dados sugerem que o vírus possui um efeito, além do protocolo CIA, no desenvolvimento dos sinais artríticos.

5.4 O CHIKV é capaz de induzir o surgimento dos sinais clínicos em camundongos CIA que não haviam desenvolvido doença

Sabe-se que nem todos os camundongos tratados com CIA são capazes de desencadear os sinais clínicos da doença (BRAND, LATHAM e ROSLONIEC, 2007). Portanto, para corroborar o fenótipo observado, que o CHIKV tem papel no desenvolvimento da doença artrítica em camundongos, utilizamos camundongos que não desenvolveram sinais artríticos após o protocolo CIA. Após 20 dias do desafio com CII, camundongos sem sinais clínicos foram infectados com CHIKV ou MOCK. A evolução dos sinais clínicos foi avaliada através dos scores clínicos (**Figura 9A**). Os dados demonstram que 75% dos camundongos começaram a desenvolver os sinais

clínicos da doença (**Figura 9B**) um dia após a infecção com o CHIKV, o que não foi observado em camundongos infectados com MOCK (**Figura 9C**).

Dessa forma, os dados sugerem que a presença do CHIKV possui um fator de gatilho para o desencadeamento dos sinais clínicos, onde o surgimento é dependente de uma imunização prévia do camundongo, o que corresponderia a uma predisposição genética em humanos. Ademais, os dados observados também sugerem que o modelo desenvolvido capaz de recapitular vários sinais artríticos em um modelo animal, o que pode vir a ser essencial na melhor compreensão dos mecanismos da crônicos da chikungunya.

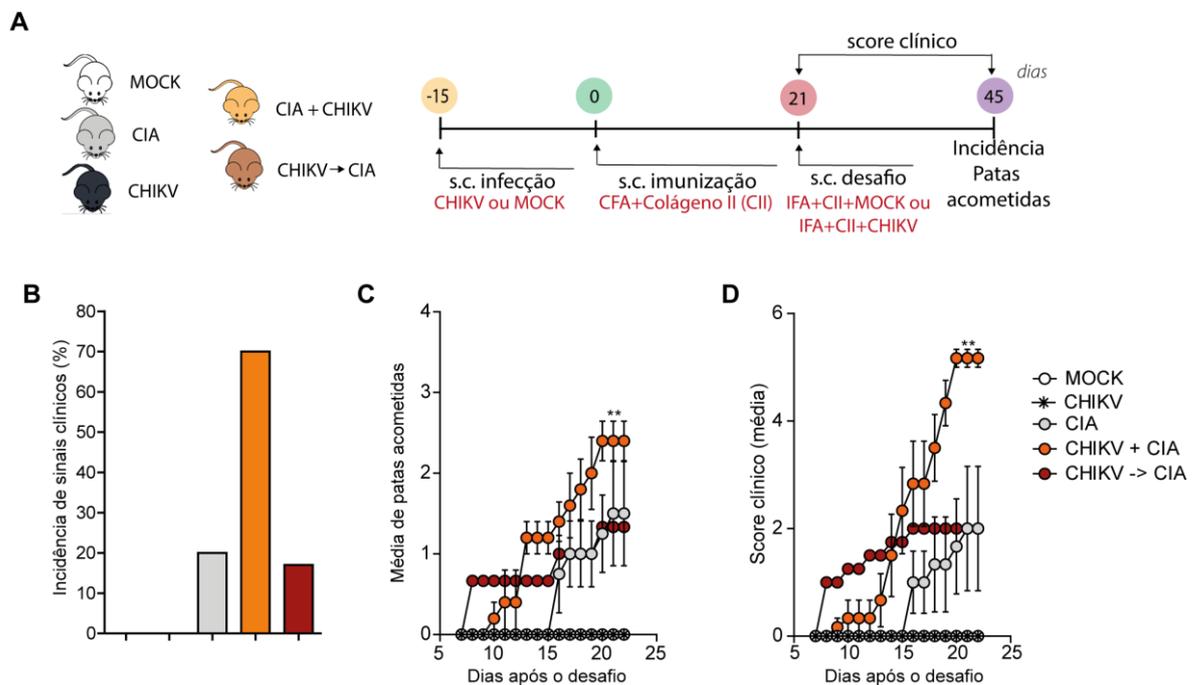


Figura 8. Avaliação da incidência e surgimento dos sinais clínicos artríticos de camundongos DBA1/J durante infecção por CHIKV experimental. Camundongos DBA1/J foram imunizados pelo protocolo CIA, e infectados ou não pelo CHIKV, os sinais clínicos foram acompanhados diariamente por 45 dias conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). A incidência dos sinais clínicos (B), média das patas acometidas (C) e média do score clínico (D) por grupo experimental foram avaliados dias após o desafio. Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $**p < 0,01$. MOCK $n=4$, CHIKV $n=4$, CIA $n=10$, CHIKV \rightarrow CIA $n=7$, CIA+CHIKV $n=10$. Dados representativos de três repetições experimentais.

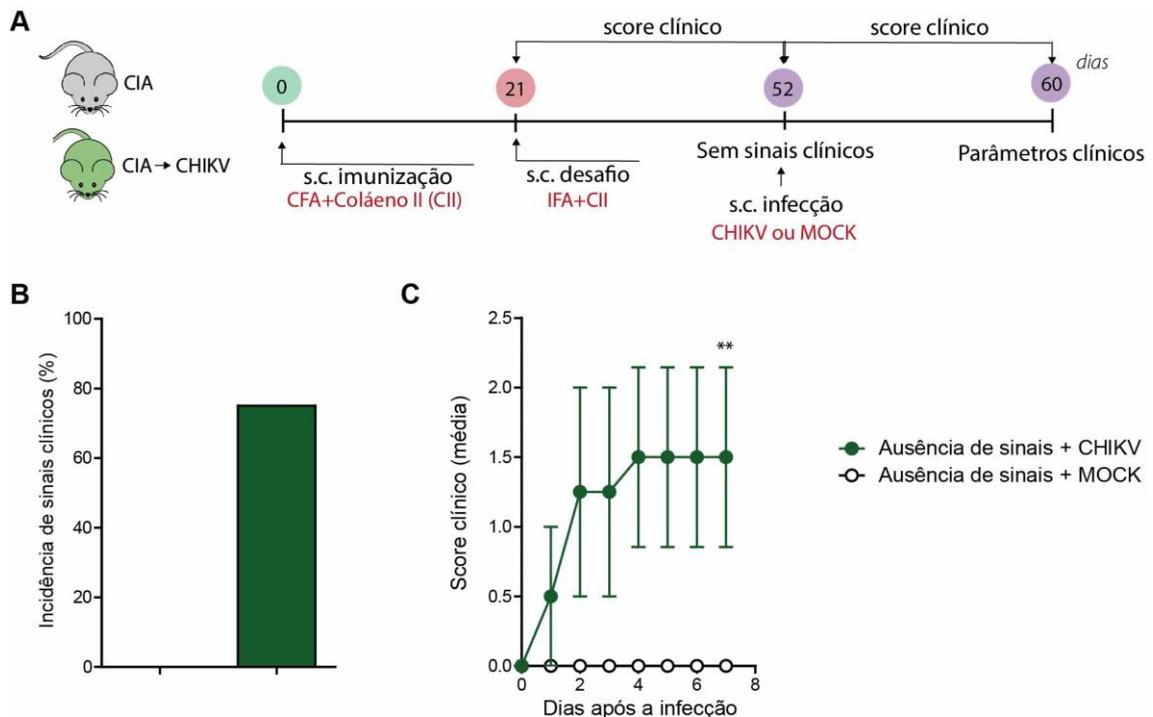


Figura 9. A infecção por CHIKV é capaz de induzir a incidência dos sinais clínicos artríticos de camundongos DBA1/J CIA que não haviam desenvolvido a doença. Camundongos DBA1/J imunizados pelo protocolo CIA, os animais que não desenvolveram sinais clínicos foram infectados ou não com CHIKV e avaliados conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). A incidência dos sinais clínicos (B), e a média do score clínico (C) por grupo experimental foram avaliados dias após infecção. Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $**p < 0,01$. CIA sem sinais + MOCK $n = 4$, CIA sem sinais + CHIKV $n = 4$. Dados representativos de duas repetições experimentais.

5.5 A infecção por ZIKV, grupo experimental CIA+ZIKV, não é capaz de induzir os sinais clínicos observados no modelo CIA+CHIKV

O CHIKV faz parte do grupo de alfavírus que possuem tropismo pelas articulações, desta forma sua infecção em humanos desenvolve sintomatologia dolorosa e sinais clínicos de inflamação nas articulações distais. Contudo, existem outros arbovírus que conhecidamente não tem potencial artritogênicos, como o vírus da zika (ZIKV), um flavivírus que possui um maior tropismo pelo SNC e, conseqüentemente, apresentações clínicas mais relacionadas à encefalite (SCHMALJOHN e MCCLAIN, 1996). Neste contexto, para avaliar se o fenótipo clínico observado no modelo CIA+CHIKV é específico para o vírus CHIKV e seus processos inflamatórios, ou apenas uma resposta a exacerbação da resposta inflamatória geral frente uma infecção viral, utilizamos o ZIKV como um novo controle (**Figura 10A**).

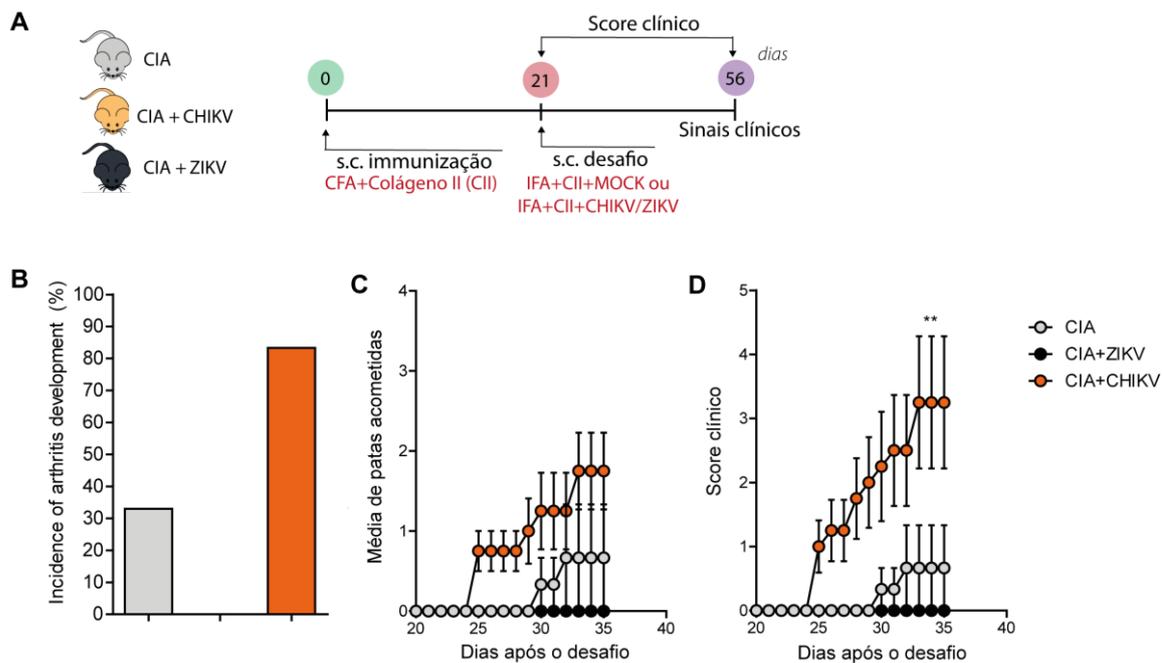


Figura 10. Avaliação da incidência e surgimento dos sinais clínicos artríticos de camundongos DBA1/J entre a infecção por CHIKV ou ZIKV experimental. Camundongos DBA1/J foram imunizados pelo protocolo CIA, e infectados ou não pelo CHIKV e ZIKV após o protocolo de imunização e avaliados clinicamente como demonstrado na ilustração esquemática (A). A incidência dos sinais clínicos (B), média de patas acometidas (C) e a média do score clínico (D) por grupo experimental foram avaliados dias após o desafio. Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. CIA $n=6$, CIA+CHIKV $n=6$, CIA+ZIKV $n=6$. Dados representativos de dois experimentos independentes.

Camundongos do grupo experimental CIA+ZIKV (0%) demonstram um perfil de incidência de sinais clínicos contrário que observamos no CIA+CHIKV (83,3%) (**Figura 10B**). Ademais podemos observar um perfil semelhante aos resultados anteriores tanto no surgimento precoce, quanto no número de patas acometidas no grupo CIA+CHIKV em comparação ao grupo CIA (**Figura 10C e 10D**). Isto é, camundongos imunizados e desafiados com ZIKV não foram capazes de recapitular os sinais clínicos artríticos, como observado no grupo CIA+CHIKV. Sugerindo assim que o fenótipo clínico está correlacionado ao vírus, ou ao seu tipo específico de processo inflamatório.

5.6 O modelo crônico da chikungunya induz uma assinatura gênica inflamatória, associada a uma resposta reguladora ineficiente.

Uma vez que desenvolvemos o modelo crônico de chikungunya (CIA+CHIKV), nosso próximo passo foi investigar a expressão dos genes associados as células

Th17. Utilizamos como base os dados obtidos da cinética desses genes (**Figura 6 e 7**) e na cinética de carga viral (**Figura 5**), e uma vez que o objetivo era avaliar um período mais crônico da infecção optamos por fazer a coleta dos tecidos 15 dpi/dpd para todos os grupos. Com exceção do grupo CHIKV, que seria um grupo equivalente a chikungunya aguda, no qual as amostras foram coletadas 5 dpi (**Figura 11A**).

Nossos resultados da avaliação da região plantar em modelo crônico da chikungunya (CIA+CHIKV) demonstram uma regulação positiva significativa dos genes da IL-6, IL-1 β e TGF- β quando comparado ao grupo CIA (**Figura 11B, E, F**). CIA+CHIKV exibe um aumento significativo da expressão de IL-17 e RORc quando comparado ao MOCK, mas um pouco mais sutil quando comparado ao grupo CIA (**Figura 11C-D**), enquanto o modelo agudo de chikungunya (CHIKV) demonstra aumento significativo da expressão gênica de IL-6, IL-1 β e IL-17 (**Figura 11B, D, E**) em relação ao MOCK.

A manutenção do processo homeostático é essencial, especialmente em processos extremamente inflamatórios. A desregulação desse balanço pode culminar em uma disfunção imune, desencadeando por exemplo a AR (YIN et al., 2015). Sendo assim, para avaliar a participação das vias de regulação e as possíveis alterações nesses perfis de resposta no modelo crônico da chikungunya (CIA+CHIKV), visamos determinar a modulação da expressão gênica das citocinas como IL-10, IL-27 e IL-35 localmente, nas patas acometidas pelos sinais artríticos (**Figura 12A**).

Interessantemente, os dados de RNA demonstram que animais tratados com CIA induzem eficientemente genes associados a resposta reguladora como IL-10, IL27p28, EBI3, FOXP3 e IL12p35 (**Figura 12B-F**), quando comparado aos outros grupos. De maneira semelhante, o grupo experimental CIA+CHIKV apresenta uma expressão aumentada de IL27p28, EBI3, IL12p35 e FOXP3, mas em comparação ao grupo CIA esse aumento é significativamente menor (**Figura 12B-E**). Além disso, não foi possível observar a expressão do gene da IL-10 no CIA+CHIKV, onde essa molécula encontra-se regulada negativamente em comparação ao MOCK (**Figura 12F**). Dessa forma, o compilado de dados sugere que além da exacerbação dos processos inflamatórios pelo aumento da expressão dos genes IL-6, IL-1 β e IL-17 existe uma expressão de genes reguladores como IL-27 e IL-10 diminuída no modelo crônico da chikungunya.

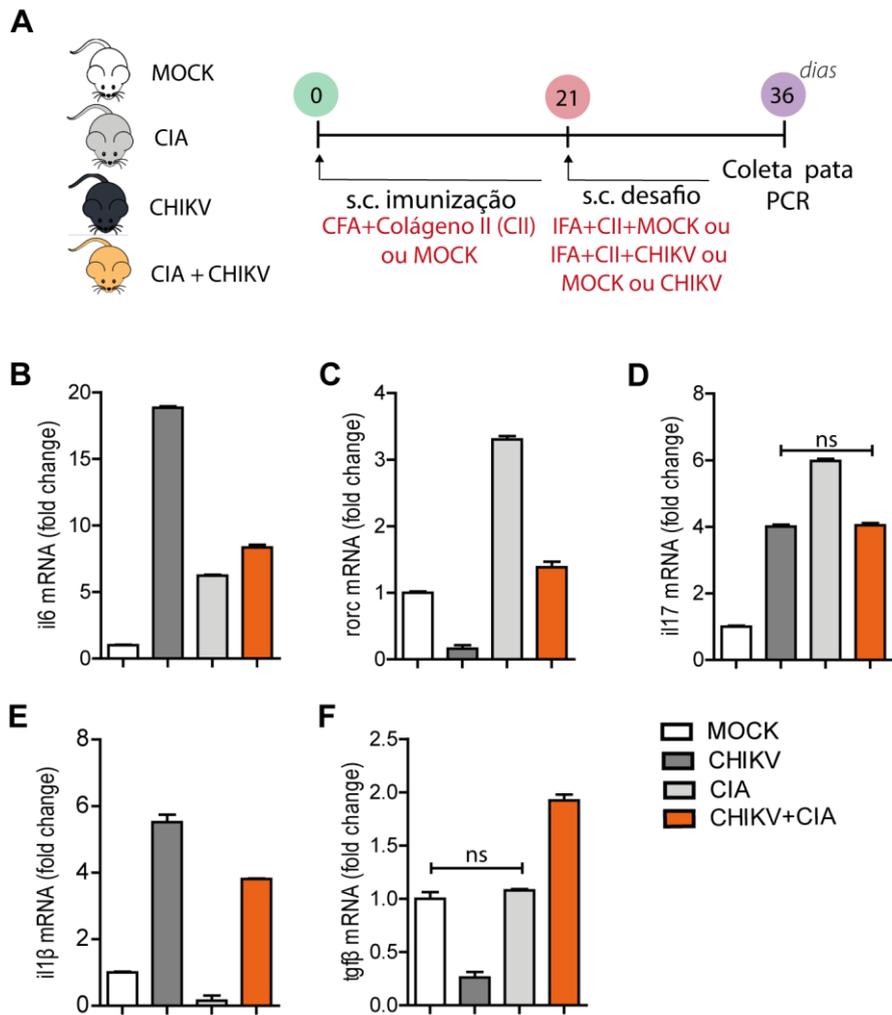


Figura 11. Avaliação dos genes polarizantes para o perfil Th17 no modelo crônico de chikungunya (CIA+CHIKV). Os camundongos foram imunizados e infectados conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). A região ventral das patas foi coletada e avaliada para a expressão gênica da IL-6 (B), RORc (C), IL-17 (D), IL-1 β (E) e TGF β (F). Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos através do *One-way* ANOVA. Todos os grupos possuem dados significantes ($p < 0,001$) entre si, desde que não esteja especificado o contrário (ns = não significante). MOCK n=4; CHIKV n=4; CIA n=4; CIA+CHIKV n=4.

