

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

**Investigação de marcadores moleculares sanguíneos durante a infecção pelo  
vírus Chikungunya**

Alysson Henrique Urbanski

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências  
Orientador: Professor Doutor Helder Takashi Imoto Nakaya

São Paulo  
2023

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia

**Investigação de marcadores moleculares sanguíneos durante a infecção pelo  
vírus Chikungunya**

Alysson Henrique Urbanski  
Versão Original

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências  
Orientador: Professor Doutor Helder Takashi Imoto Nakaya

São Paulo  
2023

Autorizo a reprodução e 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 elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

U72i Urbanski, Alysson Henrique  
Investigação de marcadores moleculares sanguíneos durante a infecção pelo vírus Chikungunya / Alysson Henrique Urbanski. - São Paulo, 2023.  
84 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.  
Departamento de Farmácia.  
Orientador: Nakaya, Helder Takashi Imoto

1. Vírus Chikungunya. 2. Osteoclastos. 3. Repertório Imunológico. 4. Transcrição Gênica . 5. Artrite. I. T. II. Nakaya, Helder Takashi Imoto, orientador.

Alysson Henrique Urbanski

**Investigação de marcadores moleculares sanguíneos durante a infecção pelo  
vírus Chikungunya**

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Prof. Dr. Helder Takashi Imoto Nakaya  
**Orientador/presidente**

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

---

4º examinador

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Dr. Helder Takashi Imoto Nakaya pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação. Foram anos de muito aprendizado através de conversas, direcionamentos e exemplos. Tenho como meta ser, ao menos, uma fração do cientista que é, tendo a certeza de que já será um grande feito.

Agradeço ao Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira que, muito solícitamente me auxiliou em diversas situações, e de quem também pude absorver muito através do exemplo de orientação e docência.

Agradeço e presto homenagem à Prof. Dra. Maria Berenice Reynaud Steffens, que me orientou no mestrado e nos deixou precocemente. Um grande exemplo de pessoa e profissional. Amava o que fazia e isso transparecia na sua forma de lidar com as pessoas ao redor, sempre com muito carinho, paciência e dedicação.

Aos que também me orientaram em muitos momentos e pelos quais tenho grande admiração e carinho, meu muito obrigado: Andre Guilherme Costa-Martins, Viviane Schuch, André Nicolau Aquime Gonçalves, Ana Paula do Nascimento e Thomaz Luscher Dias.

Agradeço a todos os amigos que fiz no CSBL, vocês me ensinaram e me ajudaram em muito do que sei hoje. Sem vocês o caminho seria mais difícil e também sem graça. Com a certeza de que deixarei muitas pessoas importantes e valiosas de fora, gostaria de citar, sem nenhuma ordem específica, especialmente aqueles com quem tive maior convivência: Natália Cruz (que pavimentou o caminho para este trabalho), Thiago Hirata, Jeevan Giddaluru, Patrícia Gonzalez-Dias, Vanessa Maso, Amanda Vasconcelos, Juan Carlo, Tiago Lubiana, Rodrigo Ogava, Lucas Fleig, Bruna Garbes, Mariana Pereira, Jefferson Leandro, Mindy Muñoz, Rachel Creighton, Denev Araújo, Edson Oliveira, Felipe ten Caten e Diógenes Lima, do qual sempre sentiremos saudade.

Agradeço a Universidade de São Paulo, a Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. A todos os professores, alunos e servidores com os quais tive o prazer de aprender, compartilhar e conviver durante esses anos. Em especial a Elaine Midori, que me auxiliou em muitos momentos.

Agradeço aos membros avaliadores da banca, por terem aceitado o convite e doado seu tempo, atenção e conhecimentos para contribuir com a finalização deste trabalho.

Agradeço a CAPES por viabilizar financeiramente a realização deste projeto: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço a outros bons amigos que fiz em São Paulo e que tornaram esse período mais alegre: Ícaro, Victor, Pedro, Jennifer, Cleiton, Paulo, Rodrigo, Guilherme e Bárbara. Obrigado pela convivência e experiências trocadas.

Agradeço aos fiéis amigos de longa data: Daiana, Gisiane, Adam, Fernanda e Gillize. Muito do que sou hoje vem de vocês. Espero que Daiana e Gisiane possam finalmente superar o episódio de entomologia, vocês são melhores do que isso.

Por último e mais importante, agradeço a minha família. Meus pais: Kathia, Lindolfo e José. Vocês são a base de quem sou e nada disso seria possível sem vocês. Eu nunca poderei retribuir tudo o que já fizeram por mim. Minha eterna e infinita gratidão.

*It is not faith if you use your eyes*

Miracle - Paramore

Urbanski, A. H. **Investigação de marcadores moleculares sanguíneos durante a infecção pelo vírus Chikungunya**. 2023. 84f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

## **RESUMO**

A febre Chikungunya (CHIKF) é uma infecção viral causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV). Os sintomas agudos incluem febre alta de início súbito, erupção cutânea, poliartrite e poliartralgia. Embora a infecção geralmente seja resolvida em menos de duas semanas, muitos pacientes experenciam recorrente dor e inflamação nas articulações, que podem persistir por anos. Esse estudo buscou marcadores moleculares no sangue de infectados pelo CHIKV que estejam associados a dor articular e cronicidade da CHIKF. O sequenciamento de receptores de células B (BCR) e T (TCR) demonstrou que a infecção por CHIKV diminui a diversidade desses receptores. Essa diversidade é ainda menor, durante a fase aguda da infecção, naqueles pacientes que irão desenvolver cronicidade. A menor diversidade de BCR em infectados está associada a um aumento na expressão de genes envolvidos na diferenciação e ativação de osteoclastos pela sinalização RANK/RANKL. Em adição, a cronicidade pode estar relacionada um aumento na expressão do gene ZBTB7A – cuja expressão confere maior resistência a apoptose em precursores de osteoclastos – naqueles pacientes que vão se tornar crônicos. Caso o envolvimento dos osteoclastos durante a patogênese de CHIKF seja confirmado, os pacientes poderão se beneficiar de abordagens terapêuticas já existentes como alternativas adicionais ao tratamento de CHIKF.

**Palavras-chave:** Chikungunya. Osteoclastos. Repertório Imunológico. Transcriptoma. Artrite.



Urbanski, A. H. **Investigation of blood molecular markers during Chikungunya virus infection.** 2023. 84f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

### **ABSTRACT**

Chikungunya fever (CHIKF) is a viral infection caused by the Chikungunya virus (CHIKV). Acute symptoms include sudden-onset high fever, rash, polyarthrititis, and polyarthralgia. Although the infection usually resolves within two weeks, many patients experience recurrent joint pain and inflammation, which can persist for years. This study sought molecular markers in the blood of CHIKV-infected individuals that are associated with joint pain and chronicity of CHIKF. Sequencing of B (BCR) and T (TCR) cell receptors demonstrated that CHIKV infection decreases the diversity of these receptors. The diversity is even lower, during the acute phase of the infection, in those patients who will develop chronicity. The lower diversity of BCR in infected individuals is associated with an increase in the expression of genes involved in the differentiation and activation of osteoclasts by RANK/RANKL signaling. In addition, chronicity may be related to an increase in the expression of the ZBTB7A gene – whose expression confers greater resistance to apoptosis in osteoclast precursors – in those patients who will become chronic. If osteoclast role during CHIKF pathogenesis is confirmed, patients may benefit from existing therapeutic approaches as additional alternatives to CHIKF treatment.

**Key-words:** Chikungunya. Osteoclasts. Immune Repertoire. Transcriptome. Arthritis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura de um Alphavirus .....	14
Figura 2 – Organização genômica do CHIKV.....	15
Figura 3 – Países com transmissão autóctone do vírus Chikungunya .....	17
Figura 4 – Curva epidêmica dos casos prováveis de Chikungunya no Brasil .....	18
Figura 5 – Taxa de incidência de Chikungunya por município no Brasil .....	19
Figura 6 – Transmissão do vírus Chikungunya .....	20
Figura 7 – Vias de resposta intracelulares do sistema imune inato em resposta ao CHIKV .....	27
Figura 8 – Resposta humoral a infecção pelo vírus Chikungunya.....	28
Figura 9 – Estrutura representativa dos receptores de células B e T.....	32
Figura 10 – Resumo dos métodos utilizados neste trabalho .....	37
Figura 11 – Resumo dos conjuntos de dados e grupos analisados .....	38
Figura 12 – Resumo da diversidade estimada de CDR3 nos conjuntos de dados....	42
Figura 13 – Diversidade CDR3 é menor em infectados pelo vírus Chikungunya .....	43
Figura 14 – Diversidade CDR3 é menor durante a fase aguda da infecção pelo vírus Chikungunya nos pacientes que irão desenvolver cronicidade .....	43
Figura 15 – Diversidade CDR3 de células T é menor em infectados pelo vírus da Dengue.....	44
Figura 16 – Resumo da abundância celular nos conjuntos de dados .....	45
Figura 17 – Alterações nas abundâncias celulares na infecção pelo vírus Chikungunya .....	46
Figura 18 – Abundâncias celulares em infectados pelo vírus Chikungunya durante a fase aguda não diferem entre quem desenvolve ou não cronicidade .....	46
Figura 19 – Alterações nas abundâncias celulares na infecção pelo vírus da Dengue .....	47
Figura 20 – Correlação entre diversidade CDR3 e abundância celular.....	50
Figura 21 – Enriquecimento funcional da correlação entre expressão gênica e diversidade CDR3 .....	51
Figura 22 – Expressão de WNT5A aumentada e de WNT16 diminuída favorecem a osteoclastogênese em infectados pelo vírus Chikungunya.....	53
Figura 23 – Os genes das vias de sinalização por RANK/RANKL são regulados positivamente na infecção por CHIKV .....	54
Figura 24 – A expressão de ZBTB7A diminui a apoptose em células osteoclásticas e está aumentada durante a fase aguda em pacientes infectados por CHIKV que irão desenvolver cronicidade.....	56
Figura 25 – Hipótese da participação de osteoclastos e seus precursores na infecção pelo vírus Chikungunya .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	-	aminoácidos
BCR	-	receptor de célula B
CDR	-	região determinantes de complementariedade
CHIKF	-	febre Chikungunya
CHIKV	-	vírus Chikungunya
COVID-19	-	doença por coronavírus 2019
CP	-	capsídeo
DENV	-	Dengue virus
ECSA	-	Leste-Centro-Sul Africana
ELISA	-	ensaio de imunoabsorção enzimática
FC	-	fold-change
HLA	-	antígeno leucocitário humano
HTS	-	sequenciamento de alto rendimento
MAPK	-	MAP quinase
M-CSF	-	fator de estimulação de colônia de macrófagos
ME	-	membrana externa
MHC	-	complexo principal de histocompatibilidade
MI	-	membrana interna
NC	-	nucleocapsídeo
NES	-	escore de enriquecimento normalizado
NK	-	células natural killer
NKT	-	células T natural killer
NSP	-	proteína não-estrutural
OPG	-	osteoprotegerina
ORF	-	fases de leitura aberta
RANK	-	receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	-	ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RNA	-	ácido ribonucleico
RNA-seq	-	sequenciamento de ácido ribonucleico

RRV	-	Ross River virus
RT-PCR	-	transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SE	-	semana epidemiológica
TCR	-	receptor de célula T
TF	-	transframe
TLR	-	receptor do tipo Toll

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 VÍRUS DA FAMÍLIA <i>TOGAVIRIDAE</i> .....	13
1.2 O GÊNERO <i>ALPHAVIRUS</i> .....	13
1.3 VÍRUS CHIKUNGUNYA .....	14
1.3.1 Organização genômica.....	14
1.3.2 Histórico e epidemiologia .....	16
1.3.3 Ciclos de transmissão .....	19
1.3.4 Manifestações clínicas .....	21
1.3.5 Fase aguda .....	21
1.3.6 Fase subaguda.....	22
1.3.7 Fase crônica.....	22
1.3.8 Manifestações atípicas .....	23
1.3.9 Diagnóstico.....	23
1.3.10 Prevenção e tratamento.....	24
1.3.11 Patogênese.....	25
1.4 REPERTÓRIO IMUNOLÓGICO .....	30
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL .....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1 CONJUNTOS DE DADOS E PACIENTES INCLUÍDOS .....	37
3.2 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS .....	38
3.3 SEQUENCIAMENTO DOS RECEPTORES DE CÉLULAS B E T .....	39
3.4 ANÁLISE DE DIVERSIDADE CDR3 .....	39
3.5 ANÁLISE DE ABUNDÂNCIA CELULAR .....	39
3.6 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES .....	40
3.7 CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO GÊNICA E DIVERSIDADE DE BCR E TCR COM ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DE GENES .....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
4.1 DIVERSIDADE CDR3 DE RECEPTORES DE CÉLULAS B E CÉLULAS T .....	42
4.2 ABUNDÂNCIA CELULAR.....	44
4.3 CORRELAÇÃO ENTRE DIVERSIDADE E ABUNDÂNCIA CELULAR .....	49
4.4 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DE GENES.....	51
4.5 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NA INFECÇÃO POR CHIKV.....	52
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Vírus da família *Togaviridae*

Os vírus pertencentes à família *Togaviridae* são vírus envelopados de RNA de fita simples positiva e possuem formato esférico. São divididos em dois gêneros: *Alphavirus* e *Rubivirus*. Enquanto o gênero *Rubivirus* possui apenas um membro, o *Rubella virus*, o gênero *Alphavirus* é atualmente composto por 32 vírus (SCHOCH *et al.*, 2020). O *Rubella virus* é causador da rubéola, uma doença infectocontagiosa que atinge principalmente crianças, mas para a qual já há uma vacina efetiva disponível. Os *Alphavirus* são causadores de uma gama de doenças humanas e animais, sendo transmitidos, principalmente, por artrópodes (RICHARD J. KUHN, 2013).

### 1.2 O gênero *Alphavirus*

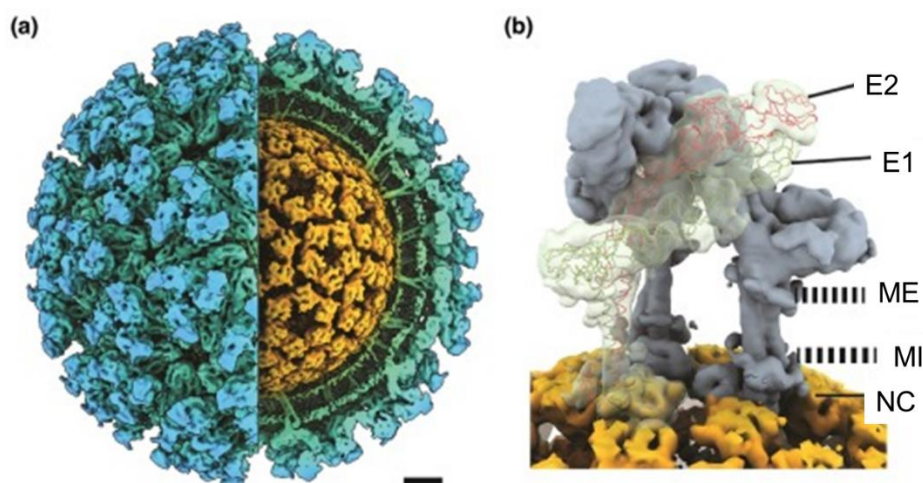
Os vírus do gênero *Alphavirus* tem seu ciclo natural entre vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados. Os vetores da maioria dos *Alphavirus* são os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que também são vetores de outros arbovírus (*arthropod-borne viruses*, vírus com vetores artrópodes) como o *Dengue virus* (KRAEMER *et al.*, 2015). Há casos, porém, em que piolhos e ácaros atuam como vetores, como no *Southern elephant seal virus*. Os hospedeiros costumam ser mamíferos e aves, mas peixes também são hospedeiros aquáticos, como acontece com o *Salmon pancreas disease virus* (GRIFFIN, 2013).

Embora muitos dos *Alphavirus* não estejam relacionados a nenhuma doença humana ou animal conhecida, alguns estão divididos em dois grupos, baseando-se nos sinais e sintomas das patologias causadas: os artritogênicos e os neuroinvasivos. Infecções por *Alphavirus* artritogênicos em humanos, como o *Chikungunya virus* (CHIKV) e o *Ross River virus* (RRV), costumam ser caracterizados por febre, erupção cutânea e poliartrite. Enquanto infecções causadas pelos vírus neuroinvasivos, como o *Venezuelan equine encephalitis virus* e o *Eastern equine encephalitis virus* têm potencial de causar encefalite em mamíferos (BUTTON *et al.*, 2020).

O genoma dos *Alphavirus* codifica, ao total, dez proteínas: quatro não-estruturais e seis estruturais. As proteínas estruturais são o capsídeo (CP), E1, E2, E3, 6K e transframe (TF), contudo nem todas precisam ser incorporadas ao vírion para este ser

infeccioso. Estruturalmente, os vírions possuem entre 60 e 70 nm de diâmetro. O RNA viral é envolto pelo capsídeo e esse núcleo é, por sua vez, envolto por uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro contendo as glicoproteínas E1 e E2, codificadas pelo genoma viral. Essas glicoproteínas são organizadas em heterodímeros de E1 e E2 (Figura 1). Cada pico de glicoproteínas, chamadas de peplômeros (ou *spikes*), porção que se liga aos receptores celulares dos hospedeiros mediando penetração viral na célula, é composto por trímeros de heterodímeros E1-E2 (BUTTON *et al.*, 2020; GRIFFIN, 2013).

Figura 1 – Estrutura de um *Alphavirus*



(a) Os vírions possuem três camadas: as glicoproteínas, que formam os *spikes* (em azul), que estão envoltas numa bicamada lipídica (verde) e o nucleocapsídeo (laranja). (b) cada *spike* é um trímero de heterodímeros E1/E2. Estão ilustrados dois heterodímeros em cinza e um terceiro com representação atômica. ME: membrana externa. MI: membrana interna. NC: nucleocapsídeo. Fonte: adaptado de Button *et al.*, 2020.

### 1.3 Vírus Chikungunya

#### 1.3.1 Organização genômica

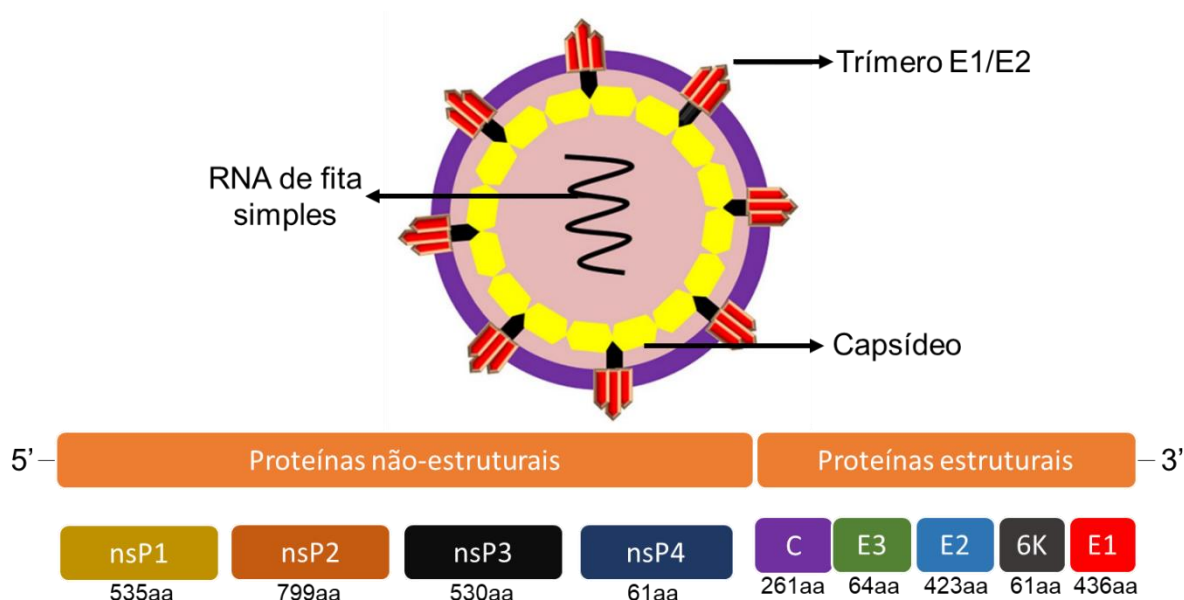
Como outros *Alphavirus*, o CHIKV é um vírus envelopado de RNA de fita simples positiva com formato esférico e 70 nm de diâmetro (SIMIZU *et al.*, 1984). Seu primeiro genoma completo foi descrito em 2002, revelando uma extensão de 11.805 nucleotídeos organizados em duas fases de leitura abertas (ORFs, *open reading frames*) que são posteriormente processadas em proteínas virais individuais (KHAN *et al.*, 2002). A ORF na região 5'-terminal codifica uma poliproteína com cerca de 2.450 aminoácidos (aa) que dá origem às proteínas não-estruturais (NSPs, *nonstructural*

*proteins*), enquanto a ORF localizada na região 3'-terminal codifica uma poliproteína (~1.250 aa) que dá origem às proteínas estruturais (HUANG *et al.*, 2017).