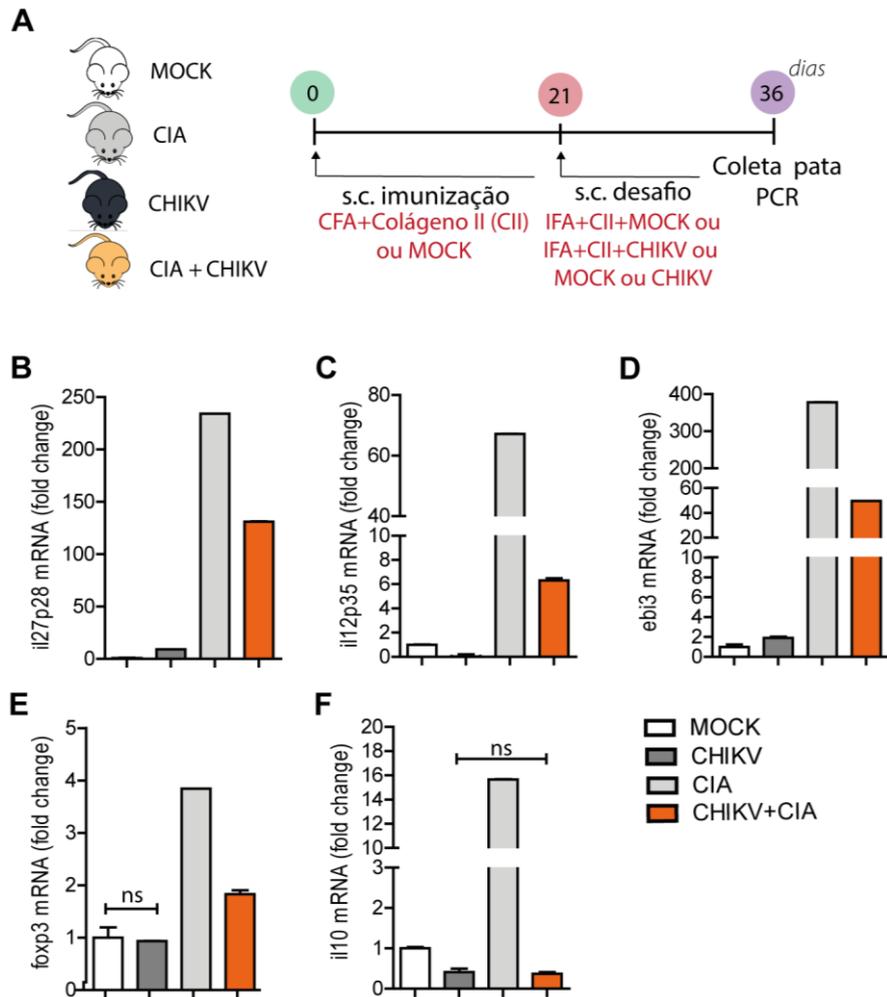


Figura 12. Avaliação dos genes reguladores de resposta de células no modelo crônico de chikungunya (CIA+CHIKV). Os camundongos foram imunizados e infectados conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). A região ventral das patas foi coletada e avaliada para a expressão gênica da IL27p28 (B), IL12p35 (C), EBI3 (D), FOXP3 (E) e IL-10 (F). Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos foi realizado através do *One-way* ANOVA. Todos os grupos possuem dados significantes ($p < 0,001$) entre si, desde que não esteja especificado o contrário (ns = não significante). MOCK n=4; CHIKV n=4; CIA n=4; CIA+CHIKV n=4.

5.7 Camundongos CIA+CHIKV apresentam mais células Th17 nos linfonodos drenantes quando comparado a camundongos CIA

Para melhor compreender o papel das células T, CD4⁺ e CD8⁺, no processo inflamatório associado a fase crônica da chikungunya avaliamos fenotipicamente esses subtipos celulares entre os modelos experimentais (**Figura 13A, 14A**). A análise de células dos linfonodos drenantes por citometria de fluxo demonstrou que não há diferença significativa na frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ entre todos os grupos experimentais (**Figura 14B, 14D e 14H**). No entanto, ao avaliarmos o número absoluto das células T CD4⁺, observamos um aumento significativo dessa população celular nos grupos CHIKV e CIA+CHIKV em comparação aos MOCK e CIA (**Figura 14C**). As células T CD8⁺ tiveram uma tendência semelhante, no entanto, não de forma significativa (**Figura 14E**). Ainda, avaliando observamos uma diminuição significativa na frequência das Tregs nos grupos CIA e CIA+CHIKV em comparação aos grupos MOCK e CHIKV (**Figura 14F, 14G e 14I**).

Por conseguinte, analisamos as subpopulações de células T CD4⁺ produtoras de IL-17 (**Figura 15A**). As células Th17 estão significativamente aumentadas nos dois modelos experimentais CHIKV e CIA+CHIKV, tanto em frequência (**Figura 15B e 15F**) quanto em número absoluto (**Figura 15C**), quando comparado com os grupos MOCK e CIA. Os dados de Th1 demonstram que os modelos associados ao CIA (CIA e CIA+CHIKV) possuem uma regulação negativa desse subtipo celular em frequência (**Figura 15D**), e em número absoluto (**Figura 15E**).

Considerando as subpopulações de células T CD8⁺ (**Figura 16A**) observamos as células Tc17 estão reguladas negativamente nos grupos CIA e CIA+CHIKV em frequência (**Figura 16B e 16F**). Ao analisarmos o número absoluto podemos observar uma pequena produção de IL-17 pela CD8⁺ em CIA+CHIKV (**Figura 16C**). De toda forma, apenas o modelo agudo da infecção (CHIKV) demonstra um aumento das células Tc17 em frequência e número absoluto (**Figura 16B-C**). As células CD8⁺ produtoras de INF γ estão significativamente aumentadas nos dois modelos experimentais CHIKV e CIA+CHIKV, tanto em frequência (**Figura 16D e 16G**) quanto em número absoluto (**Figura 16E**), quando comparado com os grupos MOCK e CIA.

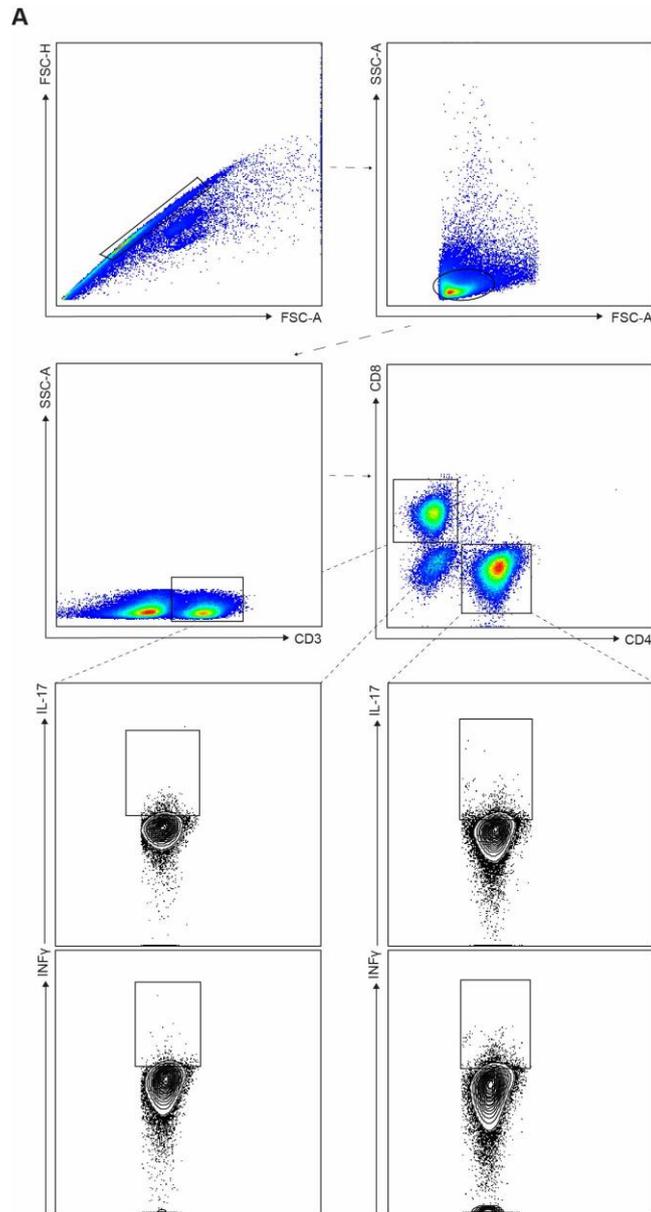


Figura 13. Estratégia de análise de células dos dLNs dos modelos animais experimentais. (A) Estratégia de *gates* utilizada para análise de células CD4⁺ e CD8⁺ de linfonodos poplíteo e axilar obtidas através de citometria de fluxo.

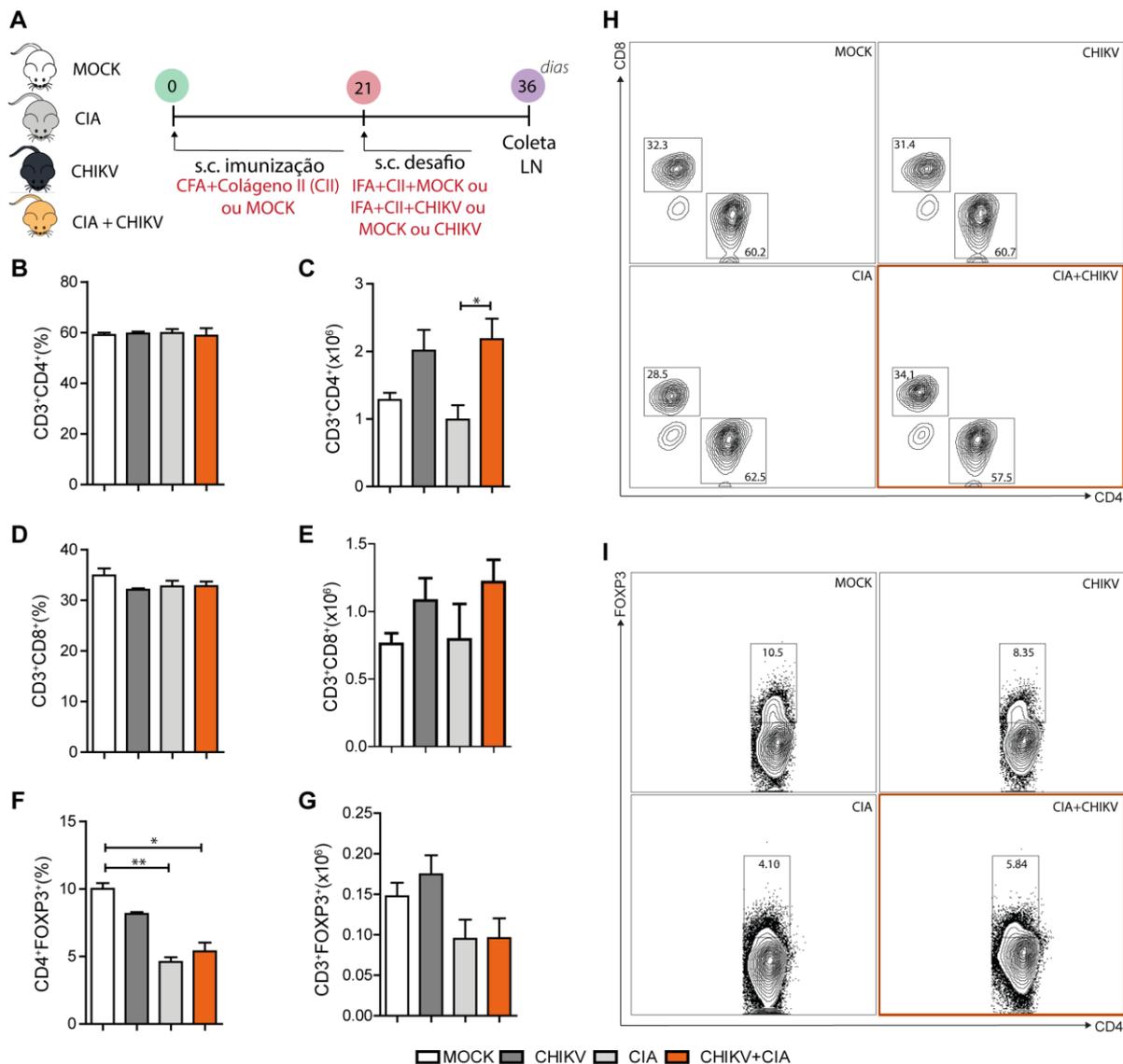


Figura 14. Avaliação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em um modelo crônico da infecção por CHIKV (CIA+CHIKV). Células do dLN foram coletadas dos diferentes grupos experimentais conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). As células foram avaliadas por citometria de fluxo por frequência e número absoluto, respectivamente, de células CD4⁺ (B-C), CD8⁺ (D-E), CD4⁺FOXP3⁺ (F-G). *Plots* demonstrativos das análises das subpopulações de células T (I-J). Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $*p < 0,05$, $**p < 0,01$. MOCK n=4, CHIKV n=4, CIA n=10, CIA+CHIKV n=10. Dados demonstrativos de três experimentos independentes.

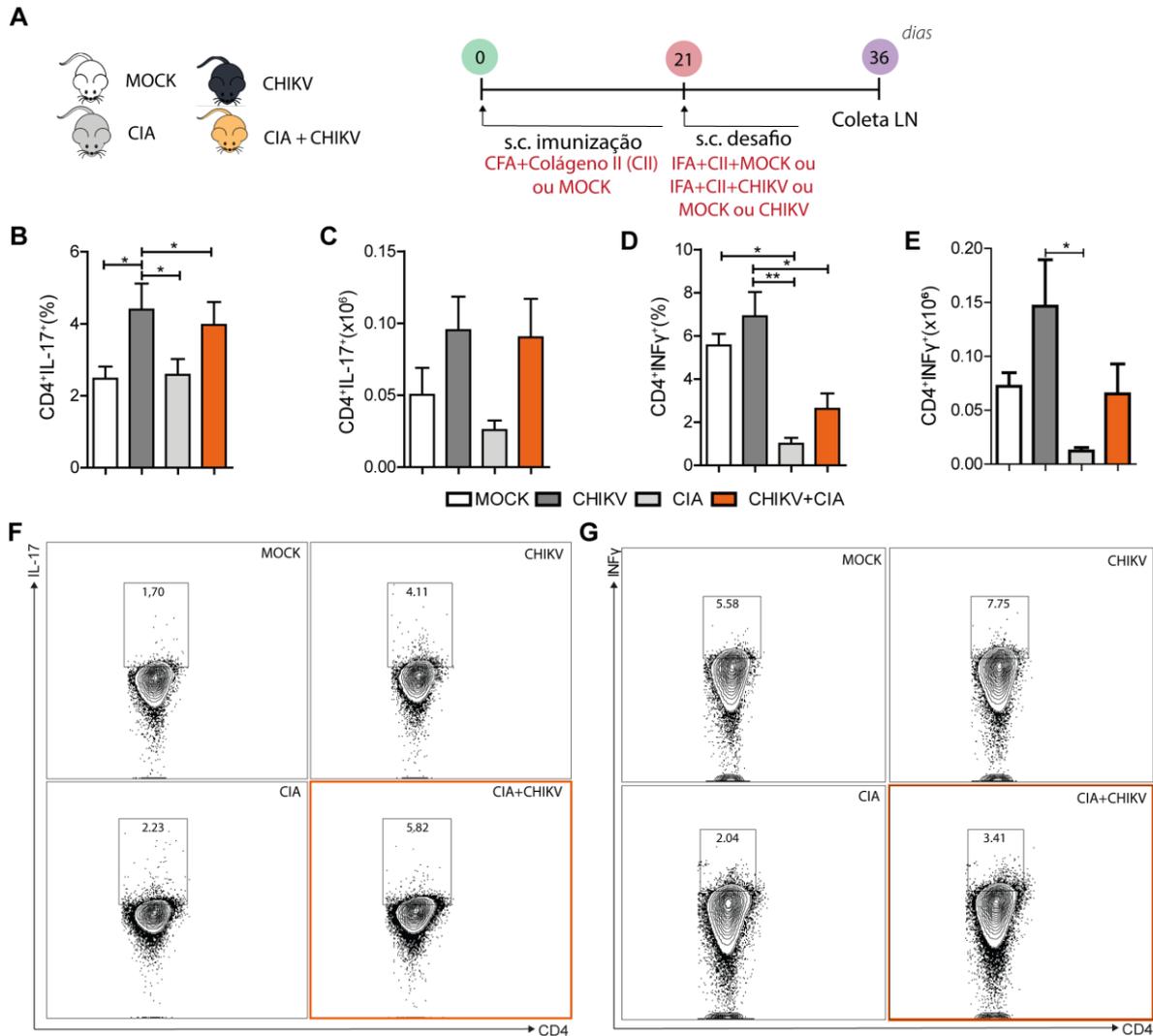


Figura 15. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD4+IL-17+ e T CD4+INF-γ+ em um modelo crônico da infecção por CHIKV (CIA+CHIKV). Células do dLN foram coletadas dos diferentes grupos experimentais conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). As células foram avaliadas por citometria de fluxo para frequência (B) e número absoluto (C) de células CD4⁺IL-17⁺. Também foram avaliadas para frequência (D) e número absoluto (E) de células CD4⁺INF-γ⁺. Plots demonstrativos das análises das subpopulações de células T nos 4 grupos experimentais (F-G). Os dados foram expressos como médias ± SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. MOCK n=4, CHIKV n=4, CIA n=10, CIA+CHIKV n=10. Dados demonstrativos de três experimentos independentes.

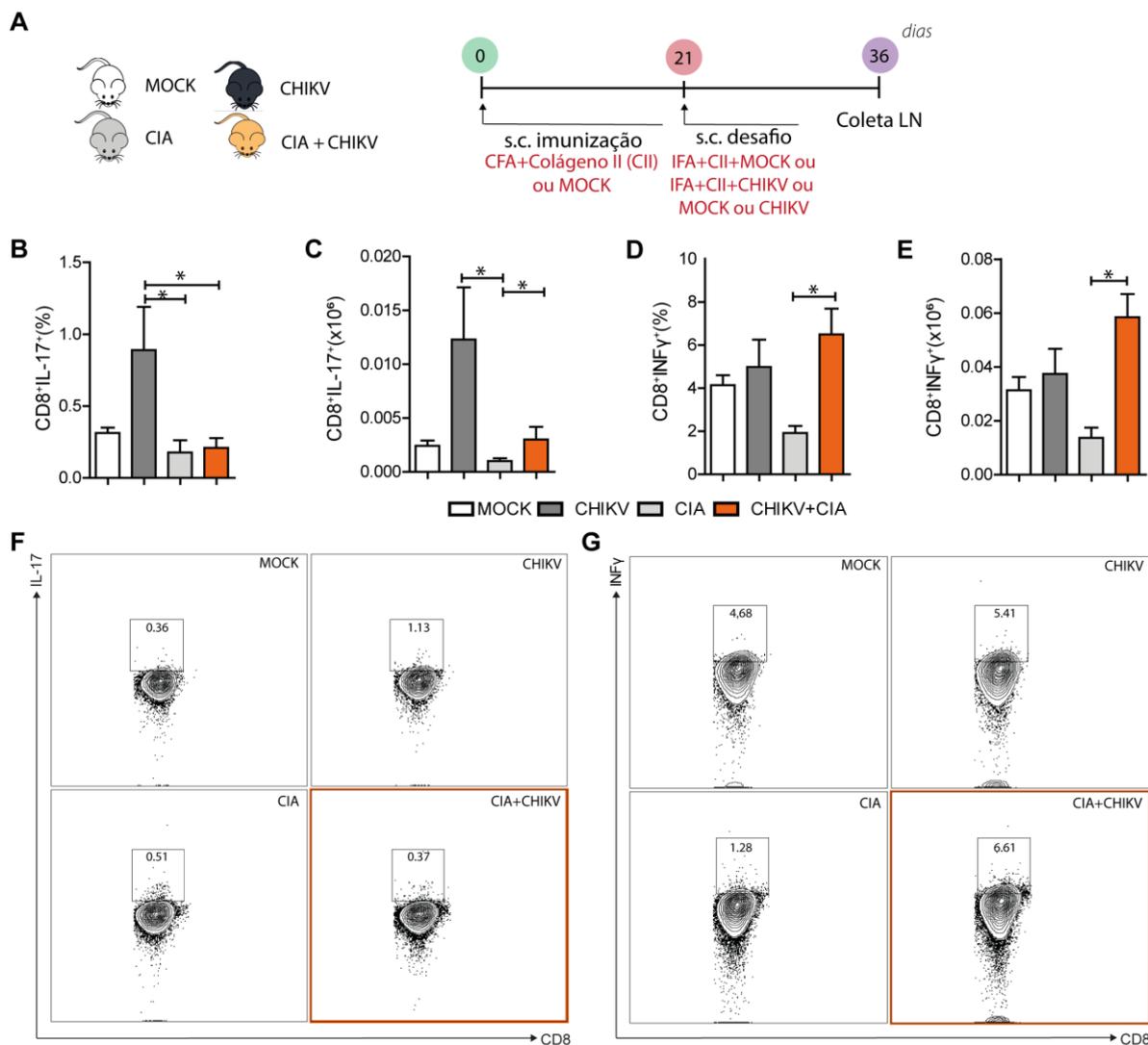


Figura 16. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD8+IL-17+ e T CD8+INF-γ+ no modelo crônico da infecção por CHIKV (CIA+CHIKV). Células do dLN foram coletadas dos diferentes grupos experimentais conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). As células foram avaliadas por citometria de fluxo para frequência (B) e número absoluto (C) de células CD8⁺IL-17⁺. Também foram avaliadas para frequência (D) e número absoluto (E) de células CD8⁺INF-γ⁺. *Plots* demonstrativos das análises das subpopulações de células T nos 4 grupos experimentais (F-G). Os dados foram expressos como médias ± SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com **p* < 0,05. Total de 3 repetições do experimento. MOCK n=4, CHIKV n=4, CIA n=10, CIA+CHIKV n=10. Dados demonstrativos de três experimentos independentes.

5.8 Células CD4⁺, especificamente células Th17, correlacionam-se com a maior gravidade dos sinais clínicos em camundongos CIA+CHIKV

Os resultados anteriores sugerem que as células T CD4⁺, Th17, T CD8⁺, Tc1 estão envolvidas na patogénia do modelo crónico de chikungunya (CIA+CHIKV). Por isso, em seguida os níveis desses subtipos celulares no modelo CIA+CHIKV foram examinados a fim de correlacioná-los com a gravidade da doença. Os camundongos foram agrupados em três grupo de acordo com a gravidade da doença (média do score clínico) e quanto maior a média, maior a gravidade da doença (**Figura 17A**). De forma interessante, constatamos que as populações CD4⁺ (**Figura 17B**), CD8⁺ (**Figura 17E**) e CD4⁺IL-17⁺ (**Figura 17C**) correlacionam-se positivamente com uma maior média de score clínico. As subpopulações Tc1 (**Figura 17G**) pouco se correlaciona com uma maior média de score clínico apresentando um valor de $r=0,5270$. As células Th1 (**Figura 17D**) e Tc17 (**Figura 17F**) não se correlacionam com a sinais artríticos clínicos. Isto é, as células T CD4⁺, T CD8⁺ e Th17 estão associadas a maior gravidade clínica da doença.

5.9 A transferência de células CD4⁺ recapitula o fenótipo observado com a infecção por CHIKV

Por fim, para confirmar o envolvimento das células T CD4⁺ realizamos uma transferência de células por via plexo retro-orbital. Camundongos DBA1/J doadores foram imunizados pelo protocolo CIA, e infectados (CIA+CHIKV) ou não (CIA) pelo CHIKV. Dos camundongos que desenvolveram sinais clínicos coletou-se os linfonodos drenantes para obtenção das células por kit de Beads CD4⁺. Camundongos DBA1/J receptores foram imunizados (CIA) pelo protocolo CIA, os que não desenvolveram os sinais artríticos clínicos receberam a transferência de células, ou o grupo controle que recebeu PBS 1x. De forma a elucidar especificamente o papel das células Th17 nessa patogénia, dois grupos de camundongos receptores foram tratados com o bloqueador da IL-17 (**Figura 18A**).

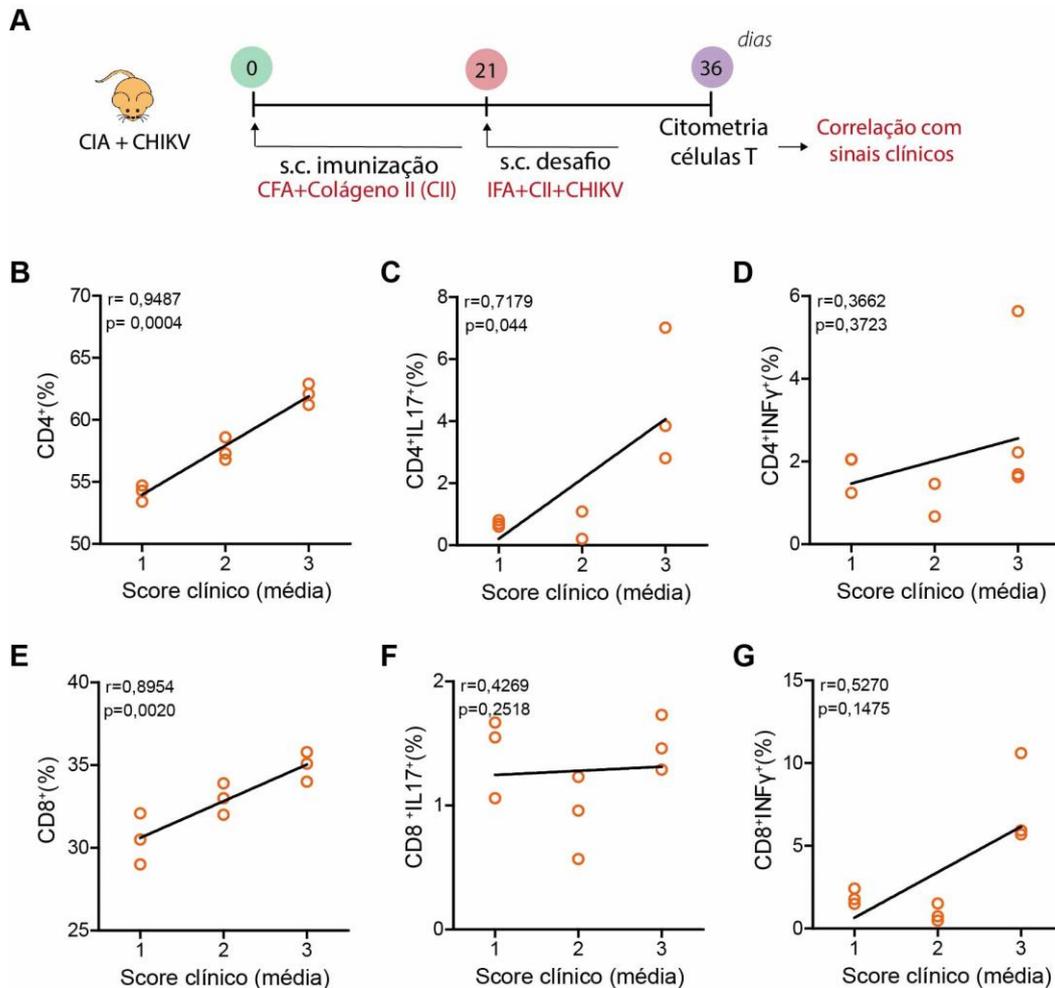


Figura 17. Correlação das células Th17 com à gravidade dos sinais clínicos no modelo animal. Camundongos CIA+CHIKV foram agrupados em grupos de gravidade da doença, sendo a média SC3 considerada a mais grave, esses dados artríticos foram correlacionados com os dados da citometria, como demonstrado na ilustração esquemática (A). Os subtipos celulares CD4⁺ (B), CD4⁺IL-17⁺ (C), CD4⁺INF-γ⁺ (D), CD8⁺ (E), CD8⁺IL-17⁺ (F), CD8⁺ INF-γ⁺ (G) foram correlacionados com as médias dos scores clínicos SC1 (leve), SC2 (moderado) ou SC3 (grave). As análises foram realizadas através do teste estatístico de Spearman. Cada ponto é representativo de um animal e os valores de 'r' e 'p' estão especificados nos gráficos. Grupos: SC1 n = 3; SC2 n = 3; SC3 n = 3. Dados representativos de três experimentos independentes.

Os resultados demonstram que camundongos *naive* que receberam as células CIA ou células CIA+CHIKV não desenvolveram sinais clínicos. O controle negativo CIA que recebeu PBS 1x não desenvolveram os sinais clínicos. Camundongos previamente imunizados com o CIA que receberam células CD4⁺ CIA obtiveram uma porcentagem de 50% de incidência dos sinais artríticos, enquanto os que receberam as células CD4⁺ CIA+CHIKV observamos 87,5% da incidência clínica (**Figura 18B**). Podemos observar, semelhante aos dados anteriores, um surgimento precoce (15 dias após a transferência) dos sinais clínicos da doença no grupo que recebeu as

células CD4⁺ CIA+CHIKV, em comparação aos camundongos receptores de células CD4⁺ CIA (18 dias após a transferência) (**Figura 18C**). Tais resultados confirmam o envolvimento das células CD4⁺ no nosso modelo animal crônico de chikungunya.

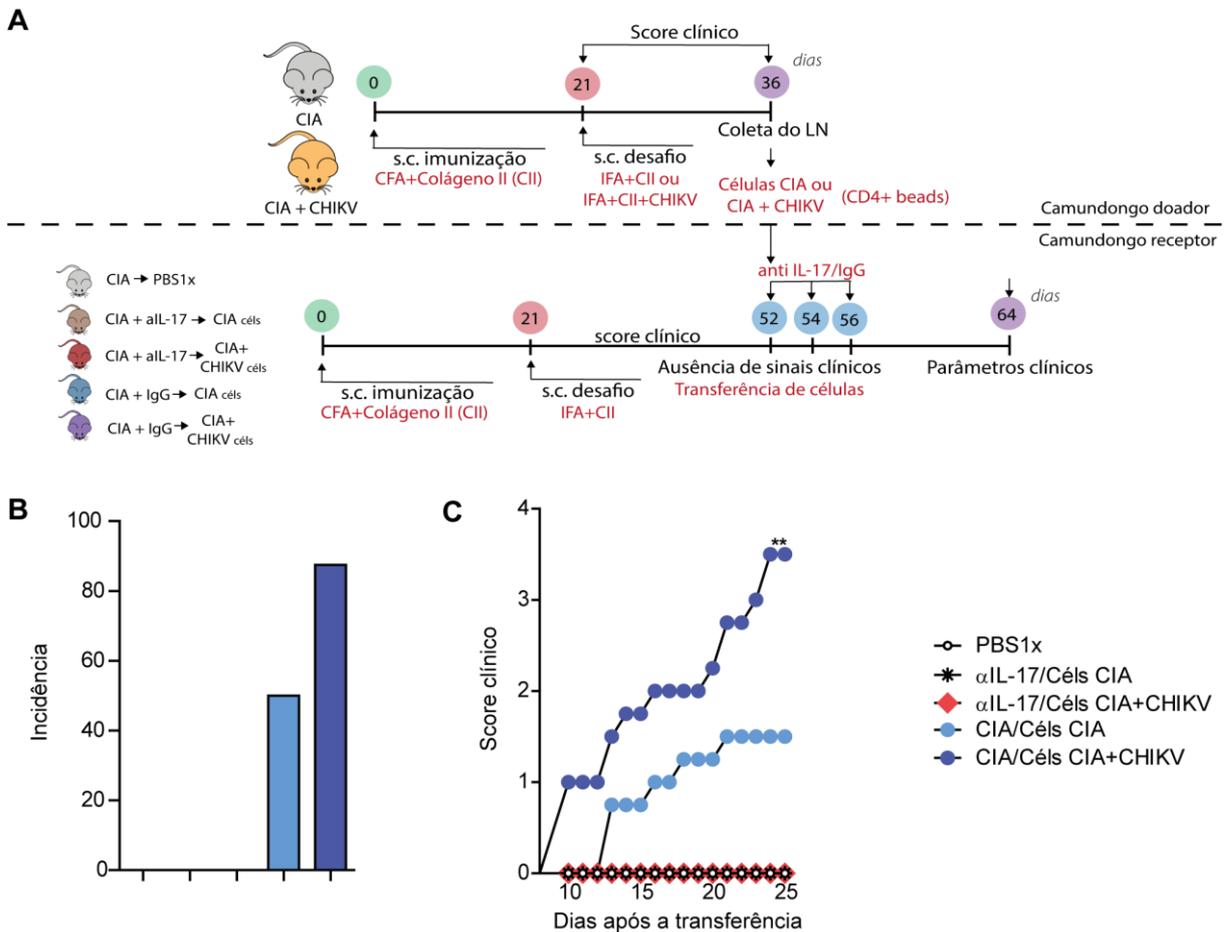


Figura 18. Bloqueio a IL-17 durante a transferência de células de camundongos CIA+CHIKV reverte o fenótipo da transferência de células T CD4⁺. Camundongos DBA1/J doadores foram imunizados pelo protocolo CIA, e infectados (CIA+CHIKV) ou não (CIA). Foram coletados os linfonodos drenantes dos camundongos que desenvolveram sinais clínicos e obtidas células T CD4⁺ para a transferência. Camundongos DBA1/J receptores foram imunizados (CIA) ou não (*Naive*) pelo protocolo CIA. Os camundongos que não desenvolveram os sinais artríticos clínicos foram utilizados para receberem a transferência de células, uma parte dos camundongos receptores foram tratados com anticorpo para bloquear a citocina IL-17, conforme demonstrado na ilustração gráfica (A). Os grupos experimentais foram avaliados por porcentagem de incidência dos sinais clínicos (B) e média do score clínico (C). Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $**p < 0,01$. Doador: CIA n=6; CIA+CHIKV n=6. Receptor: CIA + PBS1x n=4; CIA + α IL-17 + células CIA n=5; CIA + α IL-17 + células [CIA+CHIKV] n=5; CIA + células CIA n=8; CIA + células [CIA+CHIKV] n=8. Dados representativos de dois experimentos independentes.

5.10 Os dados de paciente crônicos corroboram o fenótipo observado no nosso modelo crônico da chikungunya

Recentemente demonstrou-se que células T CD8⁺ têm um papel na forte ativação na resposta inicial à infecção por CHIKV em humanos (WAUQUIER et al., 2011). Por outro lado, a resposta T CD4⁺ predomina em estágios mais tardios da doença (WAUQUIER et al., 2011), provavelmente contribuindo para a imunopatologia da CHIKV (NAKAYA et al., 2012; TEO et al., 2013). Com o objetivo de validar os achados observados no modelo animal em humanos, nós examinamos a expressão de vários genes relacionados as vias de sinalização de Th1 e Th17, além das vias reguladoras da resposta efetora, em amostras de PBMC de pacientes com sintomatologia da artrite crônica da chikungunya (n=3) e de controles pareados (n=3).

Em humanos a artralgia da infecção é observada em 87-96% dos casos agudos de chikungunya (THIBERVILLE et al., 2013). Alguns estudos associam a progressão da artrite crônica da chikungunya com a manutenção viral em macrófagos sinoviais humanos (HOARAU et al., 2013). Nesse sentido, além de avaliarmos a expressão gênica das vias inflamatórias e reguladoras nos PBMC de paciente com doença crônica da chikungunya ativa, avaliamos a capacidade de uma nova incubação com CHIKV modular a expressão desses genes nas células. Para isso, PBMCs de indivíduos saudáveis (HC) e de pacientes (PT) crônicos foram infectados *in vitro* com CHIKV (HC+CHIKV e PT+CHIKV) durante 24 horas e a expressão do RNA avaliado por PCR em tempo real (**Figura 19A**) além da fenotipagem *ex vivo* das populações de células T por citometria de fluxo (**Figura 20-23**).

A expressão gênica do PBMC em cultura revelou que a expressão de todos os genes avaliados foi regulada positivamente nas células HC+CHIKV quando comparadas com as células controles HC (**Figura 19B-S**). Avaliando o IL-1 β , TNF- α , TGF- β (**Figura 19B-D**) e stat4 (**Figura 19H**) observamos um aumento significativo dessas expressões gênicas em PT comparando com HC. Contudo, essas expressões são reguladas negativamente quando comparamos as células de PT com as células de PT+CHIKV (**Figura 19B-D**).

A expressão de IL-23, tanto em PT quanto em PT+CHIKV, está aumentada de forma semelhante quando comparados com as amostras HC (**Figura 19F**). Enquanto a expressão de IL-6 (**Figura 19E**), Stat3, RORc e IL-17(**Figura 19K-M**), além de estarem expressas em níveis mais altos nas amostras PT comparado a HC, é

regulada positivamente em PT+CHIKV quando comparamos com as amostras de PT. Isto é, estes genes em pacientes crônicos que se reencontram com o vírus são super expressos. Dessa forma, podem estar associados diretamente a patologia da chikungunya crônica. A expressão de Tbet (**Figura 19I**) demonstra um perfil semelhante, no entanto, essa característica não parece ser dependente de Stat1 (**Figura 19G**), Stat4 (**Figura 19H**) e INF γ (**Figura 19J**), pois a expressão desses genes em PT+CHIKV não se alteram em comparação as amostras de pacientes crônicos (PT).