Mais de 50 genomas completos de CHIKV já foram descritos e proteção cruzada já foi observada entre a linhagem ECSA (*East/Central/South African*) e a Asiática. Apesar disso, o tamanho do genoma pode variar, com a linhagem ECSA sendo menor em comprimento que a Asiática ou as Oeste-Africanas (MANZOOR *et al.*, 2022).

São quatro as NSPs presentes no genoma do CHIKV: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. As proteínas estruturais são cinco: capsídeo (C), E1, E2, E3 e 6K/TF (MANZOOR *et al.*, 2022). Um resumo da função dessas proteínas e a organização do genoma estão na tabela 1 e figura 2, respectivamente.

Figura 2 – Organização genômica do CHIKV



O vírus Chikungunya possui um genoma de RNA de fita simples que codifica proteínas estruturais e não-estruturais. O comprimento em aminoácidos (aa) de cada proteína está indicado. Fonte: Adaptado de Manzoor *et al.*, 2022.



Tabela 1 – Proteínas estruturais e não-estruturais do CHIKV

Proteína	Abreviação	Tamanho (aa)	Função
<b>Capsídeo</b>	C	261	Formação do nucleocapsídeo e interação com o RNA para envolver o genoma.
<b>Envelope 1</b>	E1	436	Regula eventos pré- e pós-fusão do ciclo replicativo.
<b>Envelope 2</b>	E2	423	Facilita a entrada do vírus nas células e é o principal alvo de neutralização por anticorpos. É a porção mais distal dos peplômeros ( <i>spike</i> ) e possui três domínios de imunoglobulina.
<b>Envelope 3</b>	E3	64	Regula a formação da região <i>spike</i> junto com E2.
<b>6K transframe</b>	6K/TF	61	Favorece a montagem e liberação do vírus.
<b>nsP1</b>	nsp1	535	Metilação do RNA genômico viral recém-incorporado.
<b>nsP2</b>	nsp2	799	Helicase e cisteína protease viral (importante para o processamento da poliproteína de NSPs)
<b>nsP3</b>	nsp3	530	Sem função enzimática definida durante a replicação viral
<b>nsP4</b>	nsp4	61	RNA-polimerase viral

Fonte: Adaptado de Manzoor *et al.*, (2022).

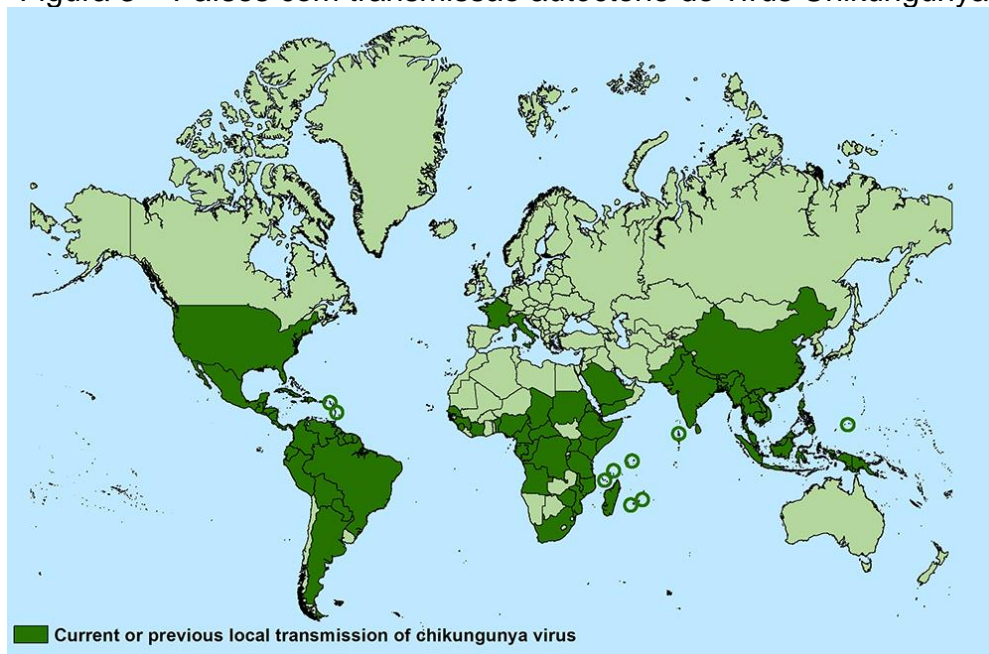
### 1.3.2 Histórico e epidemiologia

O CHIKV é o agente etiológico da febre de Chikungunya (CHIKF) e foi inicialmente isolado de pacientes infectados durante a primeira epidemia descrita, em Tanganyika, hoje território da Tanzânia, entre 1952-1953. Inicialmente, a doença foi confundida com a causada pelo *Dengue virus* (DENV), pela semelhança dos quadros clínicos. Porém, em razão da severidade das dores articulares, foi chamada de chikungunya – “aquele que se dobra” – no idioma local (MASON; HADDOW, 1957; ROBINSON, 1955).

Nas décadas seguintes, surtos ocasionais e isolados aconteceram na África e na Ásia. Até que em 2004, um grande surto se iniciou no Quênia e se expandiu pelas regiões vizinhas, no Oceano Índico (MANZOOR *et al.*, 2022). Entre 2005 e 2006, estima-se que um terço da população da Ilha de Reunião (população total de 770 mil habitantes) foi infectado por CHIKV, com 213 mortes reportadas (JOSSERAN *et al.*, 2006). Em seguida, no final de 2005, a epidemia se espalhou até a Índia, onde estimativas contam cerca de um milhão e quinhentos mil infectados durante o surto (MANIMUNDA *et al.*, 2010b).

Todos os continentes já reportaram transmissão autóctone do CHIKV, com exceção da Antártica (Figura 3) (CDC, 2022). Em 2007, o primeiro caso de transmissão autóctone foi identificado na Europa, com um surto na região italiana de Romanha que infectou 248 pessoas. O vírus foi importado por um morador da região que visitou a Índia e retornou durante a fase assintomática da infecção. Em adição, a grande população de *A. albopictus* da região italiana contribuiu para a transmissão local do CHIKV (SAMBRI *et al.*, 2008).

Figura 3 – Países com transmissão autóctone do vírus Chikungunya



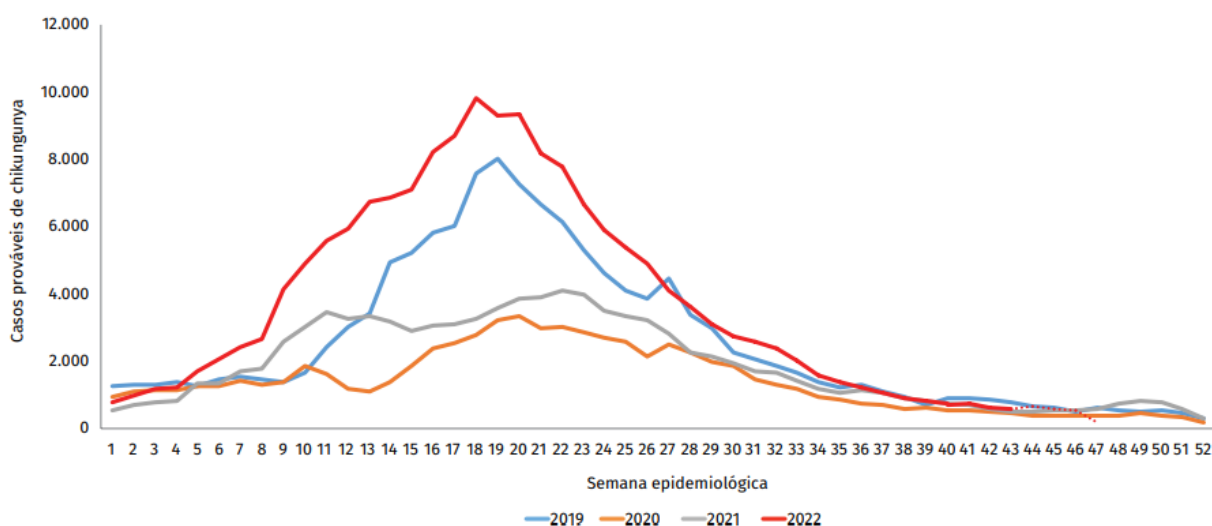
Fonte: CDC, 2022.

Nas Américas, a primeira transmissão autóctone do CHIKV foi documentada em 2013, na Ilha de São Martinho, com menos de 30 infectados reportados (CASSADOU *et al.*, 2014). A partir da América Central, o vírus se espalhou para a América do Sul

e América do Norte, com quase três milhões de casos suspeitos e 296 mortes em dezenas de países das Américas até 2016 (YACTAYO *et al.*, 2016).

No Brasil, o primeiro caso reportado de CHIKV foi de um paciente de 41 anos, nativo do Rio de Janeiro, que retornou de uma viagem à Indonésia em agosto de 2010 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). A transmissão autóctone no país foi identificada quatro anos depois, em 13 de setembro de 2014, em Oiapoque, estado do Amapá. Uma semana depois, casos autóctones também foram confirmados na Bahia. Até 18 de outubro de 2014, pouco mais de um mês depois da confirmação da transmissão autóctone no país, foram notificados 682 casos autóctones (NUNES *et al.*, 2015). Em 2022, até a semana epidemiológica 47 (28 de novembro), ocorreram 170.199 casos prováveis de CHIKF no Brasil, o que representa uma taxa de incidência de 79,8 casos por 100 mil habitantes. Esses números representam um aumento de 80,4% de casos comparando com o ano anterior até a respectiva semana. Considerando que 2020 e 2021 foram anos atípicos, por conta da pandemia da doença por coronavírus 2019 (COVID-19, *coronavirus disease 2019*), onde as notificações de CHIKF foram inferiores à média histórica, é importante notar que o número de casos notificados em 2022 também é maior do que os de 2019 (pré-pandemia COVID-19) (Figura 4).

Figura 4 – Curva epidêmica dos casos prováveis de Chikungunya no Brasil

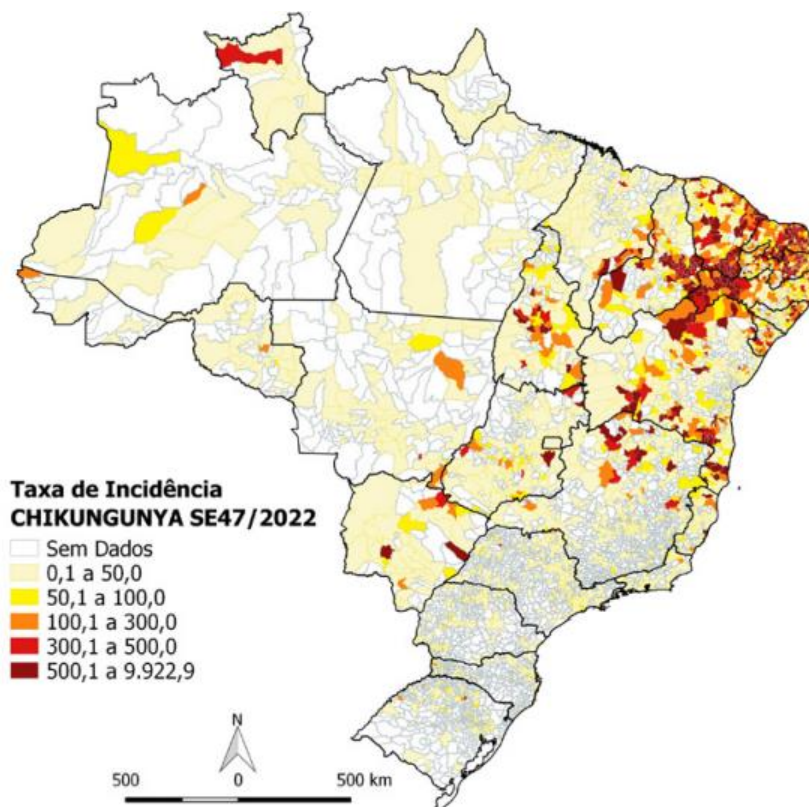


Fonte: Ministério da Saúde, 2022.

A distribuição desses casos em território nacional é bastante desbalanceada (Figura 5), com a Região Nordeste apresentando a maior incidência de forma isolada (256,2 casos/100 mil hab.), seguida pelas regiões Centro-Oeste (36,1 casos/100 mil

hab.), Norte (26 casos/100 mil hab.), Sudeste (12,1 casos/100 mil hab.) e Sul (2,3 casos/100 mil hab.). Até o fim da semana epidemiológica 47, foram confirmados 85 óbitos para CHIKF no Brasil, com 20 ainda em investigação (SAÚDE, 2022).

Figura 5 – Taxa de incidência de Chikungunya por município no Brasil



Dados referentes ao período entre a semana epidemiológica 1 e 47. SE: Semana epidemiológica. Fonte: Ministério da Saúde, 2022.

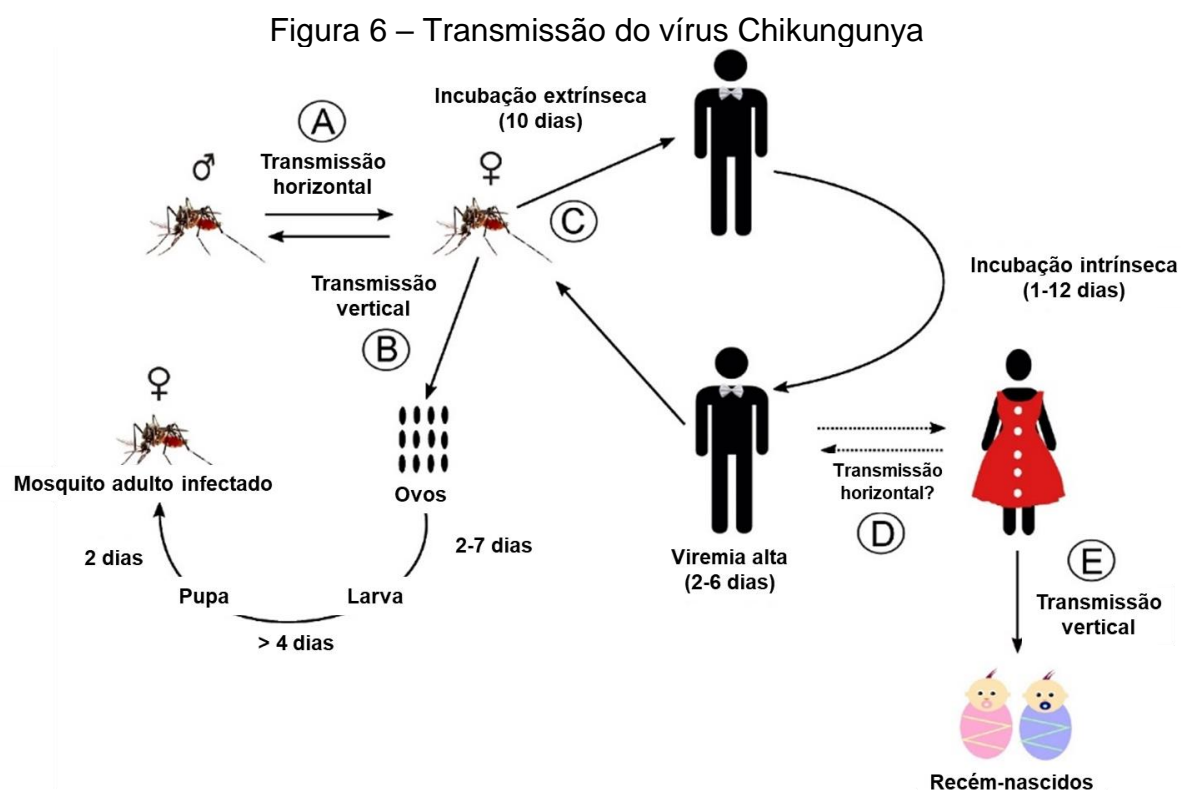
### 1.3.3 Ciclos de transmissão

O CHIKV possui dois ciclos de transmissão: silvestre e urbano. É provável que o ciclo silvestre, principalmente na África, envolva diversos mosquitos *Aedes* como vetores (*A. camptorhynchites*, *A. dalzieli*, *A. fulgens*, *A. furcifer*, *A. luteocephalus*, *A. vigilax* e *A. vittatus*), além de diversos primatas não-humanos como possíveis reservatórios e amplificadores do vírus (SILVA *et al.*, 2018).

No ciclo urbano, os vetores são *A. aegypti* e *A. albopictus* e humanos são os hospedeiros de amplificação, numa transmissão humano-mosquito-humano. O *A. aegypti* também é o principal vetor de outras arboviroses, como *Dengue virus* (DENV) e *Zika virus* (ZIKV), e eventos de infecção concomitante já foram observados, sem impactar a competência do mosquito como vetor (CARRILLO-HERNÁNDEZ *et al.*,

2018; GÖERTZ *et al.*, 2017; LE COUPANEC *et al.*, 2017). O comportamento do *A. aegypti*, em especial, favorece o ciclo epidêmico urbano do CHIKV. As fêmeas adultas desta espécie preferem se alimentar de humanos, procurando por sangue diversas vezes durante um único ciclo gonotrófico (período entre o repasto sanguíneo e a oviposição). Além disso, a oviposição pode ocorrer em qualquer recipiente com água parada, permitindo que os mosquitos vivam em proximidade constante com humanos (CAGLIOTI *et al.*, 2013).

A transmissão vertical e horizontal do CHIKV entre mosquitos *Aedes* também é um importante fator para a persistência viral na população desses vetores. *A. aegypti* machos podem infectar suas parceiras durante o acasalamento e as fêmeas infectadas, por essa via ou durante o repasto sanguíneo, podem produzir ovos de onde mosquitos infectados irão nascer (Figura 6) (MAVALE *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2018).



(A) Transmissão horizontal entre vetores. (B) Transmissão vertical entre vetores. (C) Transmissão para humanos. (D) Transmissão horizontal entre humanos, potencial, porém ainda não reportada. (E) Transmissão vertical entre humanos. Fonte: Adaptado de Silva *et al.*, 2018.

Após a aquisição do CHIKV pelo *A. aegypti*, acontece o período de incubação extrínseca, que dura em média dez dias. Esse tempo é necessário para a replicação viral nas glândulas salivares do mosquito, a ponto deste ser capaz de infectar um potencial hospedeiro durante o repasto sanguíneo (LIM *et al.*, 2018). A incubação intrínseca ocorre nos hospedeiros humanos com duração entre um e doze dias. O período de viremia pode perdurar por até dez dias, geralmente iniciando dois dias antes do aparecimento dos sintomas (Figura 6) (SAÚDE, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

A transmissão vertical de CHIKV de mãe para filho é relativamente rara, sendo reportada pela primeira vez na epidemia da Ilha de Reunião em 2005, e a maioria dos casos acontece quando a mãe é infectada poucos dias antes do parto (FOELLER *et al.*, 2021; GÉRARDIN *et al.*, 2008). Há a possibilidade do CHIKV ser encontrado no leite materno de mulheres infectadas, porém não há evidências que sustentem a transmissão por essa via (CAMPOS *et al.*, 2017). Por fim, apesar do CHIKV ter sido encontrado no sêmen de pacientes até 56 dias após o início dos sintomas, indicando potencial para a transmissão durante o ato sexual, não há evidências que confirmem a transmissão horizontal entre humanos (Figura 6) (BANDEIRA *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2022).

#### **1.3.4 Manifestações clínicas**

Há três diferentes fases da CHIKF que podem afetar um indivíduo infectado pelo CHIKV: aguda, subaguda e crônica (MANZOOR *et al.*, 2022). A taxa de letalidade observada no Brasil é menor que 0,15%, mas esse número pode ser maior que 10% em populações com comorbidades como diabetes e problemas cardíacos (MOURAD; MAKHANI; CHEN, 2022; VIDAL *et al.*, 2022).

#### **1.3.5 Fase aguda**

A fase aguda, ou febril, tem duração média de sete dias, podendo persistir por até três semanas. Os primeiros sinais e sintomas começam a aparecer após o período de incubação intrínseca (que dura de um a doze dias), embora algumas pessoas apresentem infecções assintomáticas. Os principais sinais e sintomas da fase aguda são: febre de início súbito (maior que 38°C) com duração média de 2-3 dias, dor poliarticular (poliartralgia) intensa em mais de 90% dos casos (podendo apresentar

edema), exantema (ou *rash* cutâneo) em mais da metade dos casos, mialgia, cefaleia e fadiga (MANZOOR *et al.*, 2022; SAÚDE, 2017). Outros sinais e sintomas como náusea, vômitos, diarreia e dor abdominal aparecem com frequência inferior a 50% durante a fase aguda (THIBERVILLE *et al.*, 2013b). Durante essa fase, a carga viral no sangue dos infectados pode chegar de  $10^5$  a  $10^9$  cópias de RNA viral/mL e está correlacionada com a presença e gravidade das manifestações clínicas (APPASSAKIJ *et al.*, 2013; CHOW *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2018).

### **1.3.6 Fase subaguda**

Na fase subaguda, a febre tende a desaparecer e o quadro de poliartralgia pode persistir ou se agravar, assim como o exantema. Com a persistência do edema é comum o desenvolvimento de tenossinovite, sendo muito comum o desenvolvimento de síndrome do túnel do carpo como consequência. Alguns pacientes desenvolvem doenças vasculares periféricas, neuropatias e distúrbios neuropsiquiátricos. Se esses sinais e sintomas persistirem por mais de três meses, está instalada a fase crônica da CHIKF (MARTÍ-CARVAJAL *et al.*, 2017; SAÚDE, 2017).

### **1.3.7 Fase crônica**

A principal característica da fase crônica da CHIKF é a poliartralgia e/ou poliartrite, que acomete tanto articulações menores (falanges e punhos) como maiores (calcanhares, joelhos e ombros, por exemplo) (HOARAU *et al.*, 2010) e a proporção de pacientes que progride para a fase crônica depende muito da população observada. Uma revisão sistemática realizada por van Aalst *et al.* listou estudos que reportaram artrite e/ou artralgia depois da fase aguda e a prevalência variou de 5% a 78% (VAN AALST *et al.*, 2017).

Os sinais e sintomas da fase crônica podem ser intermitentes e durar poucos meses ou até mesmo décadas (MANZOOR *et al.*, 2022). Nessa fase, os pacientes também podem apresentar fadiga crônica, depressão e problemas de mobilidade, impactando por longos períodos a saúde física e mental destes (RAMACHANDRAN *et al.*, 2014; SCHILTE *et al.*, 2013). Ademais, a cronicidade parece estar relacionada ao sexo (mais frequente no sexo feminino) idade e quadros pré-existentes no paciente, como hipertensão e diabetes mellitus (SAÚDE, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

### 1.3.8 Manifestações atípicas

A infecção por CHIKV pode apresentar outras manifestações atípicas que podem aumentar a morbidade e letalidade da doença (Tabela 2).

Tabela 2 – Manifestações atípicas da Febra Chikungunya

Sistema/órgão/contexto	Manifestações
Nervoso	Perda de memória, vertigem, alucinação, encefalopatias, neuropatias e Síndrome de Guillain-Barré
Cardiovascular	Hipotensão, miocardite, pericardite, arritmias e infarto do miocárdio
Rins	Nefrite e insuficiência renal aguda
Pele	Erupção maculopapular, pigmentação, úlceras e dermatose bolhosa
Olhos	Visão turva, olhos vermelhos, neurite óptica, iridociclite, episclerite e retinite
Infecção neonatal (transmissão vertical)	Meningoencefalite, coagulação intravascular disseminada e morte fetal anteparto
Outros	Úlceras orais, alopecia, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, síndrome da secreção inadequada do hormônio antidiurético e insuficiência adrenal

Fonte: Adaptado de Deeba *et al.* (2019) e Rajapakse (2010).

### 1.3.9 Diagnóstico

As alterações nas variáveis de exames de sangue comuns de pacientes infectados por CHIKV não são específicas. Destacam-se a leucopenia e linfopenia como as mais frequentes, enquanto a trombocitopenia é rara. Em adição, os níveis da Proteína C-Reativa e a velocidade de hemossedimentação estão elevadas (SAÚDE, 2017).

Para o diagnóstico específico, existem três principais alternativas de exames: genético, virológico e serológico. No genético, o RNA viral pode ser amplificado por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) a partir do sangue dos pacientes, sobretudo na fase aguda. O método virológico consiste na identificação do CHIKV em amostras de sangue – total, plasma ou soro – pela



identificação dos antígenos virais pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*). Por fim, a identificação de anticorpos IgG e IgM específicos para CHIKV por ELISA consiste é a base dos testes serológicos (MANZOOR *et al.*, 2022).

### 1.3.10 Prevenção e tratamento

Como não existem vacinas protetivas contra o CHIKV, o principal método de prevenção ainda tem sido o controle dos vetores através de campanhas e intervenções públicas (MANZOOR *et al.*, 2022). Há oito diferentes vacinas para CHIKV em processo de testes clínicos que estão resumidas na tabela 3 (DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022).

Tabela 3 – Vacinas em desenvolvimento para Chikungunya

<b>Vacina</b>	<b>Tecnologia</b>	<b>Imunogênico</b>	<b>Fase</b>
<b>VLA1553</b>	Vírus atenuado	$\Delta$ 5nsP3	III
<b>BBV87</b>	Vírus inativado	Vírus integral	II e III
<b>VRC-CHKVLP059-00- VP/PXVX0317</b>	VLP	E1, E2, C	II e III
<b>MV-CHIK-202</b>	Vetorizado no vírus do sarampo	C, E3, E2, 6k, E1	II
<b>SI-GSD-218</b>	Vírus atenuado	Vírus integral	II
<b>VAL-181388</b>	mRNA	C, E3, E2, 6k, E1	I
<b>ChAdOx1- Chik</b>	Vetorizado em adenovírus	C, E3, E2, 6k, E1	I
<b>RNA-1944</b>	mLNP-mRNA	mRNA que codifica o anticorpo CHKV-24 IgG (monoclonal)	I

Adaptado de DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022

Também não há nenhum antiviral específico para combater a infecção por CHIKV disponível e, por isso, o tratamento é o de suporte sintomático da dor e febre, com prescrição adicional de repouso e hidratação (SAÚDE, 2017). Antes do diagnóstico confirmar a infecção por CHIKV, os pacientes devem ser tratados como

suspeita de dengue, evitando aspirina e anti-inflamatórios não-esteroidais, dado ao risco de sangramento e hemorragia nesses casos. Confirmada a infecção por CHIKV e não DENV, o tratamento pode incluir os anti-inflamatórios não-esteroidais, corticosteroides e fisioterapia, que podem auxiliar no alívio da artralgia persistente. Em casos de cronicidade, é comum a necessidade de acompanhamento por profissionais reumatologistas (MOURAD; MAKHANI; CHEN, 2022).

Anticorpos obtidos de pacientes convalescentes de CHIKF mostraram proteção contra a infecção por CHIKV em camundongos, com potencial profilático para a infecção *in vivo*, inclusive em neonatos, evitando a transmissão vertical (COUDERC *et al.*, 2009). Outros esforços têm sido realizados no sentido de encontrar tratamentos eficazes para a infecção por CHIKV. Apesar de demonstrar eficácia em estudos pilotos, o uso de difosfato de cloroquina para tratar a fase crônica da doença ainda é contestado e carece de resultados mais contundentes, sobretudo em primatas (BRIGHTON, 1984; DELOGU; DE LAMBALLERIE, 2011). Outros tratamentos farmacológicos que podem auxiliar em alguns casos de artralgia na fase crônica de CHIKF são imunossupressores, (como metotrexato), antivirais (ribavirina), hidroxicloroquina e colchicina. Mesmo assim, esses tratamentos não são bem estabelecidos e carecem de maior investigação quanto a sua eficácia (SALES *et al.*, 2018).

### **1.3.11 Patogênese**

Após a picada do mosquito as partículas virais são distribuídas, especialmente por fibroblastos e macrófagos, pela circulação linfática e corrente sanguínea, para os diversos tecidos alvos, que incluem a própria pele, tecido muscular, fígado, articulações e células do sistema imune (BAUTISTA-REYES *et al.*, 2017). A entrada do vírus nas células alvo é promovida por heterodímeros das glicoproteínas E1 e E2 que se organizam para a formação dos peplômeros (*spikes*) e a última também possui os principais determinantes antigênicos do CHIKV. A proteína E1 contém uma região hidrofóbica que facilita a fusão das membranas celulares e virais, enquanto a proteína E2 é responsável pela ligação a receptores celulares (VOSS *et al.*, 2010). Já foram identificados alguns receptores celulares de mamíferos para CHIKV, como proibirina (PHB), TIM-1, MXRA8, CD147, DC-SIGN, e FHL1, além da subunidade  $\beta$  da ATP sintase em mosquitos (DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022). Além da via clássica de

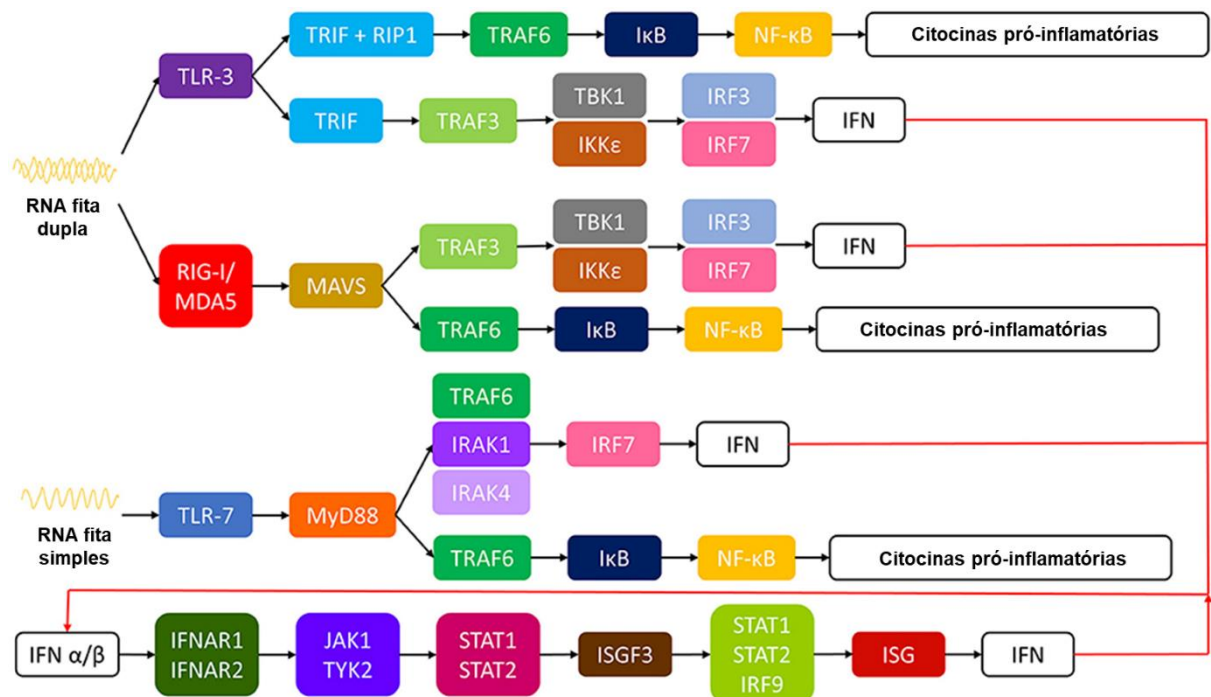
entrada celular por endocitose mediada por clatrina dos *Alphavirus* (KIELIAN; CHANEL-VOS; LIAO, 2010), o CHIKV também se mostrou apto a invadir células musculares por macropinocitose (LEE, CHING HUA; MOHAMED HUSSAIN; CHU, 2019). Ao mesmo tempo, a infecção por CHIKV induz apoptose por ambas as vias intrínseca e extrínseca, com o vírus permanecendo nos corpos apoptóticos e, dessa maneira, sendo capaz de infectar células vizinhas, como macrófagos. A infecção e replicação viral em macrófagos por essa via não suscita uma resposta pró-inflamatória, sendo um mecanismo que pode possibilitar uma via de fuga do vírus da resposta imune do hospedeiro (KREJBICH-TROTOT *et al.*, 2011). Em primatas não-humanos, os macrófagos são os principais reservatórios celulares durante a fase crônica da doença (LABADIE *et al.*, 2010). Ademais, macrófagos constituem as principais células infiltradas em tecidos infectados e altos níveis de MCP-1, principal agente quimiotático de macrófagos e monócitos, está correlacionado com altas cargas virais de CHIKV durante a fase aguda (RUIZ SILVA *et al.*, 2016). Além dos macrófagos, outros tipos celulares são suscetíveis a infecção por CHIKV, como fibroblastos, condrócitos, células endoteliais, monócitos, miócitos e osteoblastos (RUEDA *et al.*, 2022).

Durante a fase aguda, há um aumento na produção de citocinas séricas: IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CXCL10 e IFN- $\alpha$ . Esta última é detectada já no primeiro dia de infecção e está correlacionada com a carga viral. Já na fase crônica, é mais manifesto o aumento de IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ , com o enriquecimento de células T NK-like secretoras de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (DE LIMA CAVALCANTI *et al.*, 2022).

O mecanismo pelo qual o CHIKV inicia a resposta imune inata é similar ao de outros vírus de RNA: receptores de reconhecimento de padrão. O RNA de fita simples do CHIKV interage com o receptor do tipo Toll (TLR, *toll like receptor*) TLR-7, enquanto o RNA organizado em fita dupla induz resposta através do TLR-3, além do RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*) e MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*). Através das cascatas de sinalização iniciadas, são ativados o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e outros fatores reguladores de interferon (IRFs, *interferon regulator factors*) que tem como fim a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons (IFNs) (Figura 7) (RUEDA *et al.*, 2022). Com a produção de IFNs do tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) que se ligam a seus receptores IFNAR1 e IFNAR2, é ativada a sinalização pela via JAK/STAT que resulta na ativação do fator de transcrição ISGF3, que favorece a transcrição de

um conjunto de genes estimulados por interferons (ISGs, *interferons stimulated genes*). São os ISGs que codificam proteínas responsáveis pela atividade antiviral, imuno-estimulatória e antiproliferativas dessas citocinas (LEVY; MARIÉ; DURBIN, 2011). O CHIKV desenvolveu ao menos dois mecanismos para contornar essas respostas imunes inatas utilizando a proteína nsP2: ela é capaz de bloquear diretamente a sinalização mediada por JAK/STAT e induz a degradação da subunidade catalítica RpB1 da RNA polimerase II, bloqueando a expressão dos genes do hospedeiro (RUEDA *et al.*, 2022).

Figura 7 – Vias de resposta intracelulares do sistema imune inato em resposta ao CHIKV

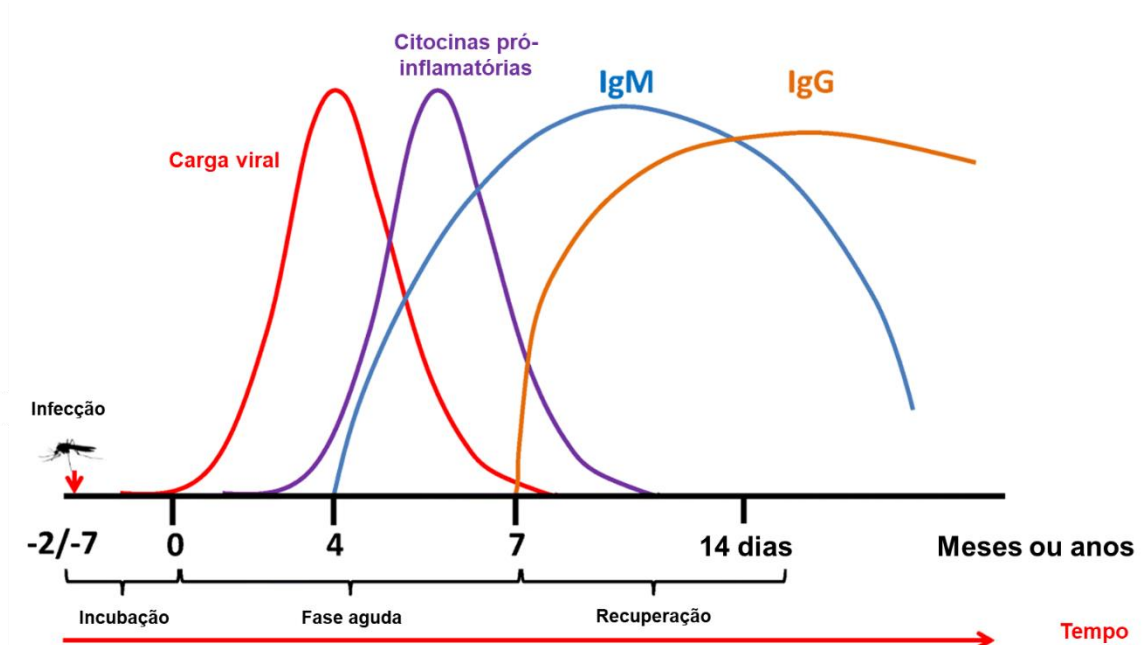


Fonte: Adaptado de Rueda *et al.*, (2022).

A resposta imune adaptativa em humanos começa com a ativação e proliferação de células T CD8+ desde as fases iniciais da CHIKV, com a resposta de células T CD4+ aparecendo dominante apenas no fim da fase aguda (WAUQUIER *et al.*, 2011). Estudos em animais indicam que as células T CD4+ são os principais linfócitos T que medeiam a inflamação durante a doença e, aparentemente, tem influência na eliminação viral (RUEDA *et al.*, 2022). Para além disso, os linfócitos T  $\gamma\delta$ , prevalentes na pele, têm se mostrado importantes para limitar o efeito inflamatório induzido pelo CHIKV (LONG *et al.*, 2016).

Anticorpos neutralizantes do tipo IgM são os primeiros a aparecer em resposta à infecção por CHIKV, entre dois e quatro dias após o início dos sintomas. Os níveis de IgM continuam subindo até o décimo dia, em média, enquanto a carga viral está em declínio. Depois disso, os anticorpos IgM agem de maneira a complementar a ação dos primeiros IgG produzidos, podendo ambos persistirem por anos (KUMAR *et al.*, 2020) (Figura 8).

Figura 8 – Resposta humoral a infecção pelo vírus Chikungunya



Fonte: Adaptado de Kumar *et al.*, (2022).

Além das repostas imunológicas inatas e adaptativas, outros fatores genéticos dos hospedeiros também podem influenciar no desfecho da infecção por CHIKV. O complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*, MHC, ou *human leukocyte antigen*, HLA, em humanos) é extremamente polimórfico e responsável por facilitar a apresentação de antígenos às células T. Esse polimorfismo dos genes HLA influencia drasticamente em quais antígenos o organismo será capaz de reconhecer e, conseqüentemente, combater (MURPHY; WEAVER, 2017). Em CHIKV, há alelos de HLA classe II que estão associados a uma maior susceptibilidade ou resistência a infecção por CHIKV, mas isso não se reflete em associação com sinais ou sintomas clínicos (RUEDA *et al.*, 2022).

A infecção por CHIKV já foi associada à artrite reumatoide por induzir processos inflamatórios semelhantes e, de fato, alguns casos crônicos podem ser classificados

dessa maneira. Através de uma abordagem de biologia de sistemas, já foram identificados padrões na expressão de dezenas de genes de maneira compartilhada entre CHIKF e artrite reumatoide, como a diminuição da expressão do receptor de IL-7 no sangue (SOARES-SCHANOSKI *et al.*, 2019). Exames de imagem em quadros causados pela infecção viral mostram, muitas vezes, articulações inchadas e doloridas, erosão óssea e redução do espaço articular. Esses pacientes, porém, não costumam apresentar autoanticorpos fator reumatoide e antiproteínas citrulinadas (BOUQUILLARD; COMBE, 2009; MANIMUNDA *et al.*, 2010a).

Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos são células presentes nas articulações e são especializadas na produção dos constituintes da matriz deste local, como ácido hialurônico, colágenos e fibronectina (IWANAGA *et al.*, 2000). Esses sinoviócitos já se mostraram suscetíveis à infecção por CHIKV *in vitro* e, neste caso, produzem uma série de quimiotáticos responsáveis pelo recrutamento e diferenciação de fagócitos, como RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B), IL-6, IL-8 e MCP-1. A cocultura desses sinoviócitos infectados e dos fagócitos atraídos, especialmente monócitos e macrófagos, leva à diferenciação destes fagócitos em células semelhantes a osteoclastos, que produzem altos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6, principais mediadores presentes em quadros de artrite (PHUKLIA *et al.*, 2013).