Em seguida, verificamos a expressão de genes reguladores nas amostras de humanos. Quanto a expressão de IL-27 e IL-35 (IL12p35) não observamos diferenças significativas entre os grupos HC e PT. No entanto, observamos que as células de pacientes saudáveis que nunca tiveram contato com o vírus anteriormente (HC) ao serem infectadas com CHIKV (HC+CHIKV) conseguem regular positivamente a expressão desses genes reguladores, de forma significativa (**Figura 19N-O**). Enquanto as amostras de PT+CHIKV não demonstram diferença de expressão.

Ademais a expressão de FOXP3 está aumentada de forma semelhante, tanto em PT quanto em PT+CHIKV, quando comparados com as amostras HC (**Figura 19Q**). Enquanto a IL-10 (**Figura 19R**) apesar de ser expressa em níveis mais altos nas amostras PT ao compararmos com HC, está regulada negativamente em PT+CHIKV quando comparamos com as amostras de PT. Portanto, podem estar associados diretamente a patologia da chikungunya crônica, uma vez que podem demonstrar uma capacidade reguladora debilitada de células de pacientes crônicos frente à um relapso viral. A fim de corroborar os resultados obtidos em modelo animal crônico, também utilizamos as células do PBMC de humanos para analisar por citometria de fluxo as células T, CD4+ e CD8+, e seus subtipos em pacientes com a artrite crônica da chikungunya (**Figura 20A**). A estratégia de análise de células do PBMC ocorreu conforme demonstrado na imagem (**Figura 21A**).

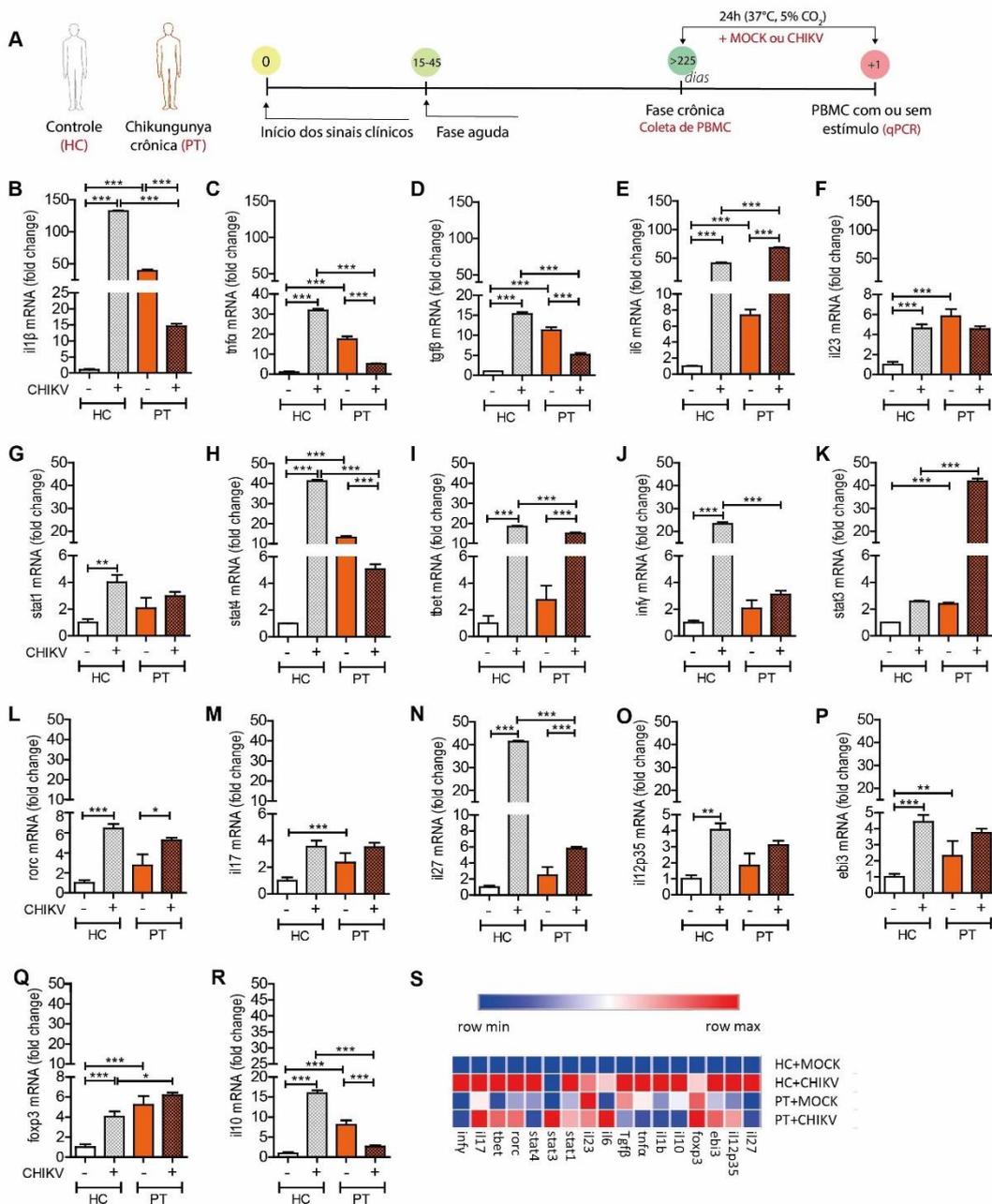


Figura 19. Avaliação das dos genes inflamatórios e reguladores em humanos com artrite crônica da chikungunya. As células do PBMC dos controles (HC) e dos pacientes (PT) foram colocadas em cultura na presença do CHIKV por 24horas, conforme demonstrado na ilustração esquemática. Os diferentes genes foram então avaliados por qPCR: IL-1 β (B), TNF α (C), TGF β (D), IL-6 (E), IL-23 (F), Stat1 (G), Stat4 (H), Tbet (I), INF- γ (J), Stat3 (K), RORc (L), IL-17 (M), IL-27 (N), IL12p35 (O), EBI3 (P), FOXP3 (Q), IL-10 (R). Os resultados por qPCR também foram avaliados através do *clustering* da ferramenta Morpheus para a comparação entre os grupos (S). Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. HC + MOCK n=3; HC + CHIKV n=3; PT + MOCK n=3; PT + CHIKV n=3.

Os dados de humanos demonstram que não há diferença significativa na frequência e número absoluto de células T CD4⁺ entre controles e paciente crônicos da chikungunya (CHIKV⁺) (**Figura 20B-D**). Também avaliamos a produção de IL-17 e INF- γ pelas células T CD4⁺. Podemos observar um aumento significativo na produção de IL-17 e INF- γ dos pacientes crônico, tanto em frequência quanto em número absoluto, ao compararmos com os controles (**Figura 20E-J**). As células T CD8⁺ demonstraram uma redução significativa em frequência (**Figura 22A-B**), mas não em número absoluto (**Figura 22C**) em relação ao grupo controle. Contudo, a produção de IL-17 e INF- γ por células T CD8⁺ aumentaram significativamente apenas em frequência (**Figura 22D-E, 22G-H**), o número absoluto demonstra a mesma tendência, mas não de forma significante (**Figura 22F e 22I**).

As análises de citometria também incluíram a avaliação de células T reguladoras e citocinas potencialmente reguladoras, tais como, IL-10 e TGF- β . A níveis de proteínas não existem diferenças significativas das células CD4⁺FOXP3⁺ (**Figura 23A-C**), e nem na produção de IL-10 (**Figura 23D-F**) e TGF- β (**Figura 23G-I**). Contudo, pacientes crônicos apresentam uma tendência de diminuição da produção de IL-10 quando comparada a células de voluntários saudáveis.

De forma geral, estes resultados indicam similaridades nos achados obtidos em modelo animal, uma vez que os dados em humanos sugerem que células T CD4⁺ estão envolvidas na patogénia da artrite crônica da chikungunya, através das vias de ativação e da produção de citocinas inflamatórias, tais como, stat3, IL-6 e IL-17. Ademais os dados de expressão gênica também sugerem que pacientes crônicos frente a uma nova interação com o vírus tem uma menor capacidade reguladora, através da menor expressão de IL-10 e IL-27.

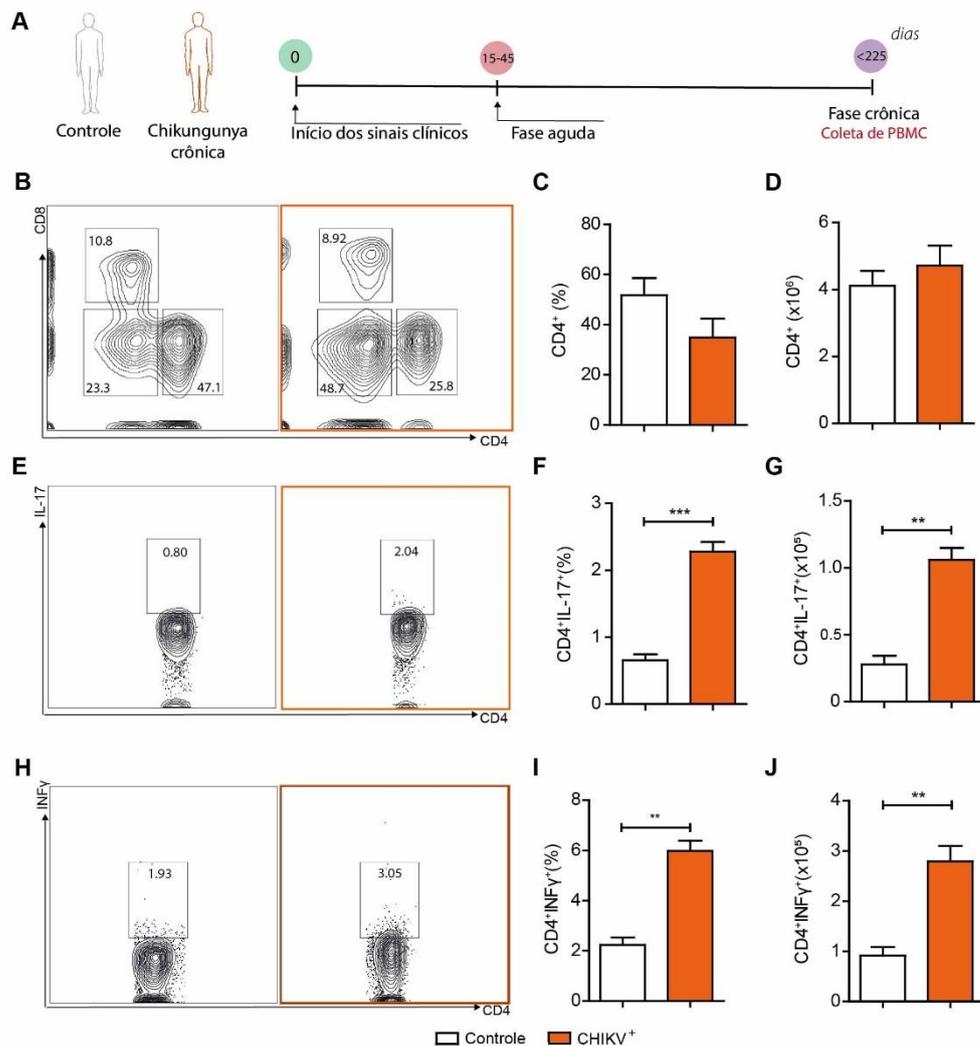


Figura 20. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD4+IL-17+ e T CD4+INF- γ + em humanos com artrite crônica da chikungunya. As células do PBMC foram coletadas de pacientes e indivíduos controles como demonstrado na ilustração esquemática (A). Através da análise por citometria de fluxo obteve-se o *dot plot* representativo da expressão de CD4 e CD8 (B), frequência (C) e número absoluto (D) de células CD4⁺. Também se obteve o *dot plot* representativo da produção de IL-17 (E), frequência (F) e número absoluto (G) de células CD4⁺IL-17⁺. Ademais, o *dot plot* representativo da expressão de INF γ (H), frequência (I) e número absoluto (J) de células CD4⁺INF- γ ⁺. Os dados foram expressos como médias \pm SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Controle n=3, Paciente crônica (CHIKV⁺) n=3.

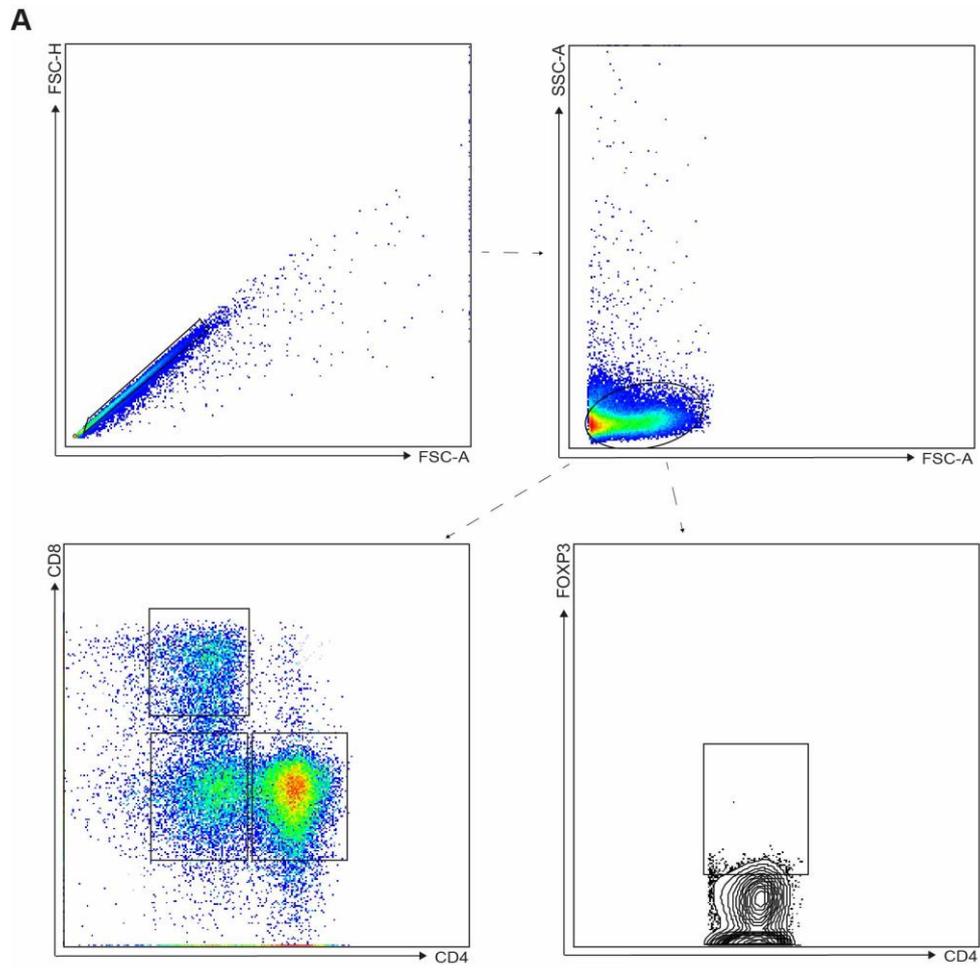


Figura 21. Estratégia de análise de PBMC de humanos. (A) Estratégia de *gates* utilizada para análise de células CD4⁺ e CD8⁺ de células de PBMC humanos por citometria de fluxo.

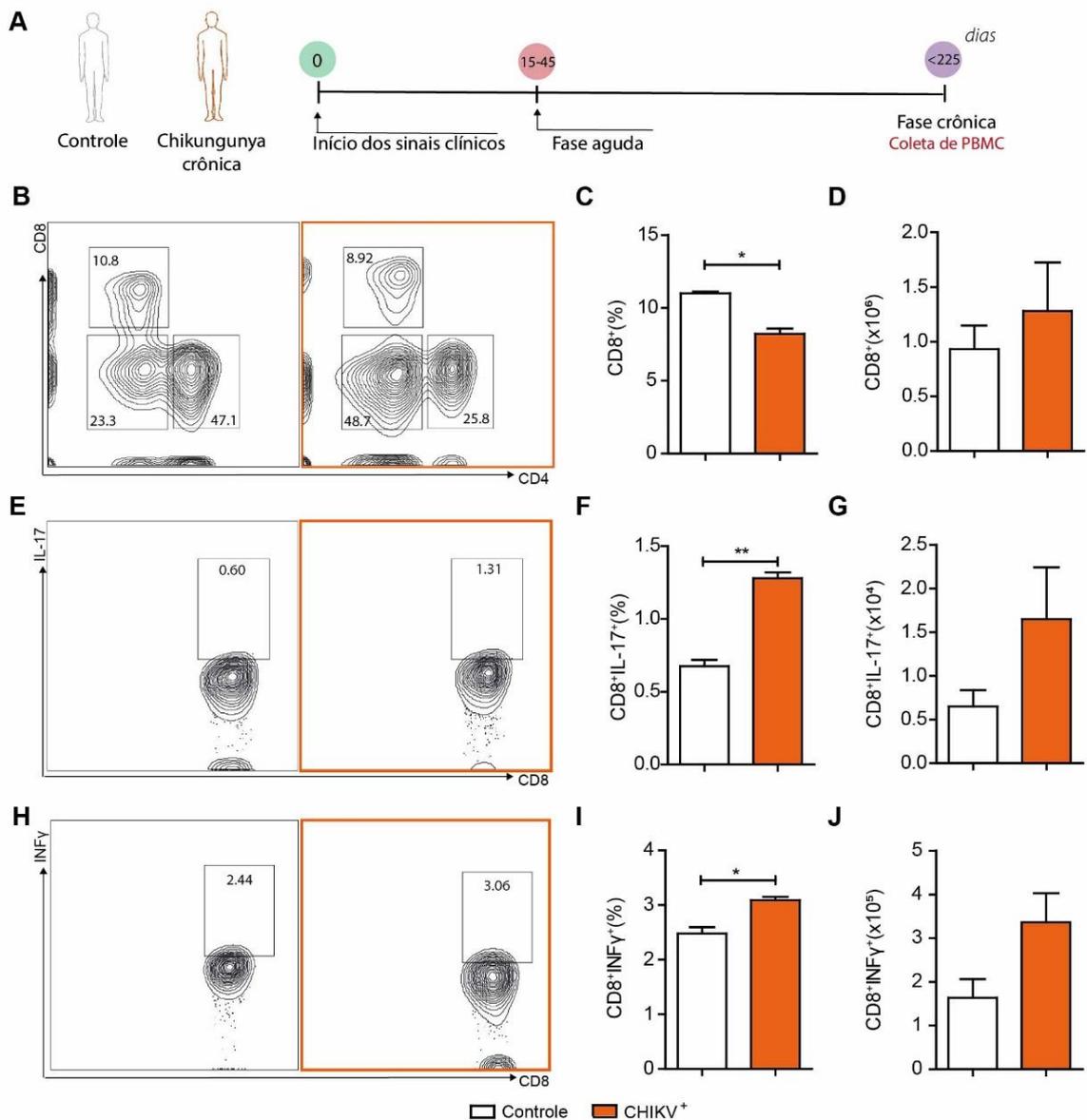


Figura 21. Avaliação por citometria de fluxo de células T CD8+IL-17+ e T CD8+INF-γ+ em humanos com artrite crônica da chikungunya. As células do PBMC foram coletadas de pacientes e indivíduos controles como demonstrado na ilustração esquemática (A). Através da análise por citometria de fluxo obteve-se o *dot plot* representativo da expressão de CD4 e CD8 (B), frequência (C) e número absoluto (D) de células CD8⁺. Também se obteve o *dot plot* representativo da produção de IL-17 (E), frequência (F) e número absoluto (G) de células CD8⁺IL-17⁺. Ademais, o *dot plot* representativo da produção de INFγ (H), frequência (I) e número absoluto (J) de células CD8⁺INF-γ⁺. Os dados foram expressos como médias ± SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com ***p* < 0,01, ****p* < 0,001. Controle n=3, Paciente crônico (CHIKV⁺) n=3.

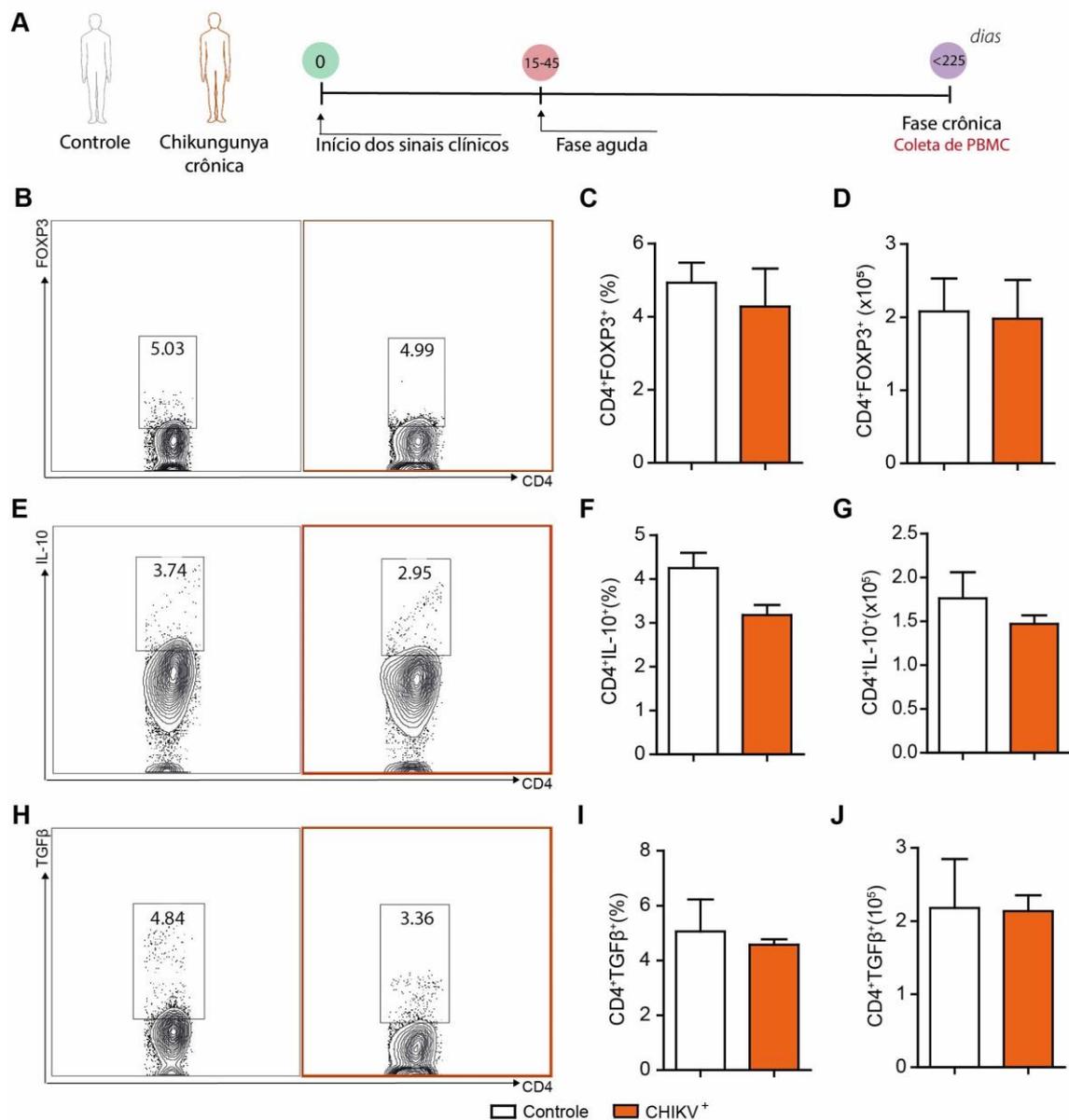


Figura 22. Avaliação por citometria de fluxo de células CD4⁺FOXP3⁺, T CD4⁺IL-10⁺ e T CD4⁺TGF-β⁺ em humanos com artrite crônica da chikungunya. As células do PBMC foram coletadas de pacientes e indivíduos controles como demonstrado na ilustração esquemática (A). Através da análise por citometria de fluxo obteve-se o *dot plot* representativo da expressão de FOXP3 (B), frequência (C) e número absoluto (D) de células CD4⁺FOXP3⁺. Também se obteve o *dot plot* representativo da produção de IL-10 (E), frequência (F) e número absoluto (G) de células CD4⁺IL-10⁺. Ademais, o *dot plot* representativo da produção de TGF-β (H), frequência (I) e número absoluto (J) de células CD4⁺ TGF-β⁺. Os dados foram expressos como médias ± SEM. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com ***p* < 0,01, ****p* < 0,001. Controle n=3, Paciente crônico (CHIKV⁺) n=3.

PARTE 2 – Papel da persistência viral na resposta imune na artrite crônica induzida pelo CHIKV

5.11 As células T humanas primárias não são permissíveis a infecção por alfavírus artritogênicos

Um questionamento da nossa hipótese é se a infecção persistente é responsável pelos sintomas reumáticos crônicos da chikungunya. Devido à observação que as células T estão envolvidas no processo patogênico associado à artrite crônica da chikungunya, investigamos inicialmente se alfavírus artritogênicos (RRV e CHIKV) são capazes de infectar células T humanas. Para isso, células T primárias foram isoladas do PBMC de doadores saudáveis, e incubados com o vírus em diferentes MOI por 48 horas (**Figura 24A**).

Para o CHIKV, testamos os MOI 1, 5 e 20, e para o RRV os MOI de 2, 10 e 50. Observamos, por citometria de fluxo, que ambos os vírus (RRV e CHIKV) não internalizaram o envelope viral nem mesmo no maior MOI avaliado, respectivamente, 50 e 20 (**Figura 24B**). Para confirmar o nosso dado que os vírus artritogênicos não eram capazes de infectar células T primárias, realizamos uma imunofluorescência para avaliar a internalização viral da proteína E2. Corroborando os dados anteriores, nenhum dos vírus demonstrou a marcação da proteína E2 de alfavírus no citoplasma das células T (**Figura 24C**). Deste modo, demonstramos que as células T não são permissíveis à infecção por alfavírus artritogênicos.

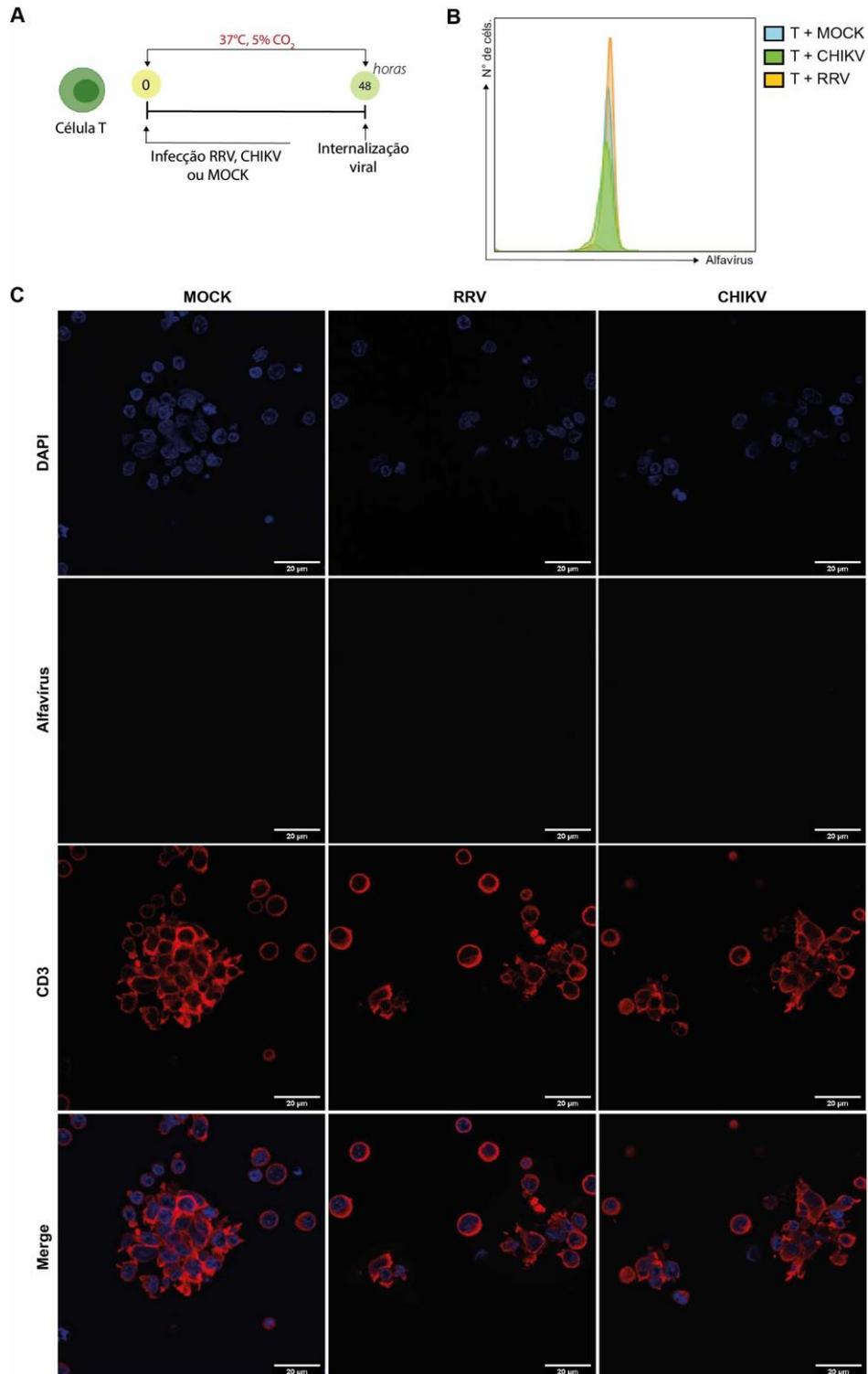


Figura 23. Não há internalização de alfavírus em células T primárias humanas. Células T isoladas de PBMC humano foram incubadas com o CHIKV (MOI 20) e RRV (MOI 50) *in vitro* conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). A internalização do E2 viral foi avaliada por citometria de fluxo e representada em histograma (B) e por imunofluorescência (C). Foi feita a marcação de DNA utilizando DAPI (azul), do RRV ou CHIKV (violeta), e de CD3 (vermelho). Aumento de 63x. Escala de 20µm. Dados representativos de três experimentos e três doadores de PBMC independentes.

5.12 Macrófagos humanos infectados por RRV e CHIKV regulam positivamente a produção de IL-6

Uma vez que os receptores, do RRV, a integrina $\beta 1$ de ligação ao colágeno IV – $\alpha 1\beta 1$ (LINN et al., 2005), e do CHIKV, a molécula MXRA8 (ZHANG et al., 2018), são proteínas utilizadas para adesão de células à matriz extracelular, é possível que apenas células aderentes sejam infectadas pelos vírus. Dessa forma, macrófagos de três doadores saudáveis foram infectados *in vitro* com RRV MOI (10-50), ZIKV MOI 1 e CHIKV MOI (1-20) e incubados por 48 horas. A infectividade foi avaliada por imunofluorescência (**Figura 25A**) sendo que utilizamos ZIKV MOI 1 como controle positivo por ser um vírus que conhecidamente infecta macrófagos (LANG et al., 2018).

Ao avaliarmos a produção de mediadores produzidos por essas células nos MOI de 50 e 10 do RRV, observamos que a produção de IL-6 é regulada positivamente de forma significativa em ambos os MOI (**Figura 25B**), enquanto a produção de IL-12 só é aumentada significativamente a partir do MOI 50 (**Figura 25D**). Curiosamente, não observamos modulação da IL-10 em nenhum dos MOI analisados (**Figura 25C**). A produção de IL-6 por essas células na infecção por CHIKV nos MOI de 1, 5 e 20 é regulada positivamente de forma significativa, e parece ser dependente da quantidade de vírus (**Figura 25E**). Curiosamente, observamos a modulação negativa significativa da IL-10 (**Figura 25F**), de forma dependente ao MOI do CHIKV. A porcentagem de células positivas para o E2 do RRV após 48 horas de infecção foi igual a 1,9%, enquanto o ZIKV teve uma porcentagem de infecção de 13,66%. As células positivas para o E2 do CHIKV após 48 horas de infecção corresponderam a 8,6% (**Figura 25G**). Em seguida, para determinar se novos virions estavam sendo produzidos (Vírus *de novo*) realizamos um ensaio de placa (**Figura 25H**). Utilizamos células tratadas com bafilomicina em DMSO como controle negativo, uma vez que a BafA1 inibe a fusão viral, e conseqüentemente, infecção e replicação viral. Os dados demonstram que a infecção em macrófagos é capaz de produzir replicação do RRV, mas em níveis muito baixos, uma vez que o nosso *cut-off* são o grupo BafA1 (**Figura 25I**).

Coletivamente, os nossos dados sugerem que macrófagos primários humanos são permissíveis a infecção *in vitro* por alfavírus artritogênicos. Além disso, parecem mediar as respostas inflamatórias de células T através da produção de mediadores inflamatórios como IL-6 e IL-12, além de uma aparente ineficiência na produção de mediadores reguladores, como a IL-10, em altos títulos virais (>MOI 10).

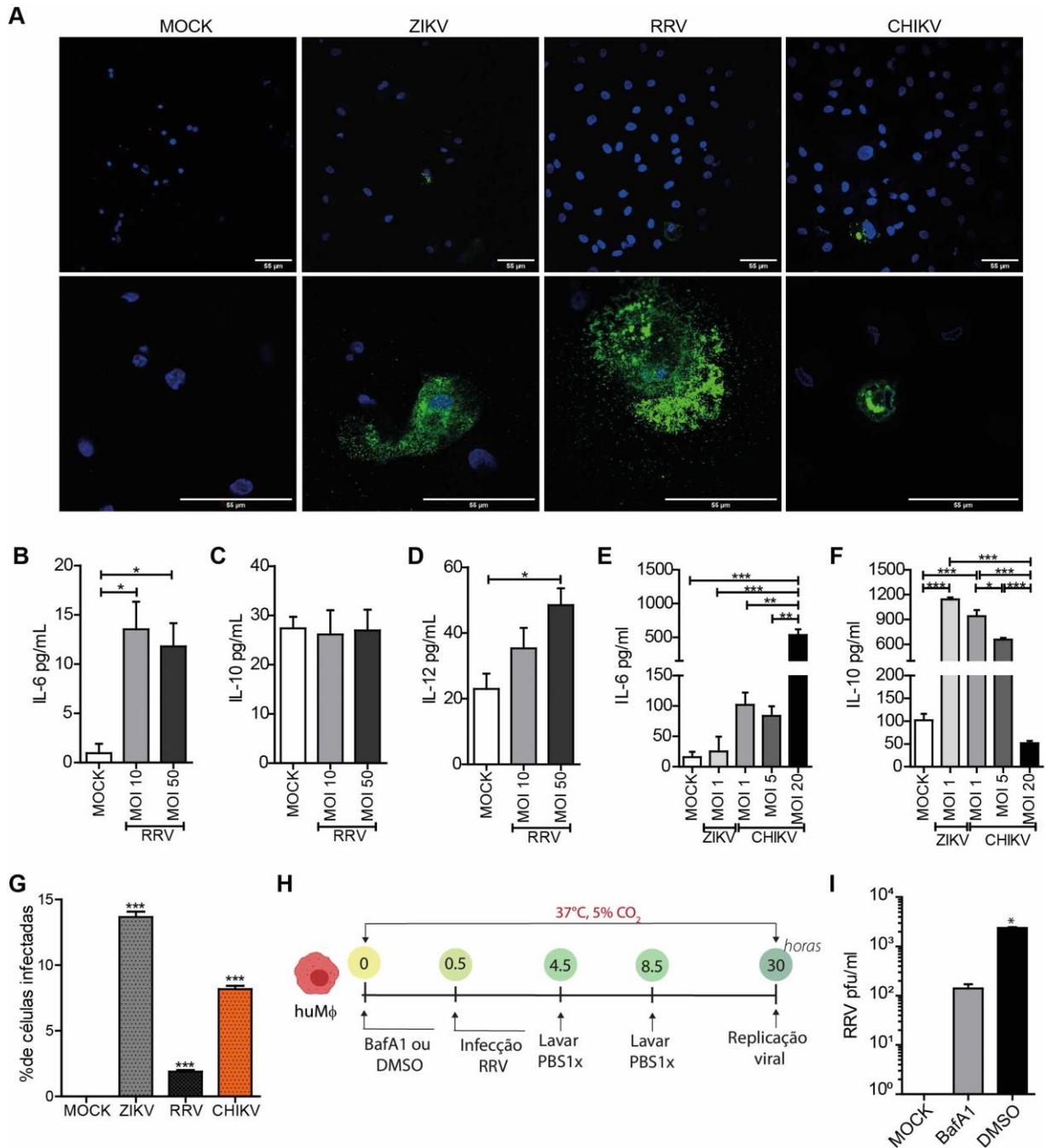


Figura 24. A infecção por RRV e CHIKV induzem a produção de IL-6 por macrófagos humanos. Macrófagos, diferenciados de células obtidas de PBMC humanos, foram incubados com o RRV, ZIKV ou CHIKV *in vitro* por 48 horas, e a internalização do E2 viral foi avaliada por imunofluorescência (A). Produção de IL-6 (B), IL-10 (C) e IL-12 (D) quantificadas no sobrenadante de 48h de cultura nos diferentes MOI do RRV. A produção de IL-6 (E) e IL-10 (F) foi quantificada nos sobrenadantes após 48h de cultura nos diferentes MOI da infecção por ZIKV e CHIKV. A porcentagem de células infectadas por ZIKV, RRV e CHIKV foram quantificadas (G). A replicação viral em macrófagos humanos foi avaliada conforme o protocolo demonstrado na ilustração esquemática (H) e o sobrenadante obtido foi avaliado por ensaio de placa (I). Foi feita a marcação de DNA utilizando DAPI (azul) e do RRV, ZIKV e CHIKV (verde). Aumento de 40x e 63x. Escala de 20µm. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com $p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$. Dados representativos de três experimentos e três doadores de PBMC independentes.