A formação dos osteoclastos, ou osteoclastogênese, e a atividade de reabsorção óssea realizada por eles são constatadas há muito tempo como essenciais no processo de erosão óssea presente na artrite reumatoide (HIRAYAMA *et al.*, 2002; PETTIT *et al.*, 2001). Enquanto os osteoclastos realizam a reabsorção óssea, os osteoblastos são os responsáveis pela produção da matriz óssea e o desbalanço entre a atividade destes dois tipos celulares nas articulações pode levar ao desenvolvimento de artrite reumatoide (CHOI; ARRON; TOWNSEND, 2009). Os osteoblastos, em adição aos sinoviócitos, são outro tipo celular presente nas articulações que já se mostraram suscetíveis à infecção por CHIKV *in vitro*. Como nos sinoviócitos, a infecção dos osteoblastos pelo CHIKV leva a estes produzirem RANKL e IL-6, o que provavelmente induz a atração de fagócitos para um ambiente favorável à osteoclastogênese. Além disso, osteoblastos infectados por CHIKV produzem menos osteoprotegerina (OPG), que age como um receptor competitivo de RANKL, potencializando a sinalização de para a formação e atividade dos osteoclastos (NORET *et al.*, 2012). De fato, o desbalanço da razão RANKL/OPG no ambiente

articular altera a osteoclastogênese, com maiores níveis de RANKL sendo favoráveis ao processo, como visto inclusive na infecção pelo RRV em camundongos (CHEN, Weiqiang *et al.*, 2014). Também já foi observado o aumento de precursores de osteoclastos e de atividade osteoclastogênica nas células do sangue periférico em pacientes com artrite reumatoide em relação a pessoas saudáveis (DURAND, M *et al.*, 2011).

Apesar desses resultados e similaridades entre casos de CHIKV e artrite reumatoide, não há estudos que investiguem as alterações moleculares presentes no sangue de indivíduos infectados por CHIKV que possam explicar e/ou associar a dor articular e cronicidade da CHIKF a partir de marcadores moleculares relacionados ao metabolismo ósseo.

#### **1.4 Repertório imunológico**

O sistema imunológico é composto por células e moléculas que são responsáveis pela imunidade, ou proteção, de um organismo a doenças. Os mecanismos de ação do sistema imunológico, inatos e adaptativos, consistem em respostas coordenadas e interligadas que respondem à identificação de substâncias estranhas. Mesmo que a função fisiológica principal do sistema imune seja a defesa do organismo contra agentes infecciosos, o sistema imune também é capaz de responder a moléculas estranhas não infecciosas e até mesmo a moléculas do próprio organismo, o que leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018).

A imunidade inata é importante para combater o patógeno nas primeiras horas ou dias da infecção, respondendo prontamente aos agentes invasores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018). Receptores presentes em células do sistema imune inato (como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) reconhecem estruturas comuns e conservadas em patógenos, como componentes de parede celular bacteriana ou ácidos nucleicos virais. Com isso, vias de sinalização intracelulares estimulam a ativação funcional destas células, as quais podem induzir a resposta adaptativa por eventos de sinalização e apresentação do antígenos aos linfócitos (CLEM, 2011; IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

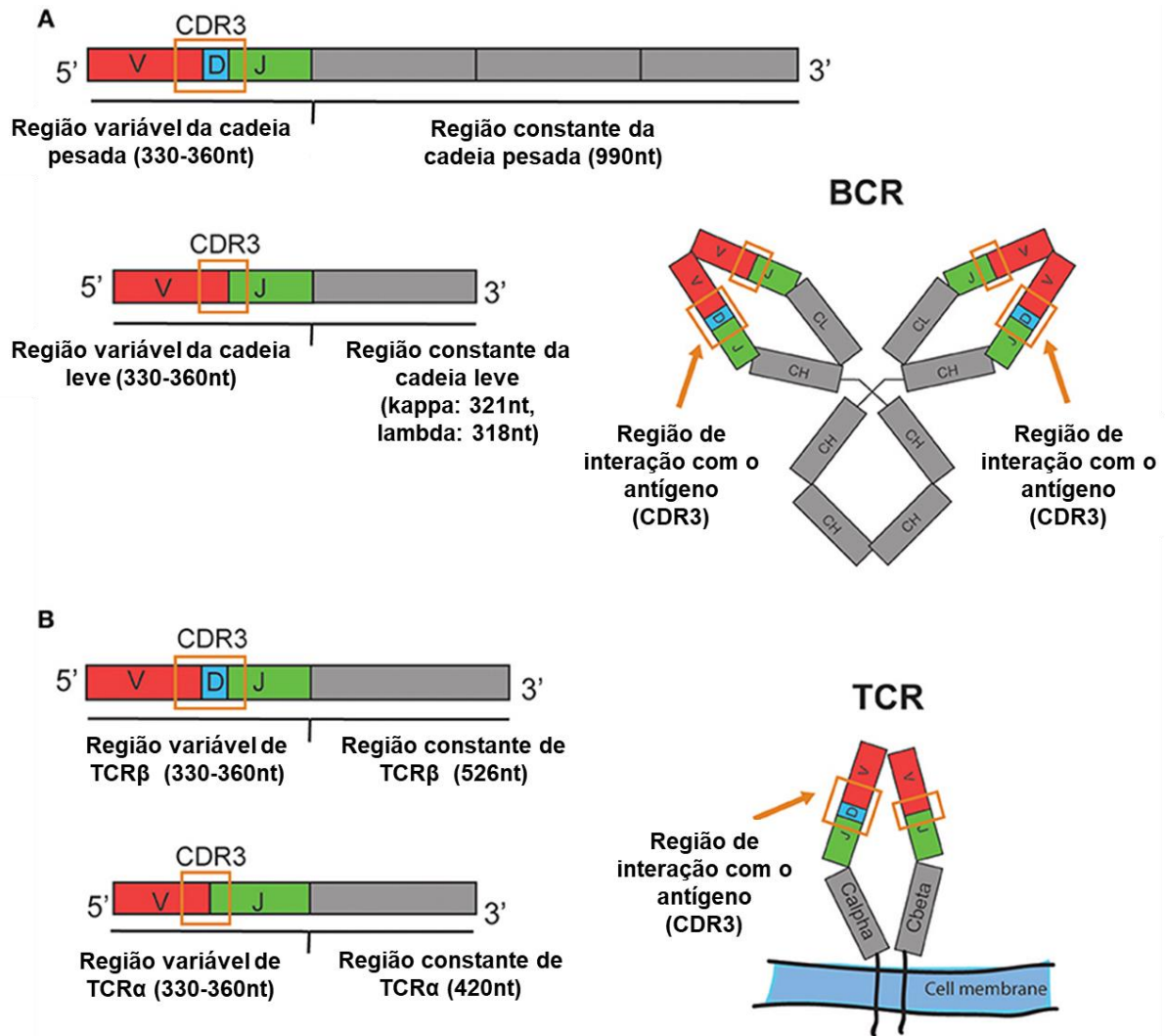
Os linfócitos B e T são os componentes celulares da resposta imune adaptativa, que tem como uma de suas principais características a especificidade ao agente

infeccioso a partir da ativação por antígenos apresentados. Uma resposta imune bem-sucedida, envolvendo ambos os mecanismos inatos e adaptativos, pode não somente eliminar a infecção, mas também estabelecer uma memória imunológica de longo prazo contra o patógeno. A memória é derivada da manutenção de células diferenciadas de memória B e T específicas a um determinado antígeno, garantindo que posteriores reinfecções sejam combatidas de maneira mais rápida e efetiva (PARHAM, 2015). A ativação das células B e T ocorrem a partir do reconhecimento de antígenos por seus receptores de superfície, mas de forma diferente entre elas. Enquanto os receptores de células B (*B cell receptors*, BCRs) são ativados ao interagirem diretamente com os antígenos, os receptores de células T (*T cell receptors*, TCRs) os reconhecem quando estes são apresentados via complexo MHC/HLA por células apresentadoras de antígenos (MURPHY; WEAVER, 2017). O conjunto de TCR e BCR é chamado de repertório imunológico (LIU; WU, 2018).

A diversidade do repertório de células B e T pode ser explicada a partir de dois fenômenos distintos que derivam da recombinação V(D)J: a diversidade combinatória e a diversidade juncional (DJAUD; PARHAM, 2020). Na diversidade combinatória, os receptores são definidos a partir de um processo de recombinação somática, onde os exons que dão origem aos BCR e TCR estão localizados em diferentes loci (LEFRANC, 2011). Para a síntese das cadeias TCR $\alpha$  e BCR cadeia leve (lambda e kappa), há uma união entre um segmento de gene variável (V) com um segmento de gene de junção (J), no processo de recombinação VJ. Já na síntese das cadeias TCR $\beta$  e BCR cadeia pesada, são necessários dois arranjos consecutivos: primeiro, um segmento de gene de diversidade (D) é unido com um segmento J e, posteriormente, um segmento V é unido ao segmento D-J, no processo de recombinação V(D)J. Em todos os casos, também há uma região constante (C) (Figura 9) (LEFRANC, 2001).



Figura 9 – Estrutura representativa dos receptores de células B e T



(A) Representação do transcrito de BCR e (B) TCR. Representações ilustrativas estão representadas a direita. Na estrutura real, a CDR3 é um *loop* exposto na região mais distal dos receptores. Fonte: Adaptado de Fink, 2019.

A diversidade juncional aumenta o repertório imunológico a partir da inserção e deleção de nucleotídeos aleatórios nas junções V(D)J, durante o processo de recombinação (NIKOLICH-ŽUGICH; SLIFKA; MESSAOUDI, 2004). Por fim, a diversidade é aumentada pela combinação de diferentes cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , para células T, ou leves e pesadas, para células B (MORA; WALCZAK, 2018). A diversidade em

cada uma das cadeias é observada em três diferentes porções de cada proteína, com estrutura de loops, chamadas de regiões determinantes de complementariedade (complementarity-determining regions, CDRs). A CDR3 possui maior diversidade que CDR1 e CDR2, pois a primeira é gerada a partir de deleções e inserções nas junções entre os genes, enquanto as últimas são codificadas pelas sequências germinativas dos segmentos V. Em adição, a diversidade de BCRs pode aumentar posteriormente devido ao processo de hipermutação somática (DAVIS; BJORKMAN, 1988; DJAOUD; PARHAM, 2020).

Antes do desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de alto rendimento (*high-throughput sequencing*, HTS), a técnica mais popular para o sequenciamento e estudo de repertórios era o sequenciamento de Sanger. Havia enorme dificuldade em determinar a diversidade do sistema imunológico dessa forma, pois cada reação de sequenciamento requeria a clonagem de apenas uma sequência em um vetor plasmidial. Isso inviabilizava estudos mais aprofundados, limitando para poucas centenas o máximo de TCRs singulares já reportados num único estudo por esse método (HINDLEY *et al.*, 2011). Outra técnica anterior ao HTS, baseia-se em métodos de *spectratyping* (GORSKI *et al.*, 1994). Neste caso, após amplificação da sequência do TCR a partir de primers específicos, informações sobre o comprimento da região CDR3 são observados a partir de gel de eletroforese. Por ser mais simples do que o sequenciamento de Sanger, o *spectratyping* não fornece informações sobre a sequência nucleotídica ou aminoacídica do CDR3, o que é essencial para inferir suas estruturas moleculares e como os receptores podem reconhecer os antígenos (LIU; WU, 2018).

A combinação de sequenciamento de Sanger e *spectratyping* permitiu que muitas descobertas fossem feitas sobre repertórios imunológicos. O entendimento sobre células T regulatórias, por exemplo, se beneficiou da noção de que, em sua maioria, elas são originadas no timo, e não convertidas a partir de células T maduras circulantes (PACHOLCZYK *et al.*, 2006). Também foi visto em infiltrados de células T regulatórias em carcinoma que, em sua maioria, elas possuem TCR distintos das células T efectoras locais, sugerindo que as células T regulatórias presentes no infiltrado de linfócitos são “naturais”, e não induzidas ou convertidas no ambiente tumoral (HINDLEY *et al.*, 2011).

Outro conceito desenvolvido ao longo do tempo foi o de repertórios compartilhados e clonótipos públicos. Ao se considerar unicamente o potencial de diversidade de repertório imunológico, a probabilidade de dois indivíduos compartilharem o mesmo TCR ou BCR que reconheça um antígeno comum é baixa. Porém, estudos mostraram que populações, por vezes, compartilham algumas características de repertório em comum, como uso enviesado de segmentos V(D)J e motivos CDR3 conservados, denominados clonótipos públicos (MILES; DOUEK; PRICE, 2011). Esses fenômenos já foram identificados em infecções virais, como influenza (KEDZIERSKA; TURNER; DOHERTY, 2004; MOSS *et al.*, 1991), citomegalovírus e Epstein-Barr (PRICE *et al.*, 2005), hepatite B e C (SING, 2001; UMEMURA *et al.*, 2000), dentre outras. Também foram identificados vieses nos repertórios de pacientes portadores de tumores (AGATHANGELIDIS *et al.*, 2012; SAINZ-PEREZ *et al.*, 2012) e doenças autoimunes, como esclerose múltipla (OKSENBERG *et al.*, 1993), lúpus eritematoso sistêmico (LUO *et al.*, 2008) e diabetes tipo I (QUINN *et al.*, 2006).

O estudo da diversidade dos receptores de células T e B sofreu um marco com a introdução de técnicas de HTS, que permitiram uma análise mais profunda do repertório imunológico de forma consideravelmente mais rápida e barata (SIX *et al.*, 2013). Os primeiros estudos de repertório imunológico a utilizar HTS foram sobre BCRs de *zebrafish* (WEINSTEIN *et al.*, 2009) e, posteriormente, dois estudos buscaram elucidar a recombinação VDJ em repertório humano de BCRs e TCRs (BOYD *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010), todos utilizando o sistema de pirosequenciamento 454 desenvolvido pela Roche. Na mesma época, utilizando do sequenciamento Illumina, buscou-se descrever as características do repertório TCR $\beta$  humano, como tamanho da região CDR3 e frequência dos aminoácidos utilizados em cada posição dessa região (FREEMAN *et al.*, 2009). Com as tecnologias atuais, sugere-se utilizar as plataformas Illumina Miseq, devido a sua característica em gerar *reads* mais longos, para estudos onde é necessário sequenciar toda a região V(D)J, e Illumina Hiseq para estudos focados apenas na região CDR3, por ter maior custo-benefício e rapidez na obtenção dos resultados a partir de *reads* mais curtos (LIU; WU, 2018).

Atualmente, os sequenciamentos são comumente realizados a partir de células B e T isoladas do sangue e, devido à baixa frequência de transcritos V(D)J nessas

amostras, utilizam-se de amplificação a partir de DNA genômico ou RNA mensageiro (mRNA) (BROWN; RAEBURN; HOLT, 2015). As principais estratégias de amplificação focam na amplificação da região CDR3 utilizando iniciadores da região C (quando mRNA), e das regiões V e/ou J em PCR multiplex (LIU; WU, 2018).

Recentemente, o sequenciamento de transcriptomas globais (RNA-seq) tem se tornado rotina em muitos estudos clínicos e de pesquisa básica. Os transcritos de TCR estão, obviamente, presentes nesses dados e podem então ser acessados para relevar informações relevantes do repertório em diferentes situações. Para explorar esse potencial, tem surgido ferramentas que realizam a extração da informação sobre repertório imune a partir de dados de RNA-seq (BOLOTIN *et al.*, 2015, 2017).

Diversas ferramentas de bioinformática têm sido desenvolvidas para determinar de forma acurada o repertório imunológico a partir de dados genômicos ou de RNA-seq, focando especialmente nas sequências da região CDR3. Estudos que utilizam de transcriptômicos globais tem se popularizado nos últimos anos, tanto para o estudo de doenças quanto na pesquisa básica. Esses sequenciamentos potencialmente possuem informações a respeito de transcritos V(D)J, que podem ser acessados a partir dos dados brutos. Além disso, essa abordagem exclui a necessidade de *primers* específicos de PCR. Algumas dessas ferramentas são específicas para BCR ou TCR, como TRUST (LI *et al.*, 2017) e V'Djer (MOSE *et al.*, 2016), enquanto outras podem trabalhar com os dois tipos de receptor, como MiXCR (Bolotin *et al.*, 2017). Há também ferramentas específicas para dados de RNA-seq *single cell*, como TraCeR (STUBBINGTON *et al.*, 2016) e BASIC (CANZAR *et al.*, 2016).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Identificar marcadores moleculares sanguíneos associados a artrite experienciada por indivíduos infectados pelo vírus Chikungunya durante a fase aguda e crônica da infecção.

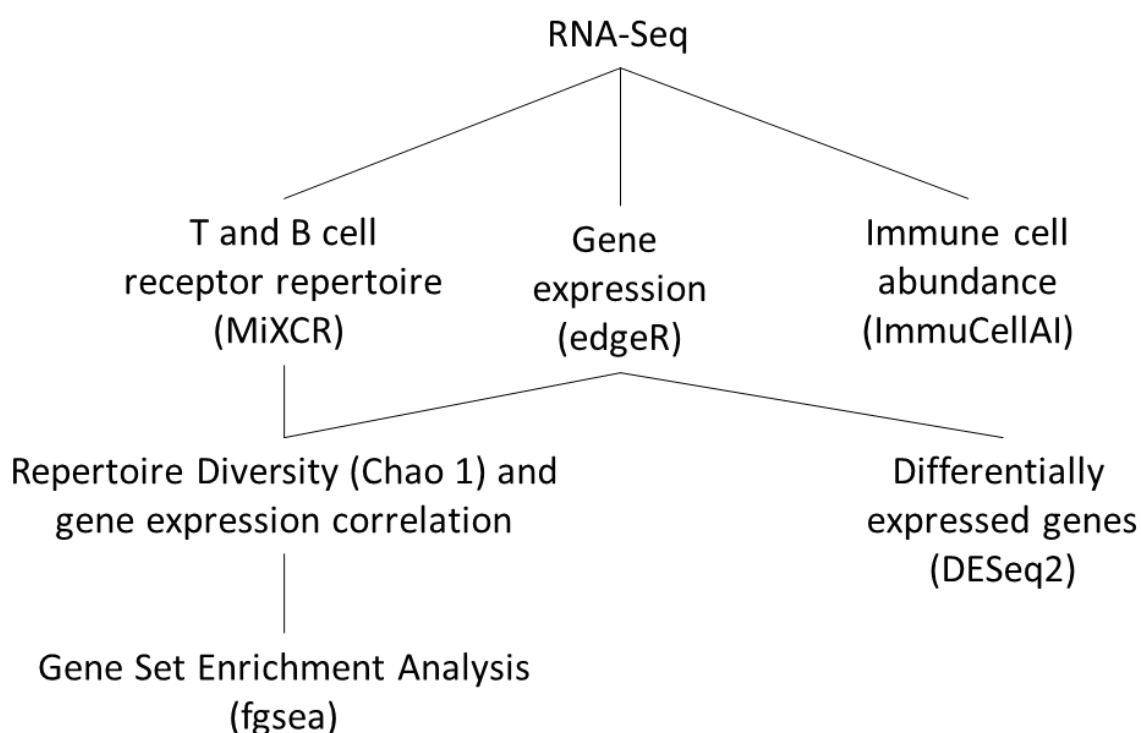
### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Descrever a diversidade do repertório imunológico de pacientes infectados por CHIKV durante a fase aguda, incluindo pacientes que irão ou não desenvolver cronicidade;
- b) Descrever a abundância de células do sistema imune de pacientes infectados por CHIKV durante a fase aguda, incluindo pacientes que irão ou não desenvolver cronicidade;
- c) Identificar genes cuja expressão esteja correlacionada com a diversidade do repertório imunológico em pacientes infectados por CHIKV durante a fase aguda, incluindo pacientes que irão ou não desenvolver cronicidade;
- d) Identificar genes diferencialmente expressos durante a infecção por CHIKV;
- e) Identificar conjuntos de genes que possam estar associados aos sintomas agudos e crônicos da CHIKF.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho, foram utilizados três conjuntos de dados diferentes de transcriptoma de células do sangue, sendo dois de Chikungunya e um de Dengue (descritos no próximo item). Um resumo dos métodos utilizados está presente na Figura 10.

Figura 10 – Resumo dos métodos utilizados neste trabalho



Fonte: O autor, 2022.

#### 3.1 Conjuntos de dados e pacientes incluídos

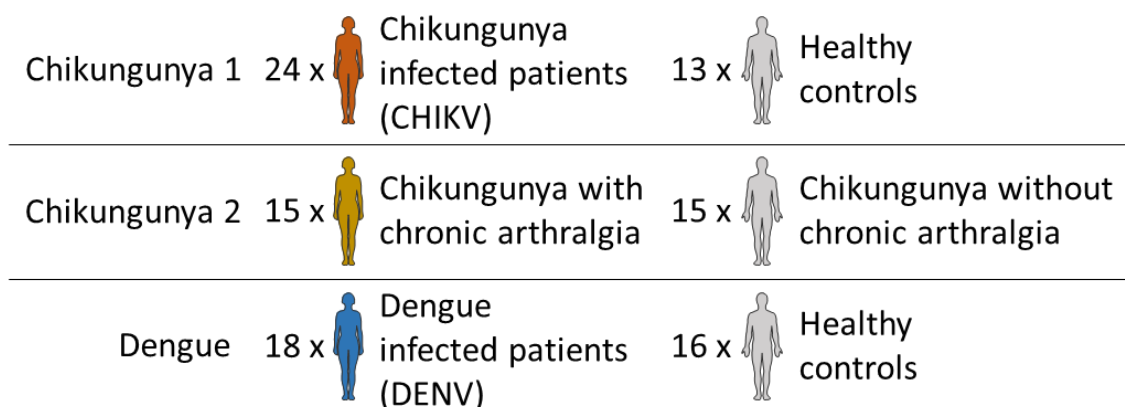
Todos os conjuntos de dados utilizados neste trabalho se referem à transcriptoma de células do sangue periférico. O primeiro conjunto de dados (Chikungunya 1) são dados já publicados e disponíveis em plataformas públicas (SOARES-SCHANOSKI *et al.*, 2019). Neste conjunto de dados, definiu-se dois grupos: pacientes infectados por CHIKV (n=24) e pacientes não infectados (n=13). Os pacientes infectados são todos referentes à fase aguda, com início dos sintomas entre 1 e 4 dias.

O segundo conjunto de dados (Chikungunya 2) engloba apenas pacientes infectados por CHIKV durante o início da fase aguda. Neste conjunto de dados, definiu-se dois grupos: pacientes que desenvolveram a fase crônica da doença (n=15) e pacientes que tiveram a patologia resolvida após a fase aguda (n=15). Este conjunto de dados foi obtido por colaboradores e está em processo de publicação.

O terceiro conjunto de dados (Dengue) também se refere a dados já publicados (TSALIK *et al.*, 2021). Esse conjunto de dados foi separado entre infectados pelo vírus da dengue (DENV) (n=18) e não infectados (n=16).

Para todos os conjuntos de dados, foram incluídos apenas os indivíduos com idade entre 18 e 69 anos. Além disso, foi realizado controle de qualidade das amostras e indivíduos considerados outliers durante a estimativa de diversidade CDR3 de BCR e TCR (detalhado adiante) foram excluídos deste trabalho. O número de amostras final de cada conjunto de dados e grupo estão sumarizados na figura 11.

Figura 11 – Resumo dos conjuntos de dados e grupos analisados



Fonte: O autor, 2022.

### 3.2 Programas computacionais

Neste trabalho, exceto quando especificado, foram utilizadas implementações na linguagem de programação R (v4.2.0), usada em computações estatísticas e gráficas (R CORE TEAM, 2020). Além de pacotes disponíveis no repositório oficial, também foram utilizados pacotes adicionais disponíveis no Bioconductor, um repositório focado em programas para análises baseadas em genômica e biologia molecular (HUBER *et al.*, 2015). *In-house scripts* escritos em R foram usados no

processamento, análise e representação gráfica dos resultados obtidos a partir das amostras de sequenciamento.

### **3.3 Sequenciamento dos receptores de células B e T**

As sequências CDR3 de receptores de células T – TCR $\alpha$  (TRA) e TCR $\beta$  (TRB) – e células B – cadeias pesada (IGH), kappa (IGK) e lambda (IGL) – foram obtidas a partir dos dados brutos de sequenciamento (com a extensão de arquivos .fastq) com o auxílio do programa computacional MiXCR (v3.0.13) (BOLOTIN *et al.*, 2017). A utilização desse programa permite que as *reads* sejam alinhadas utilizando como referência as sequências genômicas V(D)J. Neste ponto, o algoritmo leva em consideração *mismatches* e *indels*, sequências com erros, e exclui *reads* de baixa qualidade. Os alinhamentos são combinados para a formação de *contigs* que servem para a definição dos clonótipos (conjunto de células T ou B que possuem um TCR/BCR idêntico) e, durante essa etapa, são realizadas correções para contornar desvios artificiais derivados da amplificação e outros erros de sequenciamento. Por fim, são gerados arquivos com informações sobre os clonótipos identificados, suas frequências nas amostras, tamanho e composição das sequências CDR3 nucleotídicas e aminoacídicas, qualidade do sequenciamento e identificação dos segmentos V(D)J utilizados.

### **3.4 Análise de diversidade CDR3**

A diversidade CDR3 de TRA, TRB, IGH, IGK e IGL foi computada através do pacote em R immunarch (v0.9.0) (NAZAROV V *et al.*, 2022), utilizando-se o estimador de diversidade Chao1 (CHAO, 1984; COLWELL *et al.*, 2012). Foi aplicado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney para verificar se havia diferenças entre a média dos postos de dois grupos.

### **3.5 Análise de abundância celular**

A abundância de dez tipos de célula do sistema imunológico foi inferida a partir do transcriptoma utilizando a ferramenta Immune Cell Abundance Identifier (ImmuCellAI) (MIAO *et al.*, 2020). Para tal, foram utilizadas as matrizes de contagem



gênica normalizadas em CPM (detalhado adiante). ImmuCellAI permite a inferência da proporção de células do sistema imunológico inato, células B e de células T. Para comparação estatística nessas análises foi aplicado o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, com o intuito de verificar se havia diferenças entre a média dos postos de dois grupos.

### **3.6 Análise de expressão diferencial de genes**

Para a análise de expressão diferencial de genes foram utilizados os valores expressão gênica normalizados por CPM (*counts per million reads mapped*). Esses valores foram disponibilizados pelos autores do primeiro conjunto de dados (Chikungunya 1) (SOARES-SCHANOSKI *et al.*, 2019). Para os conjuntos de dados Chikungunya 2 e Dengue, os valores foram computados a partir dos dados de sequenciamento. Para tal, primeiro foi realizado o alinhamento das *reads* utilizando o *software* Spliced Transcripts Alignment to a Reference (STAR) (v. 2.7.10a) e o genoma humano de referência *GRCh38.p13 release 104* (DOBIN *et al.*, 2013). As *reads* alinhadas foram então sumarizadas em matrizes de contagem com a utilização a função *featureCounts* do pacote em R Rsubread (v. 2.0.1) e normalização em CPM (LIAO; SMYTH; SHI, 2019). A partir das matrizes de contagem normalizadas, os genes diferencialmente expressos em cada grupo foram identificados através do pacote em R DESeq2 (v1.38.2), que, para isso, utiliza um modelo de distribuição binomial negativa (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Para a obtenção de genes diferencialmente expressos no segundo conjunto de dados (Chikungunya 2), manteve-se apenas os pacientes crônicos com valores de diversidade CDR3 de IGK distribuídos até o terceiro quartil (Q3). De maneira semelhante, no mesmo conjunto de dados, foram mantidos os pacientes não crônicos com valores de diversidade CDR3 de IGK distribuídos acima do primeiro quartil (Q1).

### **3.7 Correlação entre expressão gênica e diversidade de BCR e TCR com enriquecimento funcional de genes**

Para o enriquecimento funcional de genes, primeiramente os valores de expressão foram normalizados em *vst* (*Variance-stabilizing transform*) utilizando o pacote em R DESeq2 (v1.38.2) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Esse método

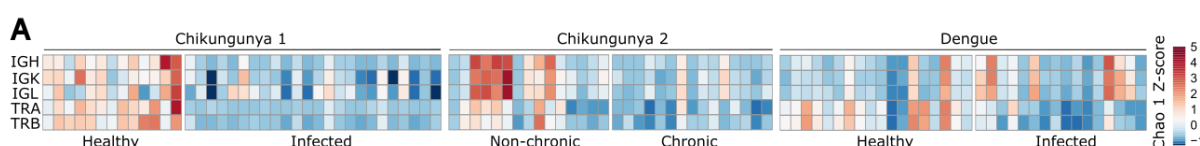
transforma os dados para que estes apresentem heterocedasticidade, ou seja, para que os dados tenham a mesma variância dos erros. Essa transformação, combinada a correlação de Pearson, é recomendada para explorar correlações em dados de expressão gênica (MILLER; BISHOP, 2021). Os valores em *vst* foram correlacionados, através da correlação de Pearson, com os dados de diversidade CDR3 de TRA, TRB, IGH, IGK e IGL utilizando o pacote em R *Hmisc* (v4.5-0) (E HARRELL, 2021). Os valores de correlação entre os genes e os valores de diversidade CDR3 foram utilizados no enriquecimento funcional de genes (GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*), utilizando o pacote em R *fgsea* (v1.24.0) (KOROTKEVICH *et al.*, 2021). Como referência, foram utilizados módulos de genes disponíveis publicamente no MSigDB (*Molecular Signatures Database*) (LIBERZON *et al.*, 2011; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Como resultado, a análise retorna um escore de enriquecimento normalizado (NES, *normalized enrichment score*) para cada conjunto de genes presente na referência e que, neste caso, reflete os valores de correlação entre a expressão gênica e a diversidade CDR3 de TRA, TRB, IGH, IGK e IGL.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Diversidade CDR3 de receptores de células B e células T

Utilizando o estimador de diversidade Chao1, foram computadas as diversidades de células B (cadeias IGH, IGK e IGL) e T (cadeias TRA e TRB) dos pacientes saudáveis e infectados por CHIKV ou DENV nos três conjuntos de dados. O resultado está sintetizado na figura 12, que apresenta a diversidade padronizada por z-score.

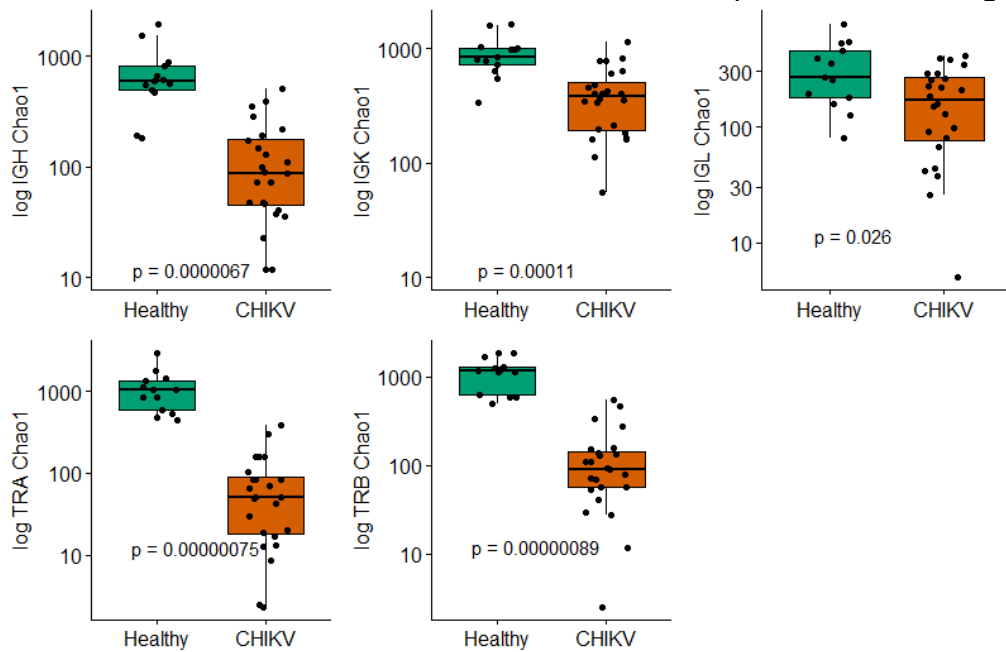
Figura 12 – Resumo da diversidade estimada de CDR3 nos conjuntos de dados



Diversidade estimada Chao1 para as cadeias células B (cadeias IGH, IGK e IGL) e T (cadeias TRA e TRB) normalizada por z-score para cada cadeia dentro do mesmo conjunto de dados. Fonte: O autor, 2022.

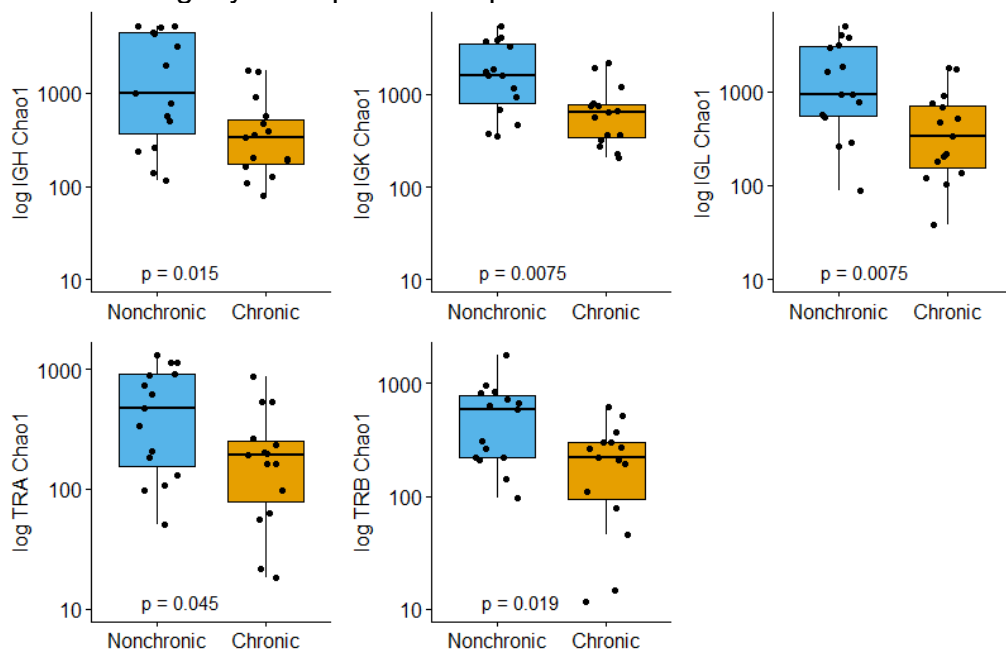
Na figura 12 é possível observar uma menor diversidade em pacientes infectados com CHIKV em comparação aos saudáveis, além de que os pacientes que posteriormente desenvolveram cronicidade também exibem uma diversidade menor do que aqueles que não desenvolveram a forma crônica da CHIKF. De fato, a diversidade estimada de todas as cadeias é menor em pacientes infectados (Figura 13) e naqueles que desenvolveriam a forma crônica da CHIKF (Figura 14) com valor- $p$  significativo, o que acontece apenas nas cadeias de célula T na infecção por DENV (Figura 15).

Figura 13 – Diversidade CDR3 é menor em infectados pelo vírus Chikungunya



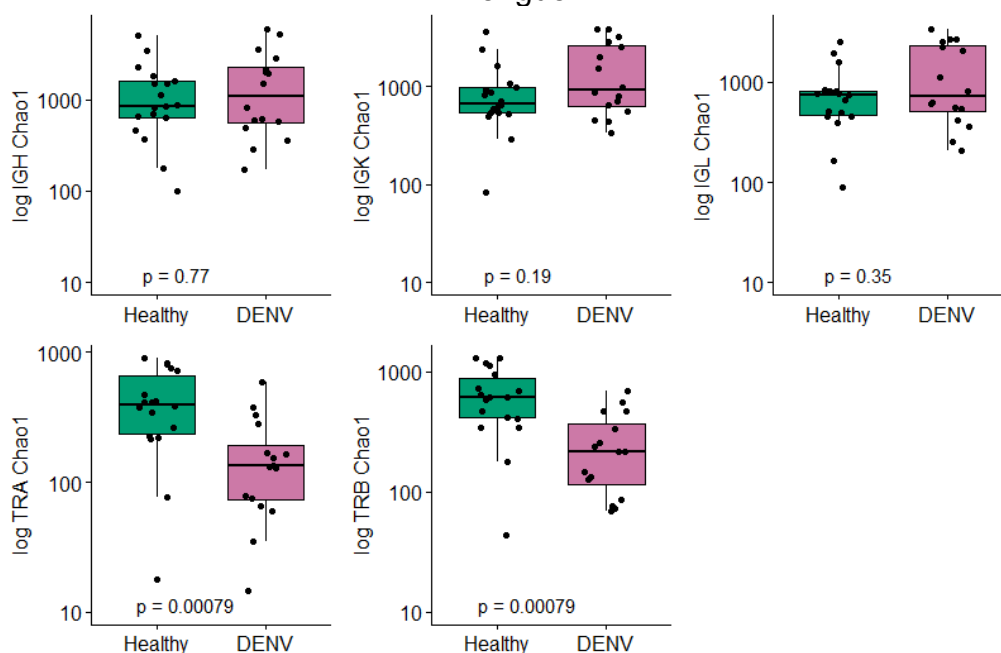
Diversidade estimada Chao1 para as cadeias células B (cadeias IGH, IGK e IGL) e T (cadeias TRA e TRB) de indivíduos saudáveis (verde) e infectados pelo vírus Chikungunya (laranja). Valores- $p$  do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney são mostrados em cada comparação. Fonte: O autor, 2022.

Figura 14 – Diversidade CDR3 é menor durante a fase aguda da infecção pelo vírus Chikungunya nos pacientes que irão desenvolver cronicidade



Diversidade estimada Chao1 para as cadeias células B (cadeias IGH, IGK e IGL) e T (cadeias TRA e TRB) de indivíduos durante a fase aguda de infecção por CHIKV. Comparações entre indivíduos que não progrediram para a fase crônica (azul) e indivíduos que progrediram (amarelo). Valores- $p$  do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney são mostrados em cada comparação. Fonte: O autor, 2022.

Figura 15 – Diversidade CDR3 de células T é menor em infectados pelo vírus da Dengue

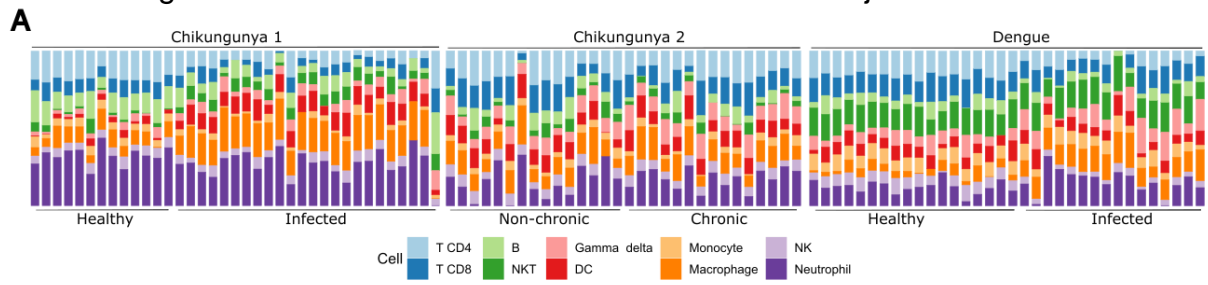


Diversidade estimada Chao1 para as cadeias células B (cadeias IGH, IGK e IGL) e T (cadeias TRA e TRB) de indivíduos saudáveis (verde) e infectados pelo vírus da Dengue (rosa). Valores- $p$  do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney são mostrados em cada comparação. Fonte: O autor, 2022.

## 4.2 Abundância celular

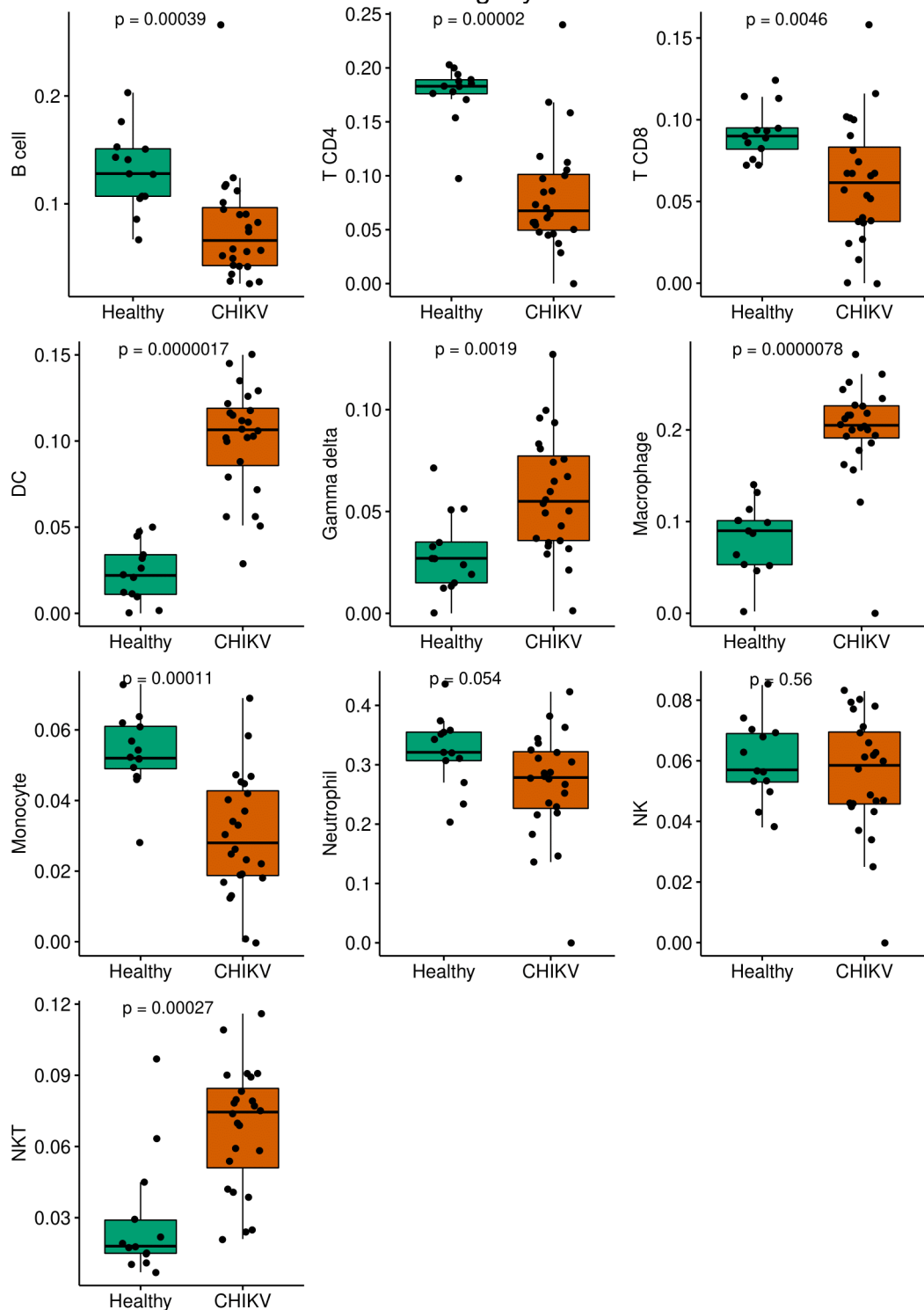
A análise de abundância celular permitiu visualizar a proporção estimada, a partir do transcriptoma, de dez diferentes células presentes no sangue periférico (Figura 16). Em comparação com o controle saudável, os infectados pelo CHIKV apresentaram menor frequência de células B, células T CD4/CD8 e monócitos, além de aumento na frequência de linfócitos gama delta, células dendríticas, células T *natural killer* (NKT) e macrófagos (Figura 17). Na fase aguda da infecção, os pacientes que posteriormente desenvolveram cronicidade não apresentaram diferença na frequência na população de células analisadas (Figura 18). Em adição, os infectados por DENV apresentaram diminuição na frequência de células T CD4/CD8 e células *natural killer* (NK), e um aumento na frequência de macrófagos e neutrófilos (Figura 19).