5.13 Macrófagos humanos infectados induzem a resposta de células T na infecção pelo vírus do Ross River

Estudos em primatas não humanos sugerem que a doença crônica da chikungunya envolve a persistência viral, através da marcação positiva de antígeno viral em macrófagos até 3 meses após a infecção (LABADIE et al., 2010). Proteínas e RNA do CHIKV também foram observados em macrófagos sinoviais perivasculares de um paciente 18 meses após a infecção (HOURAU et al., 2010). Além disso, estudos associaram a completa recuperação de pacientes com chikungunya a não migração de monócitos, e consequentemente, diminuição de mediadores produzidos por monócitos e macrófagos tais como, GM-CSF e IL-6 (PORCHERAY et al., 2005; CHOW et al., 2011), dados também corroborados em animais (RULLI et al., 2011).

Dessa forma, para avaliar a persistência viral em macrófagos humanos por um maior período, macrófagos foram infectados por 24h com RRV (MOI 50) e mantidos em cultura por mais 6 dias. Além disso, para avaliar o efeito dos macrófagos infectados frente a resposta de células T, realizamos um ensaio de co-cultura. Após 72 horas de incubação dos macrófagos, foram adicionadas células T ativadas primadas ou não (**Figura 26A**). As células T foram ativadas com PHA (do inglês, *Phytohaemagglutinin P*) por 48h. As células T foram colocadas na presença de APCs previamente infectadas com o vírus para serem primadas.

Como resultado, encontramos por imunofluorescência que macrófagos primários isolados de PBMC humano além de serem permissíveis a infecção por RRV, a presença do E2 viral permanece por, pelo menos, 7 dpi (**Figura 26B**). Ademais, corroboram a permissividade dos macrófagos (CD68), e não das células T (CD3), aos alfavírus através do coeficiente de Mander's (CM). As análises demonstraram que nas células infectadas CD68 e RRV se correlacionam positivamente com o valor do coeficiente igual a 0,957, enquanto não observamos correlação entre CD3 e RRV (CM = 0,245) (**Figura 26C**).

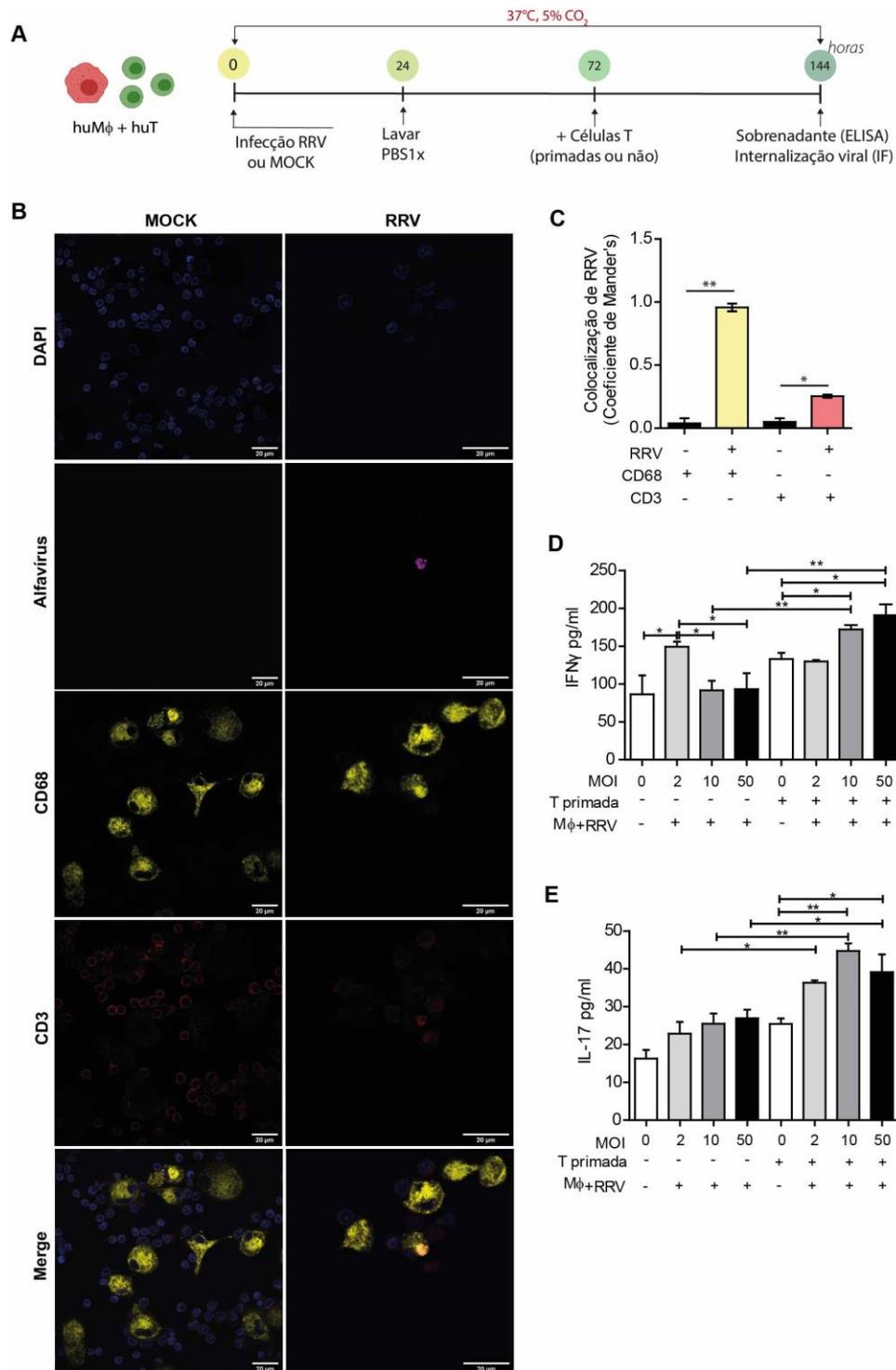


Figura 25. A infecção por RRV induz a resposta imune em uma co-cultura de macrófagos e células T. Macrófagos e células T obtidas de PBMC humano foram infectadas e colocadas em co-cultura conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). A internalização viral foi avaliada através da imunofluorescência do envelope viral (B). A produção de IFN γ (C) e de IL-17 (D) foi quantificada no sobrenadante da co-cultura nos diferentes MOI. Foi feita a marcação de DNA utilizando DAPI (azul), do RRV (violeta), de macrófagos utilizando CD68 (amarelo) e de CD3 (vermelho). Aumento de 63x. Escala de 20 μ m. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way* ANOVA foi utilizado com * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$. Dados representativos de três experimentos e três doadores de PBMC independentes.

Uma vez que as células T não parecem ser suscetíveis a infecção, avaliamos a produção de mediadores por células T em co-cultura com os macrófagos. Os resultados demonstram que as células T não primadas, isto é, inespecíficas para o RRV, foram incapazes de aumentar a produção de INF γ e IL-17 de forma significativa. Já nas co-culturas que foram adicionadas células T previamente primadas para o RRV houve um aumento significativo da produção de INF γ no MOI de 10 e de 50 (**Figura 26D**). O mesmo perfil foi observado na produção de IL-17, onde células T específicas regularam positivamente a produção de IL-17 mesmo em MOI de 2 do RRV (**Figura 26E**). Portanto, os dados sugerem que células T específicas para o vírus são importantes para a exacerbação do processo inflamatória da infecção por RRV.

5.14 Macrófagos humanos com menor expressão de IFITM3 são mais suscetíveis a infecção por RRV

Weston et al. (2016) demonstraram que alfavírus, como SFV, SINV e CHIKV, são restringidos por IFITM3, e em níveis menores por IFITM2, mas não por IFITM1. Portanto, tendo em vista o papel de IFITM3 na inibição da entrada viral ao interferir com a fusão endossomal mediada por pH ácido (LI et al., 2013; DESAI et al., 2014), avaliamos se a expressão dessa molécula está associada a maior permissividade da infecção por alfavírus em macrófagos humanos primários.

Inicialmente, avaliamos a heterogeneidade da expressão de IFITM3 nas populações de macrófagos humanos primários através de imagens de imunofluorescência. Macrófagos incubados com MOCK por 48 horas foram avaliados quanto a intensidade média e a intensidade máxima de fluorescência (MIF). Os resultados demonstram a heterogeneidade constitutiva da expressão de IFITM3 em macrófagos humanos. Isto é, algumas células apresentam de forma inerente em situações fisiológicas uma menor expressão de IFITM3 (**Figura 27A-C**).

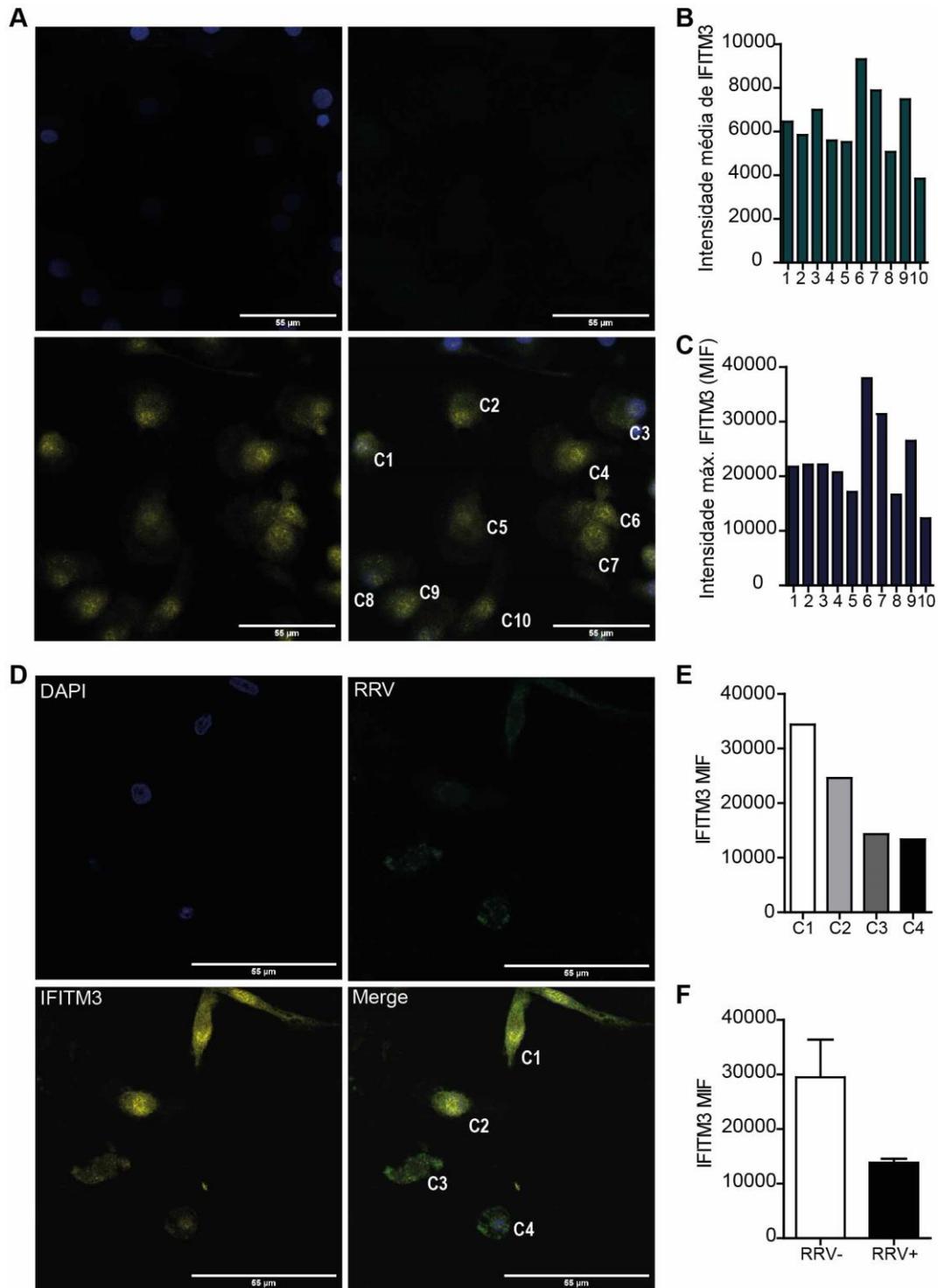


Figura 26. Macrófagos com menor expressão de IFITM3 são mais suscetíveis a infecção por RRV. Macrófagos, diferenciados de células obtidas de PBMC humanos, foram avaliados para expressão constitutiva de IFITM3 por imunofluorescência (A), através da intensidade média (B) e da intensidade máxima (C) de fluorescência. Além disso, macrófagos humanos foram incubados com o RRV MOI 50 *in vitro* por 48 horas, e a expressão de IFITM3 foi avaliada por imunofluorescência (D). As células foram analisadas pela intensidade média de fluorescência (MIF) do IFITM3 nas células individuais (E) e nas células infectadas ou não por RRV. Aumento de 63x. Escala de 55µm. Dados representativos de três experimentos e três doadores de PBMC independentes.

Em seguida, infectamos os macrófagos com RRV MOI 50 por 48 horas para avaliar a intensidade máxima de fluorescência (MIF) e correlacionamos as células infectadas e não infectada com a expressão de IFITM3. Os resultados demonstram que as células com marcação positiva para o envelope do RRV possuem um menor MIF de IFITM3 (**Figura 27D-E**). As análises das imunofluorescências dos três experimentos individuais demonstram que o MIF de IFITM3 é significativamente menor em células infectadas por RRV quando comparadas com as células adjacentes, mas não infectadas pelo RRV. Sendo assim, nossos dados sugerem que o IFITM3 está associado a maior permissividade ao RRV em macrófagos humanos primários.

5.15 Persistência viral no modelo animal crônico da artrite induzida por CHIKV (CIA+CHIKV)

Uma vez demonstrada a capacidade dos macrófagos humanos manter alfavírus por até 7dpi *in vitro*, avaliamos no nosso modelo animal crônico a persistência viral em células do líquido sinovial e dLN. Os camundongos CIA+CHIKV foram infectados com 10^5 de CHIKV e as células e tecidos avaliados foram coletados 21 dpi (**Figura 28A**).

Os nossos resultados demonstram por qPCR a presença de RNAm viral em todos os tecidos avaliados: dLN, sinóvia e músculo. Contudo, o pico da carga viral ocorreu nos tecidos sinoviais com 2×10^5 pg/RNA (**Figura 28B**). Além da presença de cópias do RNA viral, os nossos dados demonstram pela imunofluorescência a persistência viral no modelo CIA+CHIKV em células dos dLNs (**Figura 28C**) e em células do líquido sinovial (**Figura 28D**) até, pelo menos, 21 dpi.

Por fim, avaliamos se a presença do CHIKV aumenta a expressão de quimionas e citocinas na sinóvia. Observamos que o grupo CIA+CHIKV teve aumento da expressão do RNAm de CCL2 (**Figura 28E**), CCL20 (**Figura 28F**), CCL5 (**Figura 28G**) e IL-6 (**Figura 28H**), de forma significativa, quando comparado com o grupo controle CIA, enquanto, a expressão do RNAm de IL-10 (**Figura 28I**) não demonstrou nenhuma alteração significativa. Dessa forma, os nossos resultados sugerem que a persistência viral em locais específicos, tanto pela indução do recrutamento celular e pela manutenção da resposta inflamatória exacerbada, pode representar um mecanismo para o desenvolvimento da fase crônica da chikungunya.

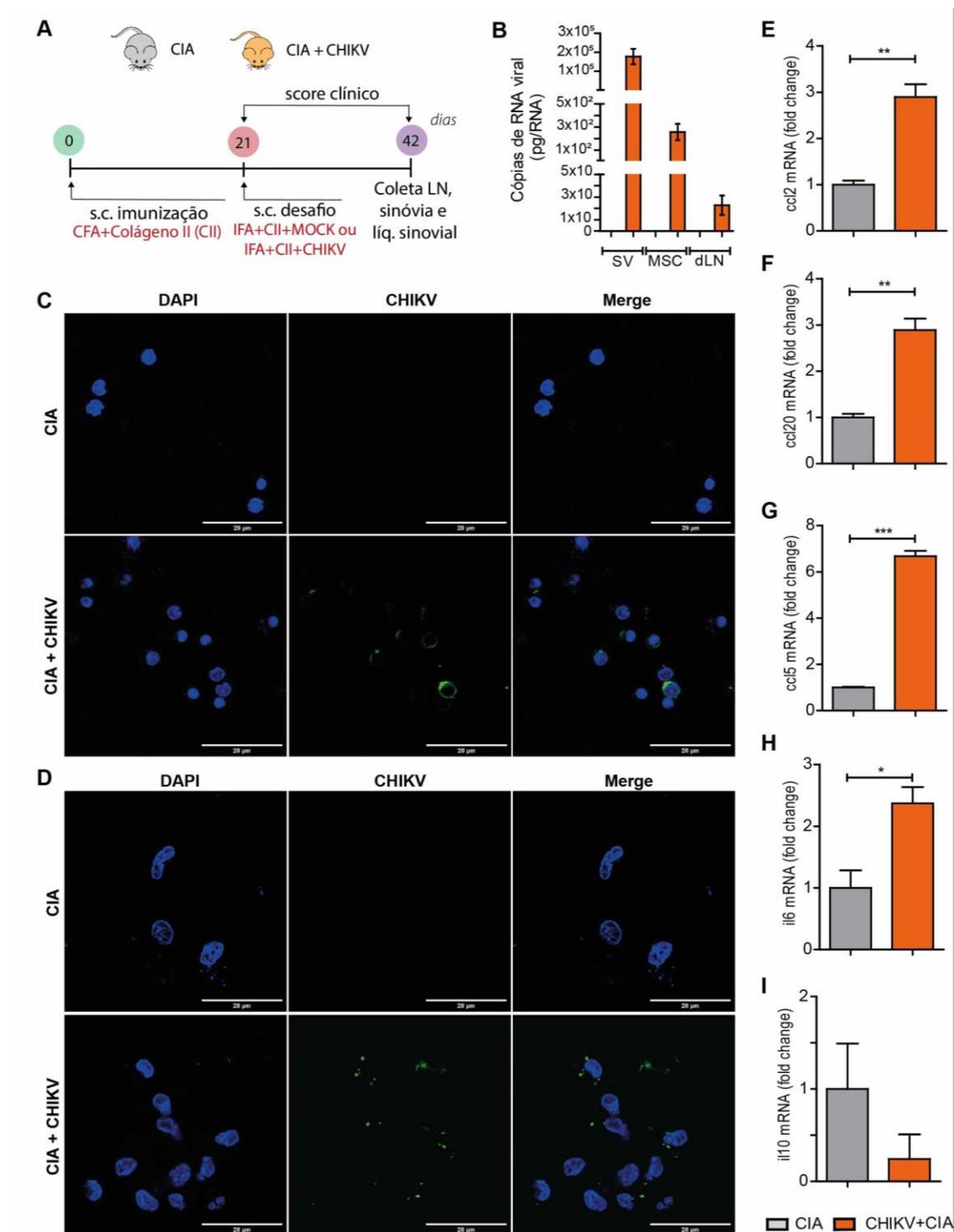


Figura 27. Persistência viral nos tecidos sinoviais e dLN no modelo animal da artrite crônica induzida pelo CHIKV (CIA+CHIKV). Tecidos e células da sinóvia, músculo e dLN foram obtidos do modelo animal CIA+CHIKV conforme demonstrado na ilustração esquemática (A). A carga viral da sinóvia, músculo e dLN foi realizada por qPCR (B). A internalização viral também foi analisada através da imunofluorescência das células do dLN (C) e das células do líquido sinovial (D). Expressão de citocinas e quimiocinas, tais como, (E) CCL2, (F) CCL20, (G) CCL5, (H) IL-6 e (I) IL-10 foram avaliadas na sinóvia dos camundongos CIA+CHIKV comparado com o grupo controle CIA. Foi feita a marcação de DNA utilizando DAPI (azul) e do CHIKV (verde). Aumento de 63x. Escala de 28µm. Teste de comparação múltipla de grupos *One-way ANOVA* foi utilizado com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Dados representativos de um experimento.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Infecções emergentes por arbovírus artritogênicos têm aumentando notavelmente nos últimos anos, afetando uma quantidade considerável da população (AMDEKAR et al., 2017). O impacto sanitário, econômico e psicossocial atrelado à patologia debilitante da chikungunya é elevado, bem como a sobrecarga causada no sistema de saúde, que precisa responder de forma eficiente a esta emergência. O desenvolvimento de dores articulares persistentes, promotores de um acometimento físico incapacitante, similar a artrite reumatoide (AMDEKAR et al., 2017) são chave no impacto da doença da chikungunya. A evolução dos pacientes para o estágio crônico da doença meses após a infecção foi relatado por Schilte e colaboradores (2013), com sintomatologia equivalente às relatadas no presente estudo. Entretanto, são notórias as lacunas de conhecimento referentes ao processo de cronicidade dessas doenças, como a chikungunya. Portanto, elucidar os mecanismos envolvidos na imunopatologia da chikungunya é essencial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas específicas e eficientes que auxiliem no melhor prognósticos dos pacientes acometidos.