Figura 16 – Resumo da abundância celular nos conjuntos de dados



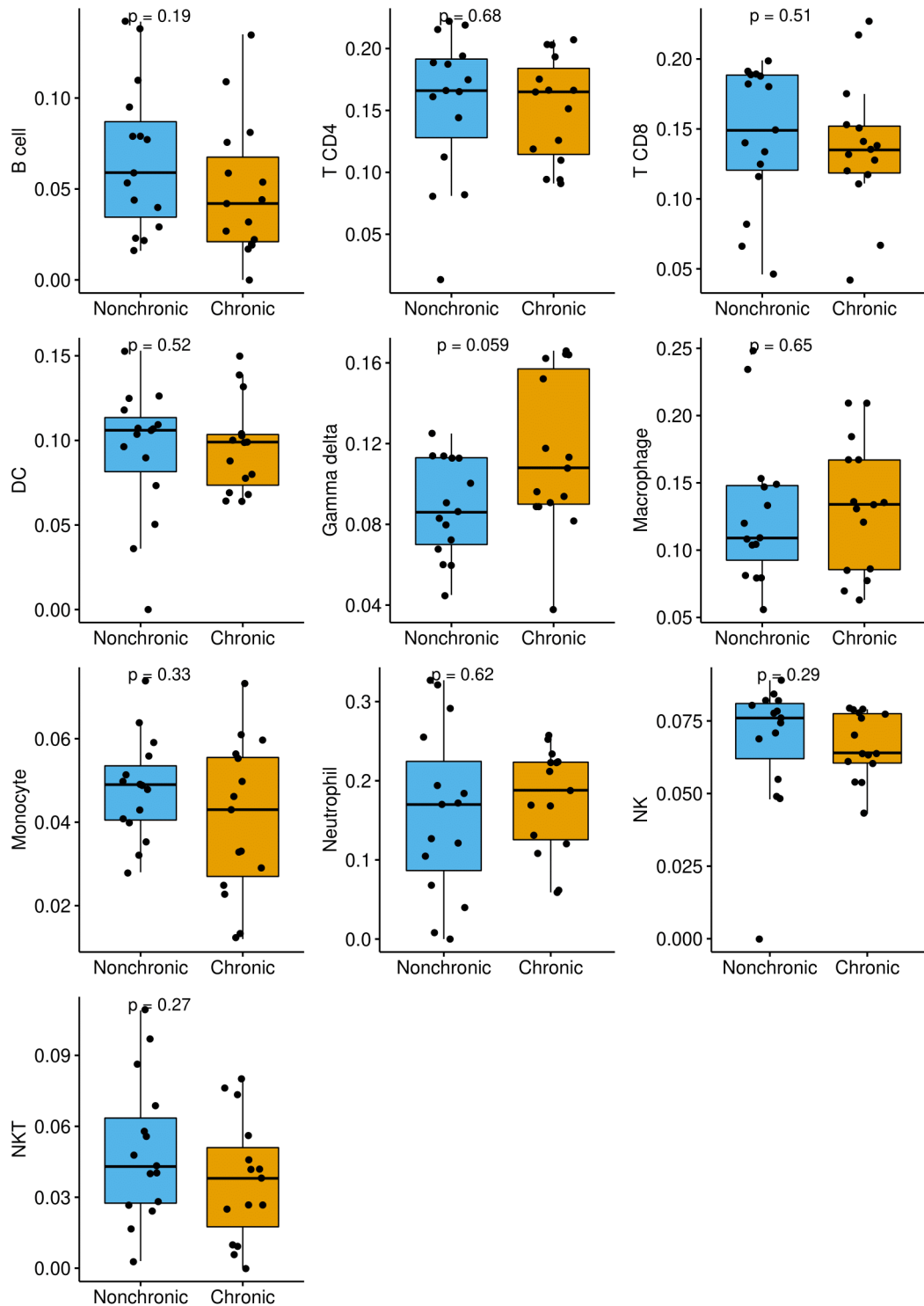
Resumo da estimativa de células presentes nas amostras realizada pelo método ImmuCellAI. NK: células *natural killers*. NKT: *natural killer T cells*. Fonte: O autor, 2022.

Figura 17 – Alterações nas abundâncias celulares na infecção pelo vírus Chikungunya



Estimativas das proporções de células nas amostras de indivíduos saudáveis (verde) e infectados pelo vírus Chikungunya (laranja). Valores- $p$  do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney são mostrados em cada comparação. DC: células dendríticas. NK: células *natural killers*. NKT: *natural killer T cells*. Fonte: O autor, 2022.

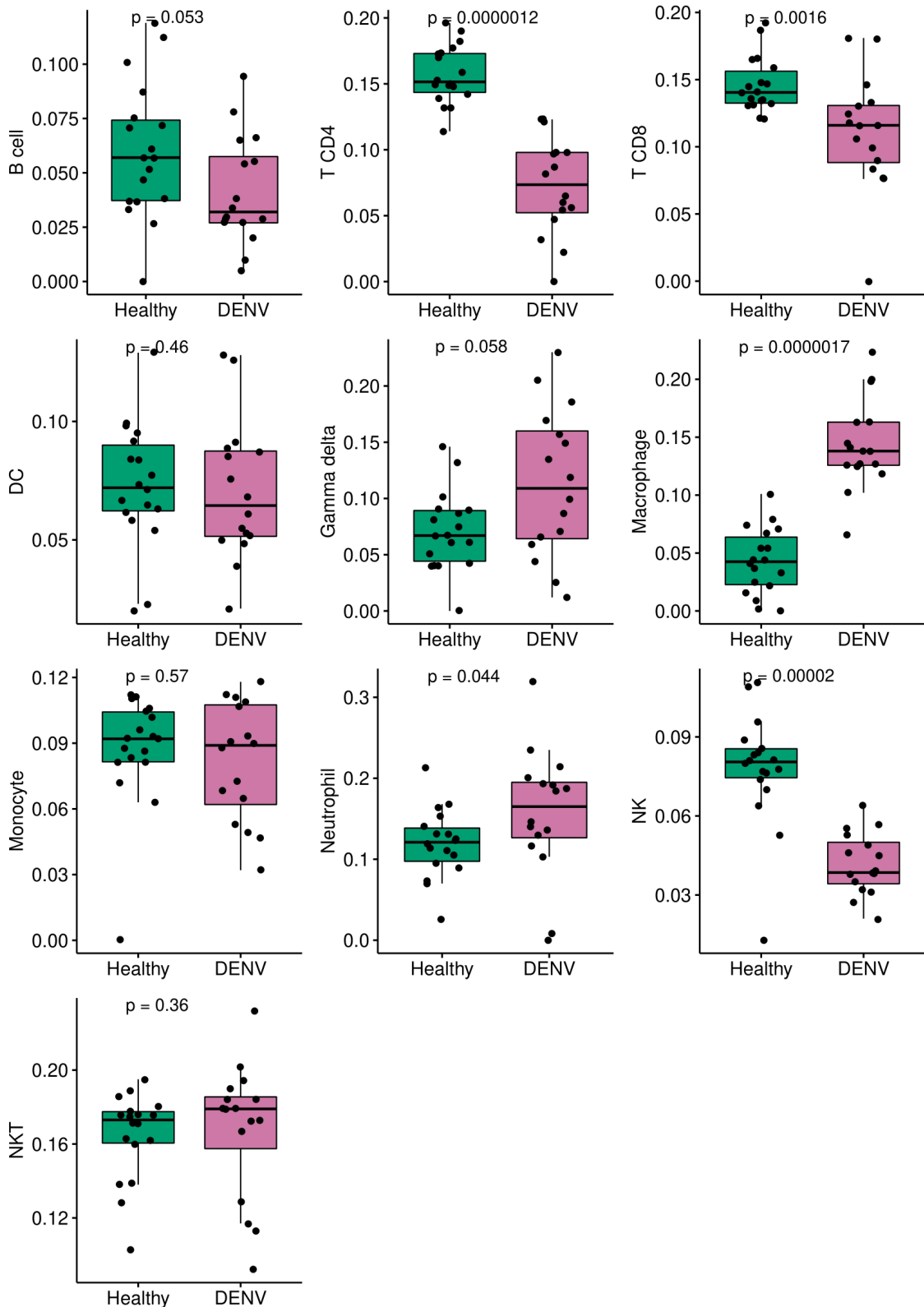
Figura 18 – Abundâncias celulares em infectados pelo vírus Chikungunya durante a fase aguda não diferem entre quem desenvolve ou não cronicidade



Estimativas das proporções de células nas amostras de indivíduos durante a fase aguda de infecção por CHIKV. Comparações entre indivíduos que não progrediram para a fase crônica (azul) e indivíduos que progrediram (amarelo). Valores- $p$  do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney são mostrados em cada comparação. DC: células dendríticas. NK: células *natural killers*. NKT: *natural killer T cells*. Fonte: O autor, 2022.



Figura 19 – Alterações nas abundâncias celulares na infecção pelo vírus da Dengue

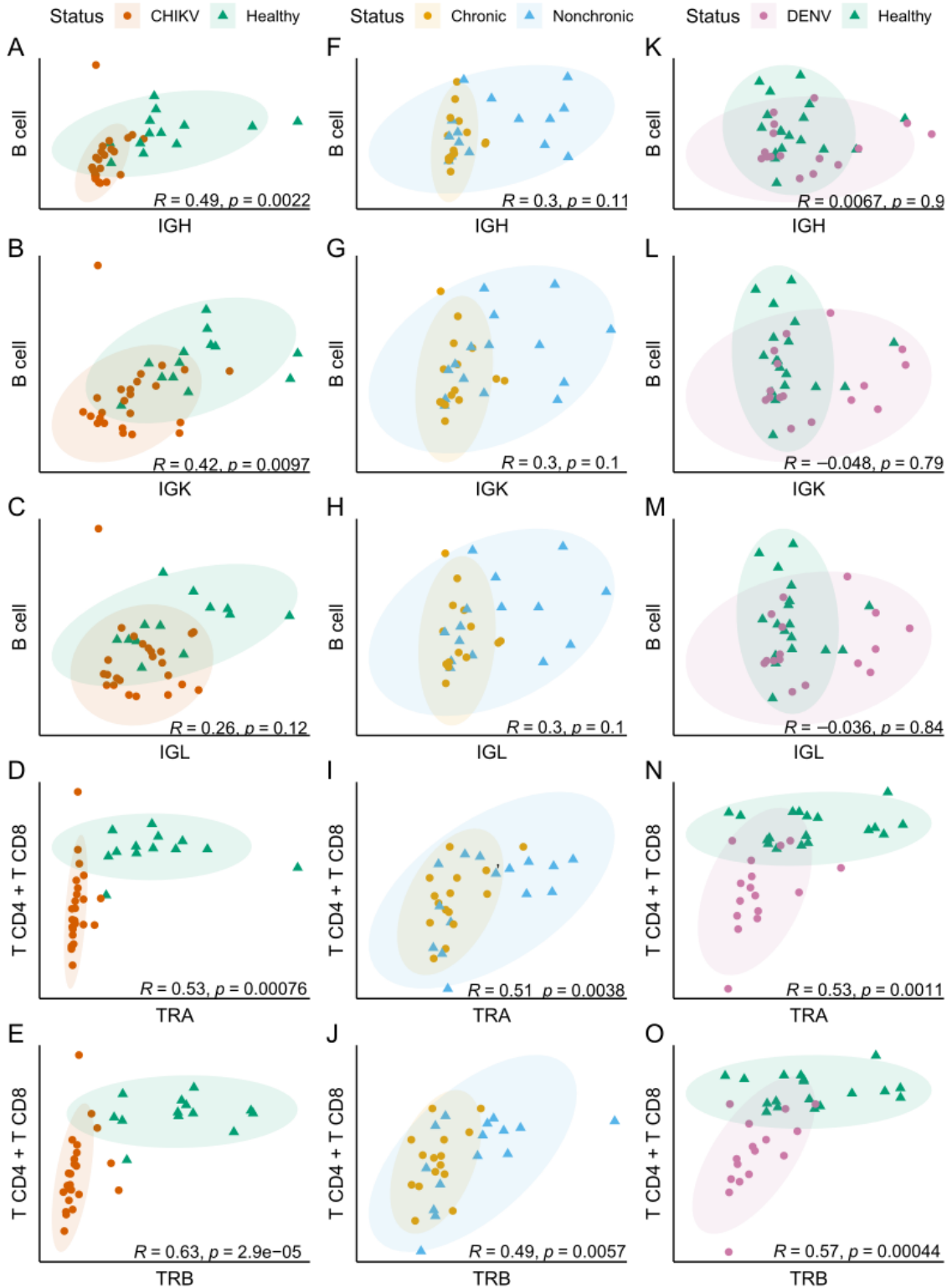


Estimativas das proporções de células nas amostras de indivíduos saudáveis (verde) e infectados pelo vírus da Dengue (rosa). Valores- $p$  do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney são mostrados em cada comparação. DC: células dendríticas. NK: células *natural killers*. NKT: *natural killer T cells*. Fonte: O autor, 2022.

### 4.3 Correlação entre diversidade e abundância celular

A partir dos resultados de diversidade e de abundância celular de linfócitos B e T (CD4+ e CD8+) foi possível verificar que existe correlação entre essas variáveis em algumas situações (Figura 20). Há correlação positiva moderada a forte ( $R = 0.49 - 0.63$ ) entre todas as cadeias de BCR e TCR e as abundâncias de células B e T, respectivamente, no conjunto de dados contendo infectados por CHIKV e controles saudáveis, com exceção de IGL (Figura 20 A-E). Enquanto no conjunto de dados de pacientes que desenvolveram a forma crônica de CHIKV *versus* os que não desenvolveram, a correlação existe apenas no conjunto de células T (Figura 20 F-J), o mesmo observado no conjunto de dados de DENV (Figura 20 K-O).

Figura 20 – Correlação entre diversidade CDR3 e abundância celular

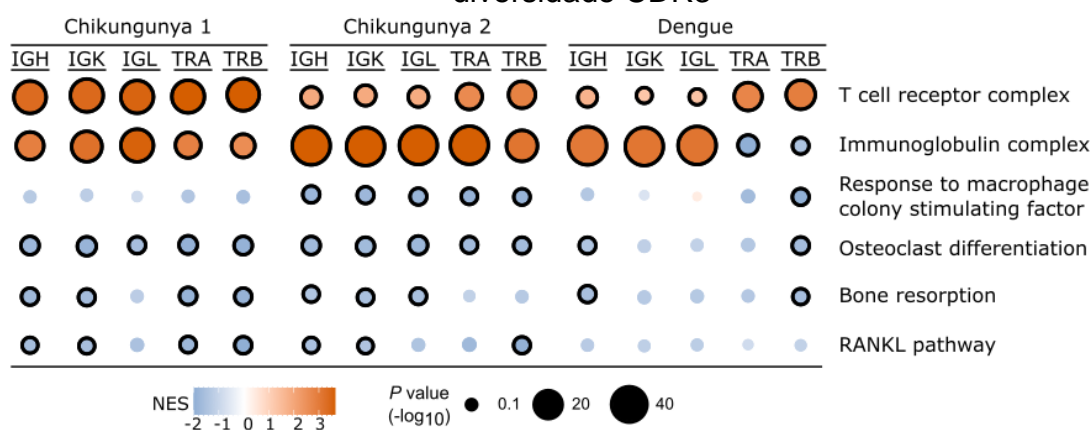


Correlação entre abundância de células B (A-C, F-H, K-M) e diversidade CDR3 das cadeias IGH (A, F, K), IGK (B, G, L) e IGL (C, H, M) e entre abundância de células T (D, E, I, J, N, O) e diversidade CDR3 das cadeias TRA (D, I, N) e TRB (E, J, O). Fonte: O autor, 2022.

#### 4.4 Enriquecimento funcional de genes

Primeiramente, foi computada a correlação de Pearson entre os valores de expressão gênica normalizados (vst) e diversidade Chao1 (para cada uma das cinco cadeias analisadas). Os valores das correlações foram utilizados para a análise de enriquecimento funcional de genes (GSEA), permitindo a identificação de conjuntos de genes que estão correlacionados, positivamente ou negativamente, à variação de diversidade do repertório imunológico das amostras.

Figura 21 – Enriquecimento funcional da correlação entre expressão gênica e diversidade CDR3



Representação do escore de enriquecimento normalizado (NES) para cada conjunto de genes analisado. Os valores de NES representam correlação negativa ou positiva entre a expressão aferida dos genes daquele conjunto com a diversidade CDR3 estimada. *T cell receptor complex* e *Immunoglobulin complex* foram incluídos como controle positivo para a diversidade de TCR e BCR, respectivamente. Círculos com borda preta indicam valor-*p* ajustado < 0.1. Fonte: O autor, 2022.

Como podemos observar na Figura 21, as vias de receptores de células T (*T cell receptor complex*) e de células B (*Immunoglobulin complex*) possuem uma forte correlação positiva com a diversidade de TRA/TRB e IGH/IGK/IGL, respectivamente, como esperado. Dentre muitos conjuntos de genes enriquecidos, chamou a atenção a presença de conjuntos negativamente correlacionados à diversidade e que estão envolvidos na diferenciação e/ou ativação de osteoclastos. De fato, o conjunto de genes envolvidos na diferenciação de osteoclastos (*Osteoclast differentiation*) está negativamente correlacionado com a diversidade de todas as cinco cadeias analisadas nos dois conjuntos de dados de Chikungunya, indicando expressão aumentada desses genes em amostras com menor diversidade aferida. As vias de

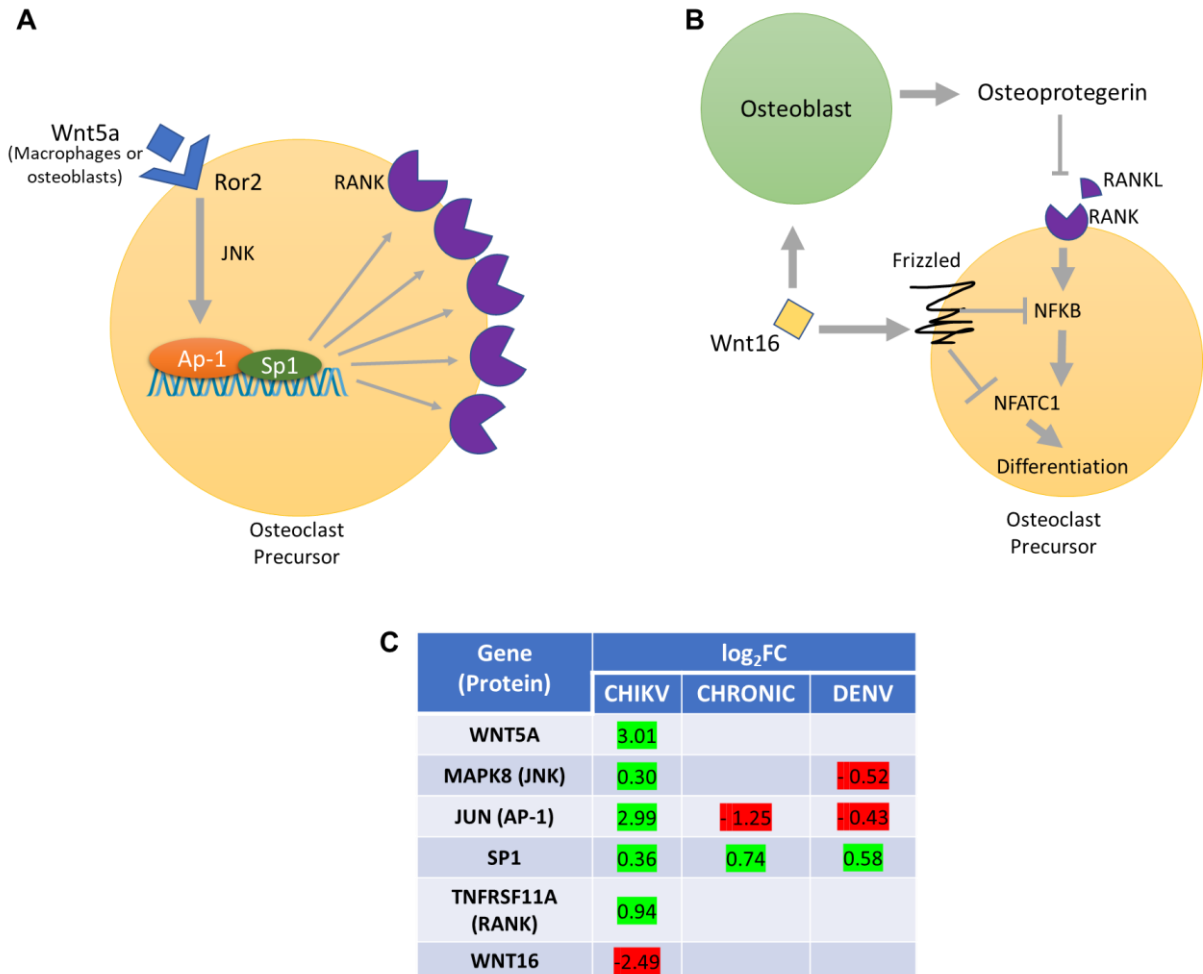
reabsorção óssea (*Bone resorption*, atividade biológica dos osteoclastos) e as vias necessárias para a diferenciação/ativação dos osteoclastos (iniciadas pela sinalização de RANKL e fator estimulante de colônias de macrófagos, M-CSF) também são correlacionadas negativamente com a diversidade e enriquecidas quase que exclusivamente em Chikungunya.

#### **4.5 Genes diferencialmente expressos na infecção por CHIKV**

Com base nos resultados de enriquecimento funcional de genes envolvidos na diferenciação de osteoclastos, foi investigado se esses conjuntos de genes correlacionados com a diversidade estariam diferencialmente expressos nos infectados em relação ao controle saudável e/ou em pacientes que desenvolveriam cronicidade quando comparados com aqueles que não.

A sinalização iniciada por Wnt5a-Ror2 contribui para o aumento da osteoclastogênese pois induz a superexpressão de TNFRSF11A, que codifica o receptor RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B) (Figura 22 A) (MAEDA *et al.*, 2012) . Em pacientes infectados por CHIKV, é possível notar um enriquecimento na expressão dos genes envolvidos nessa sinalização, incluindo o WNT5A e TNFRSF11A, em comparação a indivíduos não infectados (Figura 22 C). Esse enriquecimento não está presente em pacientes infectados por DENV (comparando a não infectados) ou pacientes infectados por CHIKV que desenvolveram cronicidade posteriormente (quando comparados aos que não desenvolveram cronicidade). Em adição, a sinalização por Wnt16 é supressora da osteoclastogênese, agindo diretamente nos precursores de osteoclastos ou induzindo a expressão de osteoprotegerina, que inibe a sinalização por RANKL (Figura 22 B) (MOVÉRARE-SKRTIC *et al.*, 2014). A expressão de WNT16 está alterada de maneira negativa e somente nos infectados por CHIKV *versus* saudáveis (Figura 22 C).

Figura 22 – Expressão de WNT5A aumentada e de WNT16 diminuída favorecem a osteoclastogênese em infectados pelo vírus Chikungunya

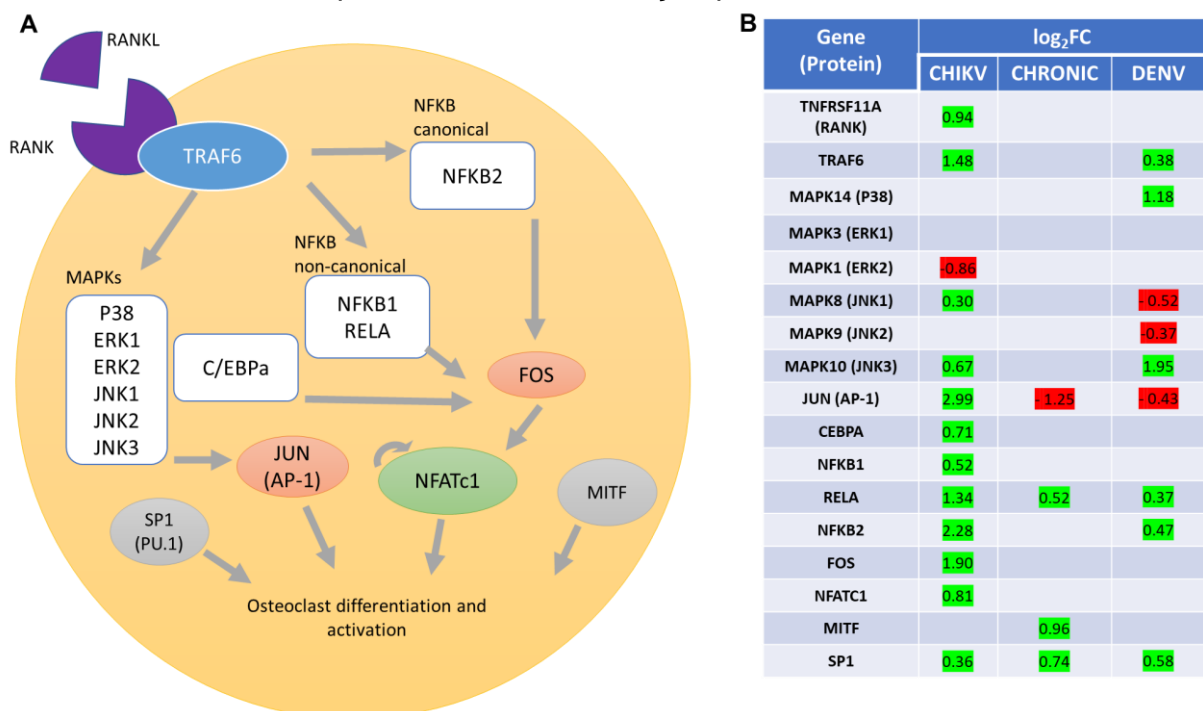


(A) A sinalização por Wnt5a aumenta a expressão de RANK em precursores de osteoclastos. (B) A sinalização por Wnt16 afeta negativamente a osteoclastogênese agindo diretamente nos precursores de osteoclastos ou induzindo a expressão de osteoprotegerina (OPG) em osteoblastos que, por sua vez, atua impedindo a sinalização pela via RANK/RANKL. (C) Valores de log<sub>2</sub> fold-change (FC) da expressão dos genes nos diferentes conjuntos de dados. CHIKV: infectados por CHIKV *versus* saudáveis. CHRONIC: infectados por CHIKV na fase aguda que desenvolveram cronicidade *versus* que não desenvolveram. DENV: infectados por DENV *versus* saudáveis. Somente mostrando valores de log<sub>2</sub>FC com valor-*p* ajustado < 0.05. Fonte: O autor, 2022.

Os sinais induzidos por RANK são essenciais para a diferenciação e ativação dos osteoclastos. A sinalização intracelular é iniciada quando o receptor RANK recruta uma família de proteínas TRAF, em especial a TRAF6 (NAITO *et al.*, 1999; WONG *et al.*, 1998). A ativação de TRAF6 em osteoclastos leva a sinalização para outras duas vias: a das MAP quinases (MAPKs) e NF-κB. A via das MAPKs induz a expressão do fator de transcrição Ap-1, enquanto ambas as vias canônicas e não-canônica do NF-κB induzem a expressão de FOS (RAMOS-JUNIOR; TAIRA; FUKADA, 2022).

Paralelamente, a sinalização por RANK induz a expressão de C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$ ) em precursores de osteoclastos (CHEN, Wei *et al.*, 2013). Em conjunto, Ap-1, FOS e C/EBP $\alpha$ , induzem a expressão e auto amplificação de NFATc1 (nuclear factor of activated T cells 1). NFATc1, em cooperação adicional com CREB e PU.1 induz a transcrição de um conjunto de outros genes responsáveis pela diferenciação e ativação de osteoclastos (TAKAHASHI; KOBAYASHI; UDAGAWA, 2020). Esses processos estão sintetizados na Figura 23A e a expressão de todos os genes pertencentes a essas vias de sinalização, com exceção de algumas MAPKs e MITF, está aumentada em um padrão consistente em pacientes infectados pelo vírus CHIKV (Figura 23B). Esse padrão não está presente em pacientes crônicos na fase aguda de CHIKF *versus* não-crônicos ou em pacientes infectados por DENV (Figura 23B).

Figura 23 – Os genes das vias de sinalização por RANK/RANKL são regulados positivamente na infecção por CHIKV



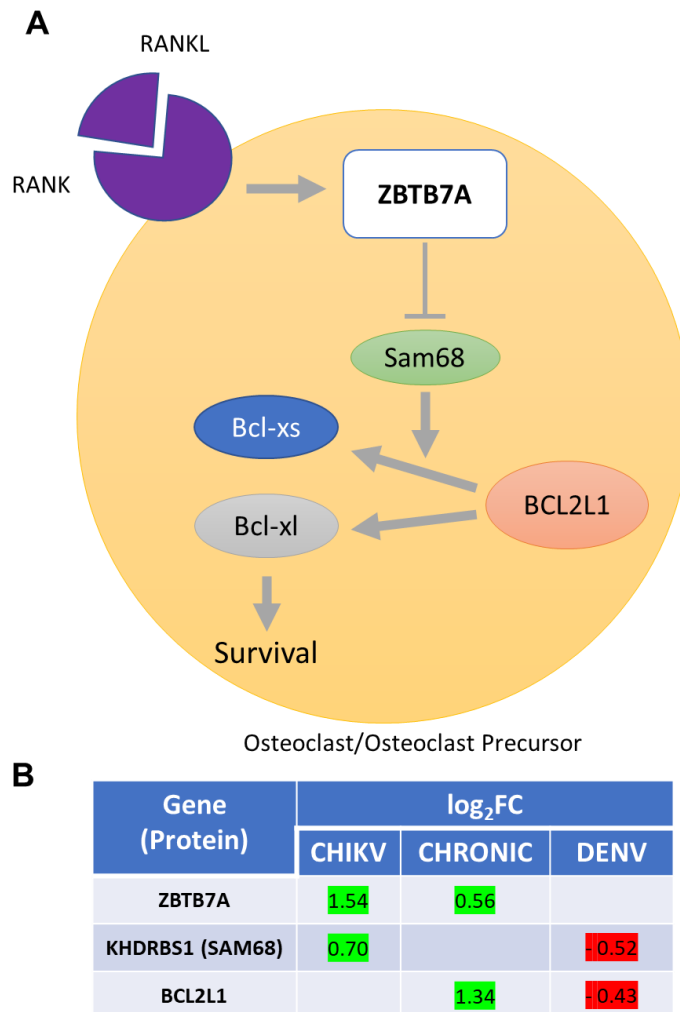
Os genes das proteínas envolvidas na sinalização por RANK/RANKL estão regulados positivamente durante a infecção por CHIKV, principalmente NFATC1, que favorece a diferenciação e ativação de osteoclastos. (A) vias de sinalização intracelular por RANK/RANKL em precursores de osteoclastos e osteoclastos. (B) Valores de log<sub>2</sub> fold-change (FC) da expressão dos genes nos diferentes conjuntos de dados. CHIKV: infectados por CHIKV *versus* saudáveis. CHRONIC: infectados por CHIKV na fase aguda que desenvolveram cronicidade *versus* que não desenvolveram. DENV: infectados por DENV *versus* saudáveis. Somente mostrando valores de log<sub>2</sub>FC com valor-*p* ajustado < 0.05. Fonte: O autor, 2022.

O receptor associado a osteoclasto (OSCAR, *osteoclast-associated receptor*) é outra molécula que induz o processo de osteoclastogênese, expressa majoritariamente em osteoclastos, mas também presente nos monócitos precursores de osteoclastos (BARROW *et al.*, 2011; KIM, N. *et al.*, 2002; MERCK *et al.*, 2006). A expressão de OSCAR está regulada positivamente em infectados por CHIKV quando comparado a indivíduos saudáveis ( $\log_2$  *fold-change*: 0.49, *p*-ajustado = 0.05) e é ainda maior durante a fase aguda em pacientes que progrediram para a fase crônica ( $\log_2$  *fold-change*: 0.86, *p*-ajustado < 0.05) e, interessante, também está aumentada na infecção por DENV ( $\log_2$  *fold-change*: 0.95, *p*-ajustado < 0.05).

Por fim, outro gene com a expressão aumentada em infectados por CHIKV e em pacientes que iriam desenvolver cronicidade, mas não em infectados por DENV, é ZBTB7A (Figura 24). A expressão desse gene em precursores de osteoclastos é induzida por sinalização via RANK e também contribui para a osteoclastogênese (KUKITA *et al.*, 2011). Além disso, a expressão de ZBTB7A nesses precursores leva a expressão de NFATc1 e também aumenta a concentração celular de Bcl-xl, uma proteína anti-apoptótica, levando a uma maior sobrevivência dessas células (XU *et al.*, 2022). Xu e colaboradores (2022) demonstraram que a diminuição da apoptose nos precursores de osteoclastos pela expressão de ZBTB7A se deve a ação da proteína Sam68 sobre o *splicing* de BCL2L1. Quando presente, Sam68 favorece o *splicing* alternativo de BCL2L1 em Bcl-xs, que é pró-apoptótica. A superexpressão de ZBTB7A diminui a concentração da proteína Sam68 (mas não a expressão gênica) por induzir a sua degradação. Na ausência de Sam68, o *splicing* alternativo de Bcl-xl é favorecido, levando a maior sobrevivência dos osteoclastos. Além disso, a expressão de ZBTB7A é aumentada por citocinas em condições inflamatórias. A expressão de ZBTB7A está regulada positivamente em infectados por CHIKV na fase aguda e é ainda maior naqueles que desenvolveram cronicidade posteriormente (Figura 24B).



Figura 24 – A expressão de ZBTB7A diminui a apoptose em células osteoclásticas e está aumentada durante a fase aguda em pacientes infectados por CHIKV que irão desenvolver cronicidade



(A) A sinalização por RANK/RANKL aumenta a expressão de ZBTB7A em osteoclastos e seus precursores. A proteína Sam68 favorece o *splicing* alternativo de BCL2L1 em Bcl-xs, uma proteína pró-apoptótica. A expressão aumentada de ZBTB7A diminui os níveis intracelulares da proteína Sam68, favorecendo o *splicing* alternativo de BCL2L1 em Bcl-xl, uma proteína anti-apoptótica. (B) Valores de log<sub>2</sub> *fold-change* (FC) da expressão dos genes nos diferentes conjuntos de dados. CHIKV: infectados por CHIKV *versus* saudáveis. CHRONIC: infectados por CHIKV na fase aguda que desenvolveram cronicidade *versus* que não desenvolveram. DENV: infectados por DENV *versus* saudáveis. Somente mostrando valores de log<sub>2</sub>FC com valor-*p* ajustado < 0.05. Fonte: O autor, 2022.

## 5. DISCUSSÃO

A análise de receptores de células B e T (item 2.1) mostrou que pacientes infectados por CHIKV apresentaram, durante a fase aguda da CHIKF, uma diversidade CDR3 reduzida de todas as cadeias analisadas (IGH, IGK, IGL, TRA e TRB) em relação a não-infectados (Figura 13). Essa diversidade é ainda menor naqueles pacientes que iriam desenvolver a forma crônica da CHIKF (Figura 14), mesmo durante a fase aguda da doença, quando ainda não se sabia qual seria o desfecho individual. Na infecção por DENV, ocorreu apenas a diminuição da diversidade de células T (Figura 15).

Existem diversos fatores que podem levar à diminuição da diversidade de receptores de linfócitos T e B. Um deles é a hiper expansão de clones após sua ativação decorrente do contato com um antígeno. Esse processo aumenta a frequência de clones específicos para combater a infecção e diminui a diversidade observada numa amostra (NIKOLICH-ŽUGICH; SLIFKA; MESSAOUDI, 2004). Esse tipo de fenômeno já foi observado em outras infecções, como na COVID-19, na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*), infecção por citomegalovírus e infecção por *Pneumocystis* (HOU *et al.*, 2021; PANTALEO *et al.*, 1994; SUN *et al.*, 2021; TRAUTMANN *et al.*, 2005). Uma outra explicação para uma diversidade observada reduzida é a menor frequência de células T e/ou B na amostra, pois os estimadores de diversidade possuem limitações para inferir a diversidade do repertório se o número de células e, conseqüentemente, *reads* em um transcriptoma são baixos (SIMON; BOTERO; SIMON, 2018).

Para entender se o fato de a diversidade estimada ser menor em pacientes infectados por CHIKV, e ainda menor naqueles que desenvolveriam a forma crônica da doença, está relacionado ao número de linfócitos presentes nas amostras, foi realizada a análise de abundância celular (item 2.2). Na figura 17 é possível observar que a abundância de células B e T (CD4+ e CD8+) é menor em infectados por CHIKV em comparação a não infectados. De fato, a linfopenia é uma característica conhecida por se apresentar na fase aguda de CHIKF (THIBERVILLE *et al.*, 2013a). Em adição, as correlações entre as cadeias IGH/IGK/IGL e abundância de células B, além de TRA/TRB e abundância de células T, indicam que a menor diversidade estimada em infectados pode ser explicada pela diminuição da abundância desses linfócitos no sangue (Figura 20). Essa inferência, entretanto, não pode ser aplicada para explicar

a menor diversidade apresentada por indivíduos que desenvolveriam a cronicidade de CHIKF. Dessa forma, a diversidade apresentada por esses pacientes é realmente menor, uma vez que não há diferença na abundância de linfócitos B e T no conjunto de dados comparando com aqueles que não desenvolveriam cronicidade (Figura 18).

O enriquecimento funcional de genes (item 2.4) permitiu investigar a possível correlação entre a menor diversidade do repertório imunológico em infectados por CHIKV, ainda menor naqueles que desenvolveriam cronicidade, e o padrão de expressão de genes que poderiam estar associados a esta diminuição ou a outros processos patológicos da CHIKF. Uma abordagem similar foi utilizada recentemente correlacionando níveis de IgA e expressão gênica no leite materno após a aplicação de uma vacina da gripe, evidenciando uma correlação positiva entre resposta de IgA e alguns conjuntos de genes, como resposta por interferon tipo I, regulação positiva de fagocitose e ativação de células B (PANNARAJ *et al.*, 2022). Analisando a infecção por CHIKV, dentre os conjuntos de genes encontrados como significativos, destacam-se aqueles envolvidos na diferenciação e ativação de osteoclastos (Figura 21). Especificamente, a expressão do conjunto de genes envolvidos na diferenciação de osteoclastos (*Osteoclast differentiation*) está negativamente correlacionada e com enriquecimento significativo (valor-*p* ajustado < 0.1) com todas as cadeias de receptores de células B e T nos dois conjuntos de dados de Chikungunya, o que não acontece na infecção por DENV. Como a diversidade em infectados e crônicos durante a fase aguda da CHIKF é menor, é possível inferir, por este resultado, que a correlação negativa entre expressão e diversidade indica maior expressão desses genes durante a CHIKF.

Além do conjunto de genes de diferenciação de osteoclastos, outros envolvidos neste mesmo processo também apresentaram correlação negativa com a diversidade em Chikungunya (Figura 21). Os conjuntos denominados de reabsorção óssea (*Bone resorption*) e RANKL (*RANKL pathway*) também aparecem enriquecidos de forma consistente e com correlação negativa com a diversidade nos dois conjuntos de dados de infecção por CHIKV, mas não por DENV. É importante ressaltar que, mesmo que houvesse enriquecimento e correlação negativa dessas vias com diversidade BCR na infecção por DENV, não seria possível inferir que a expressão desses genes está aumentada durante a infecção, uma vez que não há diferença nessa diversidade estimada entre infectados e saudáveis. Em adição, o conjunto de genes de resposta

ao fator estimulador de colônias de macrófagos também aparece com o mesmo padrão de correlação e enriquecimento em CHIKF, mas este é significativo apenas no conjunto de dados onde todos os pacientes estão infectados (Chikungunya 2, Figura 21). As vias de sinalização por M-CSF e RANKL são essenciais em mais de uma etapa da diferenciação de osteoclastos a partir de precursores da linhagem monocítica hematopoiética (TAKAHASHI; KOBAYASHI; UDAGAWA, 2020). A partir dos resultados de correlação e enriquecimento funcional, decidiu-se investigar como estava a expressão dos principais genes presentes nessas vias de forma individual (item 2.5).