Para compreender a imunopatologia da chikungunya vários modelos de camundongos foram desenvolvidos para diferentes aspectos da doença. O uso camundongos C57BL/6 neonatais como modelo de estudo da chikungunya revela a presença de várias das manifestações clínicas relevantes da doença, tais como, edema na articulação e miosite (Morrison et al., 2011). Contudo, esse modelo de camundongos com 14 dias de vida possui limitações, especialmente quanto ao teste de vacinas. Outros pesquisadores desenvolveram um modelo que compreende o desenvolvimento do edema na articulação e na pata em camundongos C57BL/6 adultos, por meio da inoculação do vírus na pata traseira, determinando características clássicas da fase aguda da doença (Gardner et al., 2010). Ademais, camundongos IFNAR^{-/-} são bastante suscetíveis a infecção por CHIKV e sucumbem rapidamente (Couderc et al., 2008), podendo ser utilizados como modelo de infecções mais graves que ocasionalmente levam a mortalidade. Assim, todos os modelos supracitados atendem o delineamento de estudos da infecção para o período da fase aguda da doença, 2-3 dias após a infecção, mas não aos quesitos de cronicidade.

Dessa forma, a principal limitação dos modelos animais atuais é ausência de desenvolvimento e persistência da artralgia crônica, como observado em humanos (JAFFAR-BANDJEE e GASQUE, 2012). O principal fardo clínico e econômico da doença humana causada pelo CHIKV é a artralgia, a qual afeta diretamente a qualidade de vida dos pacientes, tornando os indivíduos infectados incapazes de trabalhar e de realizar atividades essenciais. Demonstra-se assim que o tratamento ou prevenção do desenvolvimento de artralgia em indivíduos infectados é essencial, ressaltando a necessidade da investigação dos processos envolvidos nesse cenário. Para isso, se faz necessário um modelo animal que seja capaz de recapitular a artrite comumente observada em humanos. Camundongos DBA1/J, um modelo estabelecido no estudo de AR, parece ser um modelo mais relevante em comparação aos outros modelos na CHIKV.

Nossos dados demonstraram títulos virais detectados em vários tecidos dos camundongos DBA1/J infectados pelo CHIKV, mesmo que em níveis menores que os camundongos deficientes de receptor de INF do tipo I. Também demonstraram a expressão de genes associados a resposta inflamatória como IL-6, IL-1 β e IL-17. Contudo, apenas a infecção com o CHIKV não foi capaz de desenvolver a artralgia crônica persistente da chikungunya observada em humanos. Recentemente, foi demonstrado um mecanismo no qual a inflamação recorrente em locais específicos ocorre devido ao *priming* tecidual por um primeiro sinal de dano, primeiro sinal artrítico. A reexposição a um estímulo inflamatório seria, então, responsável pela recorrência dos sinais artríticos em camundongos (FRISCIC et al., 2021). Além disso, devido à similaridade entre a chikungunya e a AR (CHAAITANYA et al. 2011; YIN et al., 2015), decidimos associar o modelo de CIA (TRENTHAM, TOWNES E KANG, 1977) a infecção por CHIKV, racionalizando esse modelo CIA+CHIKV, onde CHIKV funcionaria como gatilho inflamatório para o desenvolvimento dos sinais clínicos crônicos da chikungunya. Dessa forma, o modelo CIA+CHIV foi capaz de mimetizar a resposta inflamatória ocasionada na chikungunya.

De fato, a utilização do modelo CIA para o desenvolvimento do modelo crônico animal demonstrou que camundongos propensos a desenvolver a artrite clínica ao serem desafiados com o vírus do CHIKV desenvolvem a doença em maior incidência e demonstram um adiantamento do surgimento dos sinais clínicos da doença. Comumente, no modelo animal do protocolo CIA, a inflamação ativa é controlada

entre 3-4 semanas após o surgimento dos sinais clínicos (HOLMDAHL et al., 2001), dados semelhantes foram observados no modelo CIA+CHIKV. As articulações após esse período possuem destruição e remodelação óssea, mas estão isentas do processo inflamatório. Alguns estudos demonstraram que em casos raros podem ocorrer o relapso da doença crônica meses depois (HOLMDAHL et al., 2001). Infelizmente, não pudemos acompanhar os grupos CIA e CIA+CHIKV por um maior período após a recuperação do quadro clínico. Dessa forma, seria interessante avaliar se a infecção pelo CHIKV é capaz de estimular esse fenótipo de relapso clínico, como observado em humanos, e se esse fenômeno ocorre com maior frequência quando comparado com o grupo CIA.

Demonstramos também que o gatilho para o desenvolvimento das características inflamatórias crônicas ocorre de maneira vírus-dependente ou resposta imune específica, visto que a utilização do ZIKV no modelo CIA+ZIKV não promoveu as mesmas características observadas na presença do CHIKV.

Infecções por arbovírus já ilustraram anteriormente a importância da resposta de células T na imunopatologia dessas doenças (GAGNON, ENNIS e ROTHMAN, 1999; SUHRBIER e LA LINN, 2004). Por exemplo, células T CD8⁺ possuem um papel dual em camundongos infectados com WNV (WANG et al., 2003), enquanto, células T CD4⁺ demonstram um papel deletério na infecção pelo DENV em humanos (GAGNON, ENNIS e ROTHMAN, 1999). O papel das células T na patologia da doença do chikungunya ainda são amplamente desconhecidos. Contudo, alguns indícios em estudos com humanos (HOARAU et al., 2010) e em camundongos (TEO et al., 2013) sugerem um papel patogênico das células T CD4⁺ durante a fase aguda da doença. No nosso estudo, observamos o aumento desse subtipo celular em pacientes com a artrite crônica da chikungunya e demonstramos que células T CD4⁺ correlacionam-se positivamente com o maior score clínico da doença em nosso modelo CIA+CHIKV.

Apesar do mecanismo pelo qual as células T CD4⁺ mediam a patologia articular ainda não serem bem elucidados, o conhecimento dos perfis das citocinas observados nas infecções por CHIKV sugerem que as células T CD4⁺ podem estar mediando a inflamação via Th17 e Th1, tais como, os mecanismos observados na AR. Altos níveis de citocinas do perfil Th17, com IL-1 β , IL-6, e IL-17, já foram demonstrados em humanos e camundongos infectados por CHIKV (RULLI et al., 2011). Ademais, a produção de IL-17 já foi demonstrada em pacientes crônicos da chikungunya, e sua

correlação ao surgimento dos sinais clínicos observados na artrite reumatoide, principalmente dor e edema (AMARAL, SUTARIA, SCHOEN, 2018).

Células Th17 foram identificadas com o único subtipo de célula T auxiliar osteoclastogênica. Uma vez que as Th17 produzem a IL-17, conhecidamente como forte promotor da osteoclastogênese via a indução do ligante de NF- κ B, RANKL, que resulta em erosão óssea (BRAUN e ZWERINA, 2011). Ademais, a IL-17 induz a produção de diferentes citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 de fibroblastos sinoviais ocasionando perda óssea (MORAN et al., 2009). Além das doenças autoimunes, um estudo recente demonstrou o papel central das células Th17 no desenvolvimento da doença neurológica por alfavírus (KULCSAR et al., 2014).

A inflamação articular induzida pelo CHIKV não está correlacionada diretamente com a carga viral sistêmica (GARDNER et al., 2010), o que sugere que a inflamação é mediada por uma resposta imune patogênica. No entanto, não podemos descartar que possivelmente a presença do vírus em reservatórios imunológicos, também é um fator importante na manutenção da ativação da resposta pró-inflamatória exacerbada. Nossos resultados mostraram que a transferência de células T CD4⁺ foi capaz de recapitular o desenvolvimento da doença, com desenvolvimento de edema e perda da função de patas acometidas, similarmente ao modelo CIA+CHIKV. Além disso, o tratamento com bloqueadores de sinalização de IL-17 no grupo de camundongos receptores preveniu o desenvolvimento dos sinais clínicos, reforçando ainda mais os nossos dados que células Th17 estão intimamente relacionadas com a artrite crônica induzida pelo CHIKV.

Contudo, o adiantamento do aparecimento dos sinais clínicos é perdido nos camundongos que receberam células de doadores CIA+CHIKV, quando comparados ao fenótipo observado nos camundongos CIA+CHIKV. Isso sugere que a presença viral pode ser fator chave no desenvolvimento e manutenção da patologia no nosso modelo. Nossos dados de humanos também corroboram os achados do modelo CIA+CHIKV, todavia os ensaios de citometria de fluxo de sangue periférico não são suficientes para avaliarmos o perfil funcional das células T na patologia induzida pelo CHIKV. Mais estudos precisam ser realizados com uma coorte maior de pacientes, utilizando tanto amostras de PBMC quanto do líquido sinovial durante a fase sintomática dos pacientes.

A chikungunya é caracterizada por uma resposta imunológica extremamente inflamatória (BAUD et al., 2016). Dessa forma, mecanismos reguladores são necessários para prevenir o estabelecimento da doença crônica semanas/meses após ao *clearance* viral sistêmico. A ausência dessa regulação pode ser responsável pelo desencadeamento de uma artralgia crônica, uma vez que ocorre a manutenção da produção de marcadores de inflamação (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). As células Treg, devido ao seu papel de manutenção de homeostase, são comumente associadas a evolução clínica de pacientes durante diversos processos infecciosos (LAIDLAW et al., 2015). Em estudos com o vírus da hepatite B (VHB) foram observados baixos níveis de células Treg comparado com altos níveis de células Th17 em pacientes infectados (CHEN et al., 2014; LIANG et al., 2014). No entanto, seu papel em infecções virais crônicas ainda não está claramente definido (PARK et al., 2015). No presente estudo demonstramos que nosso modelo animal crônico (CIA+CHIKV) apresentou uma menor média de células Treg em comparação aos grupos controles. Os nossos dados em humanos demonstram um perfil semelhante, mas devido ao “n” amostral não foi possível observar uma diferença significativa, sendo necessário a avaliação de um maior número de pacientes crônicos da chikungunya. Um estudo demonstrou que pacientes infectados com Vírus do oeste do Nilo possuem uma correlação positiva entre altas frequências de células T reguladoras e a diminuição de infecções sintomáticas do WNV (LANTERI et al., 2009). Dessa forma, sugerimos que a diminuição de células T reg durante a fase crônica da doença favorecem a manutenção do perfil inflamatório, contribuindo para a imunopatologia da doença crônica. Dessa forma, essas células apresentam potencial uso como biomarcadores para o prognóstico de gravidade da sintomatologia clínica em pacientes.

Além das células Treg, estudos recentes identificaram duas citocinas antiinflamatórias da família da citocina IL-12, a IL-27 e a IL-35 (COLLISON et al., 2007) que atuam na regulação da resposta imune. Em modelos de artrite reumatóide, estudos demonstraram que a IL-35 *in vitro* promove a propagação de células T reguladoras, além de produzir maiores níveis de IL-10, conseqüentemente reprimindo a diferenciação de células Th17 (NIEDBALA et al., 2007). Ademais, *in vivo*, a IL-35 foi capaz de reduzir significativamente a hiperplasia sinovial e destruição óssea de camundongos CIA (NIEDBALA et al., 2007; KOCHETKOVA et al., 2010). Kochetkova

et al. (2010) demonstraram que o tratamento *in vivo* com IL-35 diminuiu significativamente os níveis de INF γ e IL-17, respectivamente, 4 e 5 vezes em camundongos CIA.

Existem evidências que a IL-27 atenua a gravidade de doenças autoimunes como, a encefalomielite autoimune experimental (EAE) e a artrite induzida por colágeno e artrite reumatóide, suprimindo células Th17 e aumentando a diferenciação de células Treg (BATTEN et al., 2006; MOON et al., 2013). Os dados obtidos no nosso estudo, tanto o modelo CIA+CHIKV quanto em pacientes crônicos, demonstraram uma diminuição significativas das expressões gênicas de IL-27 e IL-35 em comparação com os controles. Nossos dados com CIA+ZIKV sugerem ainda mais a importância da regulação da resposta para proteção ao desenvolvimento clínico da artrite, uma vez que a infecção com ZIKV apresentou fenótipo contrário ao observado no modelo CIA+CHIKV. Isto, pois, a literatura demonstra que a infecção por ZIKV induz uma produção significativa das citocinas de supressão, IL-10 e TGF- β , de resposta inflamatória (TAPPE et al., 2016). Dessa forma, sugerimos que a resposta reguladora ineficiente é importante na manutenção do processo inflamatório exacerbado por longos períodos.

Em associação a desregulação da resposta imune, a persistência do CHIKV em reservatórios nas articulações pode ser característica determinante da fase crônica da doença (LABADIE et al., 2010; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). Assim, a persistência do vírus nos tecidos sinoviais podem ser responsáveis pela inflamação local crônica, que causa dor e estabelece condições locais que seguem favorecendo a persistência viral (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012). Sabe-se através de estudos de HIV/AIDS (BISWAS et al., 1992; DHAWAN et al., 1995) que a resposta inflamatória contribui para a eliminação viral. Em contrapartida, esse processo inflamatório também pode contribuir para a manutenção dos níveis de ativação necessários para replicação e persistência viral nos tecidos, como ocorre em macrófago que são células alvos e reservatórios para oHIV (DHAWAN et al., 1995).

No entanto, os estudos apenas demonstram a presença viral através da marcação de antígeno para CHIKV, ou presença de RNA viral nesses subtipos celulares (HOURAU et al., 2010; LABADIE et al., 2010). O nosso estudo demonstrou a permissividade dos macrófagos a infecção por alfavírus e sua capacidade de se replicar em macrófagos humanos primários *in vitro*. A permissividade dos macrófagos

parece estar associada a menor expressão constitutiva de IFITM3. Isto se deve ao fato que esta molécula encontra-se comumente associada ao compartimento endossomal tardio, inibindo a fusão viral com as membranas celulares (WESTON et al., 2016). Infusini e colaboradores (2015) demonstraram células dendríticas respiratórias não podem ser infectadas pelo vírus da influenza no percurso entre o linfonodo e o pulmão para *priming* de células T CD8⁺ específicas, e isso é dependente da regulação positiva da expressão de IFITM3. Desse modo, sugerimos que a permissividade dos macrófagos a infecção por alfavírus pode ser dependente da regulação negativa de IFITM3.

Ademais, no nosso modelo animal a presença viral é mantida no líquido sinovial e linfonodos drenantes até depois de 21 dias da infecção, enquanto que sistemicamente não é identificada a presença do vírus, indicando a eliminação viral sistêmica. Dessa forma, sugerimos que a persistência de CHIKV pode ser resultado de uma fase inflamatória imperfeitamente resolvida, na qual a ingestão de células apoptóticas por macrófagos, garantem a manutenção viral. Associado a isso, problemas na ativação da resposta reguladora (KREJBICH-TROTOT ET AL., 2011) somam-se, sendo ambas necessárias para o desencadeamento da artrite crônica da chikungunya.

A inflamação crônica da sinóvia durante a AR ocorre devido a liberação de uma variedade de mediadores entre eles quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e matriz de metaloproteinase (MMP), que acarretam ativação contínua do sistema imune (KOCK, 2005). Diversas células estão associadas a patogenia da AR, incluindo neutrófilos, células T e macrófagos. Células Th17 conhecidamente produzem TNF- α e CXCL8 que atraem neutrófilos para a sinóvia. Os neutrófilos, por sua vez, secretam CCL2 e CCL20 que ativam ainda mais as células Th17 (NAVEGANTES et al., 2017). Enquanto os níveis de CCL2 na AR têm sido fortemente associados com o aumento da infiltração de células nas articulação, especialmente macrófagos (KOCH et al., 1992). Macrófagos M1 secretam mais citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, CXCL8 e CXCL10, que recrutam ainda mais leucócitos, promovendo a AR e a destruição óssea articular (NAVEGANTES et al., 2017; MORAND e LEED, 2005). Além disso, um estudo demonstrou que CCL5, induzido por IL-1 β , é capaz de induzir a expressão MMP-1 e MMP-13, atividade de colagenase e ainda potencializar a destruição óssea induzida por IL-1 β . O CCL5 é, pois,

potencialmente um mediador importante nos danos ósseos e cartilagosos implicados na AR (AGERE et al., 2017).

Interessantemente, os dados de RNA_m na sinóvia do nosso modelo CIA+CHIKV demonstram expressões aumentadas de IL-6, CCL2, CCL5 e CCL20 em comparação ao CIA. Esses dados sugerem que a presença viral de fato exacerba a resposta e o infiltrado inflamatório, criando um sistema de feedback positivo que perpetua a resposta inflamatória e, potencialmente, a evolução da doença crônica. A associação dos dados obtidos em humanos e em modelo animal podem constituir uma importante ferramenta para o tratamento preventivo de alvos imunomoduladores relevantes no tratamento da artrite crônica da chikungunya. Seria interessante, no entanto, a obtenção de dados de grupos maiores de pacientes para determinar com precisão os subtipos de células T CD4⁺ associados com a doença crônica da chikungunya. Por fim, o presente estudo sugere que para o desenvolvimento da artrite crônica da chikungunya além da resposta inflamatória deletéria, a doença requer um defeito na regulação da inflamação entre as fases aguda e crônica. Assim, a ausência de regulação e a persistência viral resulta na manutenção do processo inflamatório deletério por até pelo menos seis meses após ao surgimento dos primeiros sinais clínicos em humanos.

Portanto, em nosso estudo, demonstramos pela primeira vez um modelo animal para a fase crônica da infecção por CHIKV. Os nossos resultados demonstram a importância das células T CD4⁺, especificamente células Th17, para a patogênese da doença crônica da chikungunya em murinos e humanos. Mais além, sugerimos que essa resposta exacerbada de células T é dependente da persistência viral em células imunes residentes nos tecidos sinoviais, regiões comumente afetadas na manifestação clínica da doença. Assim, demonstramos que os macrófagos, passíveis a infecção e replicação viral de alfavírus artritogênicos, podem ser considerados reservatórios virais e são responsáveis pela manutenção do microambiente extremamente inflamatório e, conseqüentemente maior infiltrado de células T. No nosso modelo animal e em amostras de humanos o vírus é capaz de induzir a produção de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-6, enquanto a resposta reguladora parece estar comprometida.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

No nosso modelo animal a artrite crônica induzida por CHIKV é dependente da sinalização de IL-17 por células T CD4⁺, o que é corroborado em humanos com a chikungunya crônica.

A persistência viral em células e macrófagos sinoviais em nosso modelo animal mantém a ativação exacerbada da resposta inflamatória, principalmente a produção de IL-6, mesmo após o controle viral sistêmico.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. ADAMOPOULOS, Iannis E.; PFLANZ, Stefan. The emerging role of Interleukin 27 in inflammatory arthritis and bone destruction. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 24, n. 2, p. 115-121, 2013.
2. AGERE, Solomon A. et al. RANTES/CCL5 induces collagen degradation by activating MMP-1 and MMP-13 expression in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1341, 2017.
3. AGRAZ-CIBRIAN, Juan Manuel et al. Understanding the molecular mechanisms of NETs and their role in antiviral innate immunity. **Virus research**, v. 228, p. 124-133, 2017.
4. ALBERT, Lori J.; INMAN, Robert D. Molecular mimicry, and autoimmunity. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 27, p. 2068-2074, 1999.
5. AMARAL, J. Kennedy; BINGHAM III, Clifton O.; SCHOEN, Robert T. Successful methotrexate treatment of chronic chikungunya arthritis. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 3, p. 119-124, 2020.
6. AMDEKAR, Sarika; PARASHAR, Deepti; ALAGARASU, Kalichamy. Chikungunya virus-induced arthritis: role of host and viral factors in the pathogenesis. **Viral immunology**, v. 30, n. 10, p. 691-702, 2017.
7. ANDERSON, Jennifer J. et al. Factors predicting response to treatment in rheumatoid arthritis: the importance of disease duration. **Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology**, v. 43, n. 1, p. 22-29, 2000.
8. BATTEN, Marcel et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. **Nature immunology**, v. 7, n. 9, p. 929-936, 2006.
9. BAUD, David et al. Clinical management of pregnant women exposed to Zika virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 523, 2016.
10. BISWAS, Priscilla et al. Interferon gamma induces the expression of human immunodeficiency virus in persistently infected promonocytic cells (U1) and redirects the production of virions to intracytoplasmic vacuoles in phorbol myristate acetate differentiated U1 cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 176, n. 3, p. 739-750, 1992.
11. BOISSIER, MARIE-CHRISTOPHE et al. Experimental autoimmune arthritis in mice. I. Homologous type II collagen is responsible for self-perpetuating chronic polyarthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 46, n. 9, p. 691-700, 1987.
12. BOSMANN, Markus; WARD, Peter A. Modulation of inflammation by interleukin-27. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 6, p. 1159-1165, 2013.

13. BOUQUILLARD, Éric; COMBE, Bernard. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. **Joint Bone Spine**, v. 76, n. 6, p. 654-657, 2009.
14. BOYD, Tim D. et al. GM-CSF upregulated in rheumatoid arthritis reverses cognitive impairment and amyloidosis in Alzheimer mice. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, n. 2, p. 507-518, 2010.
15. BRAND, David D.; LATHAM, Kary A.; ROSLONIEC, Edward F. Collagen-induced arthritis. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1269, 2007.
16. BRAUN, Tobias; ZWERINA, Jochen. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 4, p. 1-11, 2011.
17. BROWN, Rebecca S.; WAN, Judy J.; KIELIAN, Margaret. The alphavirus exit pathway: what we know and what we wish we knew. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 89, 2018.
18. CARREGARO, Vanessa et al. Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 8, p. 4347-4359, 2011.
19. CHAITHANYA, Itta Krishna et al. Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. **Viral immunology**, v. 24, n. 4, p. 265-271, 2011.
20. CHALAEM, Pattra et al. Characterization of a Chikungunya virus strain isolated from banked patients' sera. **Virology journal**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2016.
21. CHEN, Weiqiang et al. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. 6040-6045, 2014.
22. CHEN, Weiqiang et al. Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. **Trends in microbiology**, v. 23, n. 1, p. 35-43, 2015.
23. CHEN, Yi et al. Effects of the Treg/Th17 cell balance and their associated cytokines in patients with hepatitis B infection. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 9, n. 2, p. 573-578, 2015.
24. CHOW, Angela et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149-157, 2011.
25. COLLISON, Lauren W. et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. **Nature**, v. 450, n. 7169, p. 566-569, 2007.

26. COUDERC, Thérèse et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, p. e29, 2008.
27. DAGLEY, Ashley et al. Protection against Chikungunya virus induced arthralgia following prophylactic treatment with adenovirus vectored interferon (mDEF201). **Antiviral research**, v. 108, p. 1-9, 2014.
28. DESAI, Tanay M. et al. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 4, p. e1004048, 2014.
29. DHAWAN, Subhash et al. Interferon- γ -Induced Downregulation of CD4 Inhibits the Entry of Human Immunodeficiency Virus Type-1 in Primary Monocytes. **Pathobiology**, v. 63, n. 2, p. 93-99, 1995.
30. DUIJL-RICHTER, Van et al. Early events in chikungunya virus infection—from virus cellbinding to membrane fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647-3674, 2015.
31. DUPUIS-MAGUIRAGA, Laurence et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.
32. FRIEDMAN, Richard L. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interferon-induced gene expression in human cells. **Cell**, v. 38, n. 3, p. 745-755, 1984.
33. FRIŠČIĆ, Jasna et al. The complement system drives local inflammatory tissue priming by metabolic reprogramming of synovial fibroblasts. **Immunity**, v. 54, n. 5, p. 1002-1021. e10, 2021.
34. GAGNON, Susan J.; ENNIS, Francis A.; ROTHMAN, Alan L. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4⁺ cytotoxic T-lymphocyte clones. **Journal of virology**, v. 73, n. 5, p. 3623-3629, 1999.
35. GARDNER, Joy et al. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. **Journal of virology**, v. 84, n. 16, p. 8021-8032, 2010.
36. GUAN, Shi-Yang et al. Interleukin-35: a potential therapeutic agent for autoimmune diseases. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 303-310, 2017.
37. HASHIMOTO, Motomu. Th17 in animal models of rheumatoid arthritis. **Journal of clinical medicine**, v. 6, n. 7, p. 73, 2017.
38. HER, Zhisheng et al. Loss of TLR3 aggravates CHIKV replication and pathology due to an altered virus-specific neutralizing antibody response. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 1, p. 24-41, 2015.
39. HIROKI, Carlos H. et al. Neutrophil extracellular traps effectively control acute chikungunya virus infection. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 3108, 2020.

40. HOARAU, Jean-Jacques et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.
41. HOLMDAHL, Rikard et al. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice—a model for rheumatoid arthritis. **Ageing research reviews**, v. 1, n. 1, p. 135-147, 2002.
42. INFUSINI, Giuseppe et al. Respiratory DC use IFITM3 to avoid direct viral infection and safeguard virus specific CD8+ T cell priming. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143539, 2015.
43. IVASHKIV, Lionel B.; DONLIN, Laura T. Regulation of type I interferon responses. **Nature reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36-49, 2014.
44. JAVELLE, Emilie et al. Specific management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003603, 2015.
45. JOSE, Joyce; SNYDER, Jonathan E.; KUHN, Richard J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future microbiology**, v. 4, n. 7, p. 837-856, 2009.
46. JOVANOVIC, Dragan V. et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3513-3521, 1998.
47. KAMIMOTO, Miyuki; MIZUNO, Shinya; NAKAMURA, Toshikazu. Reciprocal regulation of IL-6 and IL-10 balance by HGF via recruitment of heme oxygenase-1 in macrophages for attenuation of liver injury in a mouse model of endotoxemia. **International journal of molecular medicine**, v. 24, n. 2, p. 161-170, 2009.
48. KIELIAN, Margaret; CHANEL-VOS, Chantal; LIAO, Maofu. Alphavirus entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 2, n. 4, p. 796-825, 2010.
49. KLARESKOG, Lars; CATRINA, Anca I.; PAGET, Stephen. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v.373, p. 659–672, 2009.
50. KOCH, Alisa E. et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. **The Journal of clinical investigation**, v. 90, n. 3, p. 772-779, 1992.
51. KOCHETKOVA, Irina et al. IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7144-7153, 2010.

52. KOLLS, Jay K.; LINDÉN, Anders. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467-476, 2004.
53. KREJBICH-TROTOT, Pascale et al. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 314-325, 2011.
54. KULCSAR, Kirsten A. et al. Interleukin 10 modulation of pathogenic Th17 cells during fatal alphavirus encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 16053-16058, 2014.
55. LA LINN, May et al. An arthritogenic alphavirus uses the $\alpha 1\beta 1$ integrin collagen receptor. **Virology**, v. 336, n. 2, p. 229-239, 2005.
56. LABADIE, Karine et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 3, p. 894-906, 2010.
57. LANCIOTTI, Robert S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 764, 2007.
58. LANG, Jianshe et al. An hPSC-derived tissue-resident macrophage model reveals differential responses of macrophages to ZIKV and DENV infection. **Stem cell reports**, v. 11, n. 2, p. 348-362, 2018.
59. LANTERI, Marion C. et al. Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 11, p. 3266-3277, 2009.
60. LEE, Wendy WL et al. Expanding regulatory T cells alleviates chikungunya virus-induced pathology in mice. **Journal of virology**, v. 89, n. 15, p. 7893-7904, 2015.
61. LI, Kun et al. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 1, p. e1003124, 2013.
62. LIANG, Xue-Song et al. Changes in circulating Foxp3+ regulatory T cells and interleukin-17-producing T helper cells during HBV-related acute-on-chronic liver failure. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 20, n. 26, p. 8558, 2014
63. LONDEI, Marco et al. Persistence of collagen type II-specific T-cell clones in the synovial membrane of a patient with rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 2, p. 636-640, 1989.
64. LUM, Fok-Moon et al. An essential role of antibodies in the control of Chikungunya virus infection. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 12, p. 6295-6302, 2013.
65. MALVY, Denis et al. Destructive arthritis in a patient with chikungunya virus infection with persistent specific IgM antibodies. **BMC infectious diseases**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2009.

66. MCINNES, Iain B.; SCHETT, Georg. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205-2219, 2011.
67. MEERTENS, Laurent et al. FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. **Nature**, v. 574, n. 7777, p. 259-263, 2019.
68. MIOSSEC, Pierre. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 3, p. 594-601, 2003.
69. MORAND, Eric F.; LEECH, Michelle. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis. **Front Biosci**, v. 10, n. 1, p. 12-22, 2005.
70. MOON, Su-Jin et al. In vivo action of IL-27: reciprocal regulation of Th17 and Treg cells in collagen-induced arthritis. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 10, p. e46-e46, 2013.
71. MORRISON, Thomas E. et al. A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: Evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 1, p. 32-40, 2011.
72. NAIDES, Stanley J. Rheumatic manifestations of parvovirus B19 infection. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 24, n. 2, p. 375-401, 1998.
73. NAKAMURA, Kazuhiko; KITANI, Atsushi; STROBER, Warren. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β . **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 5, p. 629-644, 2001.
74. NAKAYA, Helder I. et al. Gene profiling of Chikungunya virus arthritis in a mouse model reveals significant overlap with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 11, p. 3553-3563, 2012.
75. NASAR, Farooq et al. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 36, p. 14622-14627, 2012.
76. NAVAGANTES, K. C. dede Souza Gomes R, Pereira PAT, Czaikoski PG, Azevedo CHM, Monteiro MC. Immune modulation of some autoimmune diseases: the critical role of macrophages and neutrophils in the innate and adaptive immunity. **J Transl Med**, v. 15, p. 36, 2017.
77. NIEDBALA, Wanda et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. **European journal of immunology**, v. 37, n. 11, p. 3021-3029, 2007.
78. NUNES, Marcio Roberto Teixeira et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 2015.

79. PANDA, Debasis et al. Genome-wide RNAi screen identifies SEC61A and VCP as conserved regulators of Sindbis virus entry. **Cell reports**, v. 5, n. 6, p. 1737-1748, 2013.
80. PARK, Hyo Jin et al. PD-1 upregulated on regulatory T cells during chronic virus infection enhances the suppression of CD8+ T cell immune response via the interaction with PD-L1 expressed on CD8+ T cells. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 12, p. 5841-5842, 2015.
81. PAROLA, Philippe et al. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 10, p. 1493, 2006.
82. PETITDEMANGE, Caroline; WAUQUIER, Nadia; VIEILLARD, Vincent. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 4, p. 846-855, 2015.
83. PÖLLINGER, Bernadette et al. Th17 Cells, Not IL-17 gd T Cells, Drive Arthritic Bone Destruction in Mice and Humans. 2011.
84. POO, Yee Suan et al. CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. **Journal of virology**, v. 88, n. 12, p. 6862-6872, 2014.
85. PORCHERAY, F. et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 142, n. 3, p. 481-489, 2005.
86. REDDY, Vijayalakshmi et al. Molecular mimicry between chikungunya virus and host components: a possible mechanism for the arthritic manifestations. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005238, 2017.
87. REID, Laurence E. et al. A single DNA response element can confer inducibility by both alpha-and gamma-interferons. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 3, p. 840-844, 1989.
88. ROBINSON, Marion C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955.
89. RODRÍGUEZ-MORALES, Alfonso J. et al. Prevalence of post-chikungunya infection chronic inflammatory arthritis: a systematic review and meta-analysis. **Arthritis care & research**, v. 68, n. 12, p. 1849-1858, 2016.
90. ROSE, Patrick P. et al. Natural resistance-associated macrophage protein is a cellular receptor for sindbis virus in both insect and mammalian hosts. **Cell host & microbe**, v. 10, n. 2, p. 97-104, 2011.

91. RULLI, Nestor E. et al. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute chikungunya virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1026-1030, 2011.
92. SAKAGUCHI, Shimon. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 455-458, 2000.
93. SATO, Kojiro et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 12, p. 2673-2682, 2006.
94. SCHILTE, Clémentine et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013.
95. SCHMALJOHN, Alan L.; MCCLAIN, David. Alphaviruses (togaviridae) and flaviviruses (flaviviridae). **Medical Microbiology. 4th edition**, 1996.
96. SCHWARTZ, Olivier; ALBERT, Matthew L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.
97. SEN, Ganes C. Viruses and interferons. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 255-281, 2001.
98. SIEGAL, Frederick P. et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. **Science**, v. 284, n. 5421, p. 1835-1837, 1999.
99. SILVA, Laurie A. et al. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017.
100. SOLIGNAT, Maxime et al. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183-197, 2009.
101. SOURISSEAU, Marion et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 6, p. e89, 2007.
102. STRAUSS, James H.; STRAUSS, Ellen G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491-562, 1994.
103. SUHRBIER, Andreas; JAFFAR-BANDJEE, Marie-Christine; GASQUE, Philippe. Arthritogenic alphaviruses—an overview. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 7, p. 420, 2012.
104. SUHRBIER, Andreas; LA LINN, May. Clinical and pathologic aspects of arthritis due to Ross River virus and other alphaviruses. **Current opinion in rheumatology**, v. 16, n. 4, p. 374-379, 2004.
105. TANEJA, Veena. Cytokines pre-determined by genetic factors are involved in pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 216-221, 2015.

106. TAPPE, Dennis et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical microbiology and immunology**, v. 205, n. 3, p. 269-273, 2016.
107. TENG, Terk-Shin et al. Viperin restricts chikungunya virus replication and pathology. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 12, p. 4447-4460, 2012.
108. TEO, Teck-Hui 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**, v. 89, n. 15, p. 7955-7969, 2015.
109. THEILER, Max et al. The arthropod-borne viruses of vertebrates. An account of the Rockefeller Foundation virus program, 1951-1970. **The arthropod-borne viruses of vertebrates. An account of The Rockefeller Foundation Virus Program, 1951-1970.**, 1973.
110. THIBERVILLE, Simon-Djamel et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral research**, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.
111. TIAN, Henghe; CRONSTEIN, Bruce N. Understanding the mechanisms of action of methotrexate. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, v. 65, n. 3, p. 168-173, 2007.
112. TIAN, Yuan et al. IL-10 regulates memory T cell development and the balance between Th1 and follicular Th cell responses during an acute viral infection. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 4, p. 1308-1321, 2016.
113. TRENTHAM, David E.; TOWNES, Alexander S.; KANG, Andrew H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. **The Journal of experimental medicine**, v. 146, n. 3, p. 857-868, 1977.
114. WANG, Li et al. Gene expression and antiviral activity of interleukin-35 in response to influenza A virus infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 32, p. 16863-16876, 2016.
115. WANG, Yang et al. CD8+ T Cells Mediate Recovery and Immunopathology in West Nile Virus Encephalitis. **Journal of virology**, v. 77, n. 24, p. 13323-13334, 2003.
116. WAUQUIER, Nadia et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115-123, 2011.
117. WEAVER, Scott C.; LECUIT, Marc. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231-1239, 2015.
118. WESTON, Stuart et al. Alphavirus restriction by IFITM proteins. **Traffic**, v. 17, n. 9, p. 997-1013, 2016.

119. YIN, Geng et al. Lipid peroxidation-mediated inflammation promotes cell apoptosis through activation of NF- κ B pathway in rheumatoid arthritis synovial cells. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.
120. ZHANG, Rong et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature**, v. 557, n. 7706, p. 570-574, 2018.