Algumas das sinalizações primárias no processo de diferenciação de osteoclastos são mediadas por proteínas Wnt. As proteínas Wnt exercem, de maneira ampla, sinalização por duas vias principais: a via canônica Wnt/ $\beta$ -catenina e a via não canônica. A via canônica está relacionada a definição da diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas, enquanto a via não canônica é subdividida em via Wnt/ $Ca^{2+}$  e Wnt/JNK (LOGAN; NUSSE, 2004). A proteína Wnt5a, expressa por osteoblastos, mas também por outras células, como macrófagos e células dendríticas (KIM, J. *et al.*, 2012; SHAO *et al.*, 2016), é uma proteína Wnt não canônica que ativa ambas as subdivisões Wnt/ $Ca^{2+}$  e Wnt/JNK. Um dos receptores responsáveis por mediar o sinal de Wnt5a é Ror2, que dá continuidade à sinalização pela via JNK (OISHI *et al.*, 2003). Camundongos deficientes em Wnt5a ou Ror2 têm o processo de osteoclastogênese prejudicado (MAEDA *et al.*, 2012). Maeda e colaboradores (2012) também demonstraram que a sinalização Wnt5a-Ror2 em precursores de osteoclastos aumenta a expressão do receptor RANK nessas células pela via JNK. O aumento de RANK é uma etapa na diferenciação das células precursoras que facilita o processo de osteoclastogênese. Com exceção de Ror2, a expressão de todos os genes envolvidos nessa sinalização está regulada positivamente na infecção por CHIKV, comparando com não-infectados (Figura 22 A, C).

Outra proteína Wnt envolvida no processo de diferenciação e ativação de osteoclastos é a Wnt16. De forma contrária a Wnt5a, que favorece a osteoclastogênese, a Wnt16 atua na supressão deste processo. Wnt16 derivada de osteoblastos inibe a osteoclastogênese atuando em dois tipos celulares: nos próprios osteoblastos ou diretamente nos precursores de osteoclastos. Nos precursores de osteoclastos, através das vias de sinalização não canônicas, a sinalização por Wnt16

suprime a via de sinalização por RANKL e, conseqüentemente a expressão de NFATc1, diminuindo a osteoclastogênese. Em osteoblastos, essa proteína atua pela via canônica Wnt/ $\beta$ -catenina induzindo a expressão de OPG, que atua como um “receptor isca” (*decoy receptor*) para RANKL, desta forma diminuindo a sinalização por RANK em precursores de osteoclastos e, conseqüentemente, também a expressão de NFATc1 (MOVÉRARE-SKRTIC *et al.*, 2014). Na infecção por CHIKV, em comparação a não-infectados, além do gene WNT5A estar regulado positivamente, o gene WNT16 está regulado negativamente (Figura 22 B, C), o que beneficia um ambiente favorável à osteoclastogênese.

Considerando que o gene do receptor RANK está regulado positivamente em infectados por CHIKV, investigou-se as vias de sinalização de diferenciação de osteoclastos disparadas pela ativação deste receptor também tinham sua expressão gênica alteradas. Um fator de transcrição e importante marcador da diferenciação de osteoclastos é NFATc1, cuja expressão é induzida pela sinalização de RANK (ISHIDA *et al.*, 2002; TAKAYANAGI *et al.*, 2002). Takayanagi e colaboradores (2002) demonstraram que células precursoras deficientes em NFATc1 não são capazes de se diferenciar em osteoclastos após a estimulação por RANK. A forte indução da expressão de NFATc1 em células precursoras de osteoclastos é amparada por um processo de auto amplificação, onde esse fator de transcrição liga-se em seu próprio promotor num sistema de retroalimentação positiva. A expressão sustentada de NFATc1 leva a expressão de um conjunto de genes especializados de osteoclastos (como TRAP, catepsina K e OSCAR) (OKAMOTO *et al.*, 2017; ROOT, 2014). Em infectados por CHIKV, não só a expressão de RANK e NFATC1 está regulada positivamente, mas também os genes das vias intermediárias que levam a indução de NFATc1, como as vias canônica e não-canônica do NF-Kb e C/EBP $\alpha$  (Figura 23 A). NFATc1 atua em conjunto com outros fatores de transcrição que também favorecem a osteoclastogênese, como AP-1 e Sp1 (TAKAHASHI; KOBAYASHI; UDAGAWA, 2020), que também estão regulados positivamente na CHIKF (Figura 23 B).

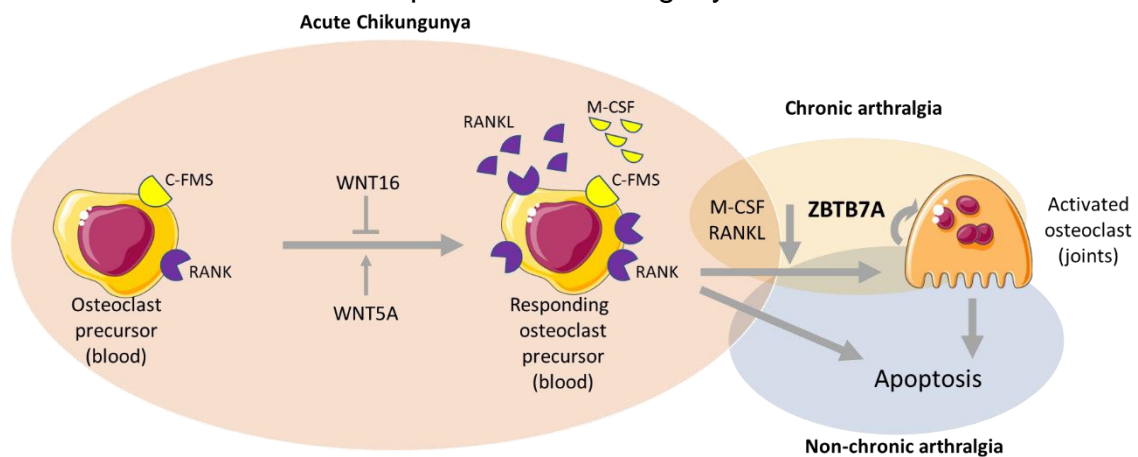
O fato de os genes presentes nas vias de diferenciação de osteoclastos estarem regulados positivamente em infectados por CHIKV oferece uma hipótese que explica os sintomas articulares experienciados na fase aguda da infecção, mas não explica a razão pela qual algumas pessoas desenvolvem a cronicidade e outras não. Estudos da osteoclastogênese *in vitro* a partir de células do sangue periférico de pacientes

com artrite reumatoide já demonstraram que nesses indivíduos o número de monócitos precursores de osteoclastos circulantes é maior, possuem maior potencial de diferenciação e são mais resistentes a apoptose (ALLARD-CHAMARD *et al.*, 2020; DURAND, Marianne *et al.*, 2013). Adicionalmente, em monócitos do sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide também é possível constatar uma maior expressão de OSCAR, comparando com controles saudáveis (HERMAN *et al.*, 2008). Nos resultados de infecção por CHIKV, também foi possível visualizar um aumento da expressão de OSCAR, o que foi ainda mais evidente nos pacientes que se tornariam crônicos.

Esses resultados em artrite reumatoide, em conjunto com os resultados obtidos no presente trabalho, nos permitem indicar a hipótese de que, em CHIKF, a cronicidade está relacionada a um maior número de precursores de osteoclastos circulantes durante a fase aguda da infecção, os quais se tornam mais resistentes a apoptose. A sobrevivência estendida desses precursores permite que estes transitem até seus sítios de diferenciação e ação – as articulações – e, desta forma, contribuam para o processo de reabsorção óssea e inflamação durante a fase crônica (Figura 25). Um dos resultados que corroboram essa hipótese é a regulação positiva dos genes envolvidos na superexpressão e sinalização por RANK, que leva ao aumento da expressão de NFATC1 e, em última instância facilitaria a osteoclastogênese em infectados por CHIKV. A diferença chave entre quem desenvolve a cronicidade ou não estaria na resistência dos precursores de osteoclastos (e os próprios osteoclastos já diferenciados) a apoptose. Corroborando essa suposição, foi verificado que a expressão de ZBTB7A está aumentada durante a fase aguda de CHIKV naqueles pacientes que iriam desenvolver cronicidade, em relação àqueles que não desenvolveriam. Isso se daria ao fato de que já foi verificado que expressão de ZBTB7A favorece o *splicing* alternativo de Bcl-xl, uma proteína anti-apoptótica (XU *et al.*, 2022). Infelizmente, não foi possível verificar qual *splicing* alternativo de BCL2L1 está sendo favorecido nos conjuntos de dados de CHIKF (embora a expressão do gene esteja aumentada nos pacientes que adentrariam a fase crônica). Entretanto, devido ao aumento da expressão de ZBTB7A, é possível inferir que seja a forma anti-apoptótica Bcl-xl. É plausível que aumento da expressão de BCL2L1 nesses pacientes seja um mecanismo celular de tentar compensar os níveis de Bcl-xs (pró-apoptótica), que estão diminuídos devido a degradação de Sam68, induzida pelo aumento da

expressão de ZBTB7A (Figura 24), o que poderia levar a níveis ainda mais altos de Bcl-xl e, conseqüentemente, de resistência a processos apoptóticos (XU *et al.*, 2022). Resilientes a apoptose, os osteoclastos podem se manter ativados por tempo indefinido, levando à inflamação e destruição das articulações. Nesse sentido, recentemente, mostrou-se que a indução por quimioterápicos de apoptose em osteoclastos é um tratamento efetivo em casos de artrite inflamatória (DENG *et al.*, 2021).

Figura 25 – Hipótese da participação de osteoclastos e seus precursores na infecção pelo vírus Chikungunya



Infecção aguda por CHIKV aumenta a expressão de genes osteoclastogênicos e progressão para cronicidade pode estar relacionada à diminuição da apoptose de osteoclastos. Fonte: O autor, 2022.

Uma possível conexão entre a menor diversidade dos receptores do repertório imunológico e a maior diferenciação de osteoclastos pode estar relacionada com a sinalização mediada por receptores de IgG (FcγR). Além da função de primária de reconhecimento e neutralização de antígenos, IgG também é conhecida por regular a atividade de células do sistema imune, como leucócitos e células NK, ao se ligar a FcγR, mediando funções de eliminação de patógenos ao estimular a fagocitose ou citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018). A ativação de FcγR acontece preferencialmente quando os anticorpos IgG estão ligados a seus antígenos, na forma de imunocomplexos. A formação de imunocomplexos, seja por reconhecimento de antígenos estranhos ou autoantígenos, pode levar ao desenvolvimento de patologias, como lúpus eritematoso sistêmico, poliarterite nodosa e doença do soro. À medida que imunocomplexos são formados

na circulação e não são eficientemente removidos por fagócitos, começam a se acumular nos leitos vasculares, glomérulos renais e articulações. Por isso, as manifestações clínicas mais comuns de patologias relacionadas a formação de imunocomplexos são vasculite, nefrite e artrite. Na artrite reumatoide, é comum a presença de anticorpos que reagem a suas próprias porções Fc, denominados fatores reumatóides, que participam na formação de imunocomplexos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2018). Estudos da osteoclastogênese envolvendo a sinalização por imunocomplexos já demonstraram que os receptores FcγR presentes em precursores de osteoclastos são ativados por complexos de IgG e potencializam o processo de diferenciação e ativação destas células (HARRE *et al.*, 2015; NEGISHI-KOGA *et al.*, 2015). É possível que, durante a fase inicial da infecção, os pacientes que irão desenvolver cronicidade em CHIKF possuam clones específicos de BCRs que, em contato com antígenos do CHIKV, sofram processo de expansão clonal. A expansão clonal dessas células e consequente maior produção de seus anticorpos pode ser a razão da diminuição da diversidade de BCR observada nestes pacientes. Em adição, é possível que esses anticorpos produzidos em resposta a infecção por CHIKV estejam formando imunocomplexos capazes de ativar a sinalização por FcγR em precursores de osteoclastos, potencializando o processo de osteoclastogênese e facilitando o desenvolvimento da fase crônica de CHIKF.

Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos a partir de dados de transcriptoma de sangue periférico total de infectados por CHIKV. Assim sendo, não é possível definir com precisão quais tipos e subtipos celulares são os responsáveis pelas alterações na expressão gênica observada, principalmente de genes que são expressos em uma variedade de células. A fim de investigar a presença e frequência de precursores de osteoclastos, bem como seus perfis de expressão durante a CHIKF, o ideal é o desenvolvimento de estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo citometria de fluxo, separação dessas células (*cell sorting*), sequenciamento de células individuais (*single cell sequencing*) e ensaios avaliando a osteoclastogênese nesse contexto.

Se a hipótese da ação de osteoclastos durante a CHIKF apresentada neste trabalho se mostrar correta, o tratamento para a fase aguda e crônica pode se beneficiar de alternativas já existentes para outras patologias. O anticorpo monoclonal denosumab foi desenvolvido para suprimir o processo de reabsorção óssea excessiva por osteoclastos. Denosumab é específico para RANKL e impede a ligação deste a



RANK, evitando o processo de diferenciação e ativação de osteoclastos (LACEY *et al.*, 2012). Se a formação de imunocomplexos também é um fator contribuinte para a ativação de osteoclastos em CHIKF, um potencial tratamento diminuir a sinalização destes (através de FcγR) é induzir a sialilação de IgG. Camundongos tratados com N-Acetilmanosamina, um precursor do ácido siálico, exibem maior sialilação de IgG. Imunocomplexos formados após a sialilação dessas IgG tem a sinalização através de FcγR comprometida, diminuindo a perda óssea derivada da osteoclastogênese (HARRE *et al.*, 2015). Por fim, o tratamento para induzir a apoptose de osteoclastos também pode ser uma alternativa, uma vez que já se demonstrou efetivo em artrite (DENG *et al.*, 2021).

## 6. CONCLUSÕES

- A infecção por CHIKV reduz a diversidade CDR3 de TCR e BCR;
- A diversidade de TCR e BCR é ainda menor durante a fase aguda da infecção por CHIKV naqueles pacientes que irão desenvolver a forma crônica da CHIKF;
- A abundância de células T e B no sangue é menor em pacientes infectados por CHIKV, mas não há diferenças entre pacientes que irão ou não desenvolver a forma crônica da CHIKF;
- A menor diversidade de BCR em infectados por CHIKV está associada a um aumento na expressão de conjunto de genes envolvidos na diferenciação e ativação de osteoclastos;
- A menor diversidade de BCR naqueles pacientes que irão desenvolver a forma crônica da CHIKF pode estar contribuindo com a formação de imunocomplexos que potencializam a diferenciação e ativação de osteoclastos;
- A expressão de genes envolvidos na diferenciação de osteoclastos, especialmente pela sinalização de RANKL, estão regulados positivamente em infectados por CHIKV;
- O gene ZBTB7A, cuja expressão em osteoclastos e seus precursores confere maior resistência dessas células a apoptose, está regulado positivamente durante a fase aguda naqueles pacientes que irão desenvolver a forma crônica da CHIKF;
- São necessários mais estudos para confirmar o envolvimento osteoclastos e seus precursores na patogênese de CHIKF e, especialmente, no desenvolvimento da cronicidade. Caso a hipótese levantada nesse trabalho se confirme, será possível adicionar abordagens terapêuticas já existentes como alternativas no tratamento de CHIKF.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. [S. l.: s. n.], 2018. v. 9th ed.

AGATHANGELIDIS, Andreas *et al.* Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. **Blood**, [s. l.], v. 119, n. 19, p. 4467–4475, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-393694>

ALBUQUERQUE, Isabella Gomes Cavalcanti de *et al.* Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 128–129, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100026>

ALLARD-CHAMARD, H. *et al.* Osteoclasts and their circulating precursors in rheumatoid arthritis: Relationships with disease activity and bone erosions. **Bone Reports**, [s. l.], v. 12, p. 100282, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2020.100282>

APPASSAKIJ, Hatsadee *et al.* Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? **Transfusion**, [s. l.], v. 53, n. 10pt2, p. 2567–2574, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03960.x>

BANDEIRA, Antonio Carlos *et al.* Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **IDCases**, [s. l.], v. 6, p. 100–103, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idcr.2016.10.007>

BARROW, Alexander David *et al.* OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 121, n. 9, p. 3505–3516, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI45913>

BAUTISTA-REYES, Eduardo *et al.* Chikungunya: Molecular Aspects, Clinical Outcomes and Pathogenesis. **Revista de investigación Clínica**, [s. l.], v. 69, n. 6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.24875/RIC.17002029>

BOLOTIN, Dmitriy A *et al.* Antigen receptor repertoire profiling from RNA-seq data. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 908–911, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.3979>. Acesso em: 18 out. 2018.

BOLOTIN, Dmitriy A. *et al.* MiXCR: Software for comprehensive adaptive immunity profiling. **Nature Methods**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 380–381, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>

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**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 654–657, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.08.005>

BOYD, S. D. *et al.* Measurement and Clinical Monitoring of Human Lymphocyte Clonality by Massively Parallel V-D-J Pyrosequencing. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 12, p. 12ra23-12ra23, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000540>

BRIGHTON, S W. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. **South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 217–218, 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6087474>

BROWN, Scott D.; RAEBURN, Lisa A.; HOLT, Robert A. Profiling tissue-resident T cell repertoires by RNA sequencing. **Genome Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 125, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0248-x>

BUTTON, Julie M *et al.* Revisiting an old friend: new findings in alphavirus structure and assembly. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 45, p. 25–33, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.06.005>

CAGLIOTI, Claudia *et al.* Chikungunya virus infection: an overview. **The new microbiologica**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 211–227, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912863>

CAMPOS, Gubio Soares *et al.* First Detection of Chikungunya Virus in Breast Milk. **Pediatric Infectious Disease Journal**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 1015–1017, 2017.

Disponível em: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001658>

CANZAR, Stefan *et al.* BASIC: BCR assembly from single cells. **Bioinformatics**, [s. l.], p. btw631, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw631>

CARRILLO-HERNÁNDEZ, Marlen Yelitza *et al.* Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC infectious diseases**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 61, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-2976-1>

CASSADOU, S *et al.* Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, [s. l.], v. 19, n. 13, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20752>

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. **Areas at Risk for Chikungunya**. [S. l.: s. n.], 2022.

CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian journal of statistics**, [s. l.], 1984.

CHEN, Wei *et al.* C/EBP $\alpha$  regulates osteoclast lineage commitment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 110, n. 18, p. 7294–7299, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1211383110>

CHEN, Weiqiang *et al.* Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 111, n. 16, p. 6040–6045, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1318859111>

CHOI, Yongwon; ARRON, Joseph R; TOWNSEND, Michael J. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. **Nature reviews. Rheumatology**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 543–548, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2009.175>

CHOW, Angela *et al.* Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor.

**The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq042>

CLEM, Angela S. Fundamentals of vaccine immunology. **Journal of Global Infectious Diseases**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 73, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0974-777X.77299>

COLWELL, R. K. *et al.* Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. **Journal of Plant Ecology**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 3–21, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jpe/rtr044>

COUDERC, Thérèse *et al.* Prophylaxis and Therapy for Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 200, n. 4, p. 516–523, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/600381>

DAVIS, Mark M.; BJORKMAN, Pamela J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. **Nature**, [s. l.], v. 334, n. 6181, p. 395–402, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/334395a0>

DE LIMA CAVALCANTI, Thaise Yasmine Vasconcelos *et al.* A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 969, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14050969>

DEEBA, Iztiba Mallik *et al.* Manifestations of Atypical Symptoms of Chikungunya during the Dhaka Outbreak (2017) in Bangladesh. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 100, n. 6, p. 1545–1548, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0122>

DELOGU, Ilenia; DE LAMBALLERIE, Xavier. Chikungunya disease and chloroquine treatment. **Journal of medical virology**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 1058–1059, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jmv.22019>

DENG, Caifeng *et al.* Targeted apoptosis of macrophages and osteoclasts in arthritic joints is effective against advanced inflammatory arthritis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 2174, 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.1038/s41467-021-](https://doi.org/10.1038/s41467-021-69)

22454-z

DJAOUD, Zakia; PARHAM, Peter. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 717–739, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-102754>

DOBIN, Alexander *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

DURAND, M *et al.* The increased in vitro osteoclastogenesis in patients with rheumatoid arthritis is due to increased percentage of precursors and decreased apoptosis - the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis (IODA) study. **Bone**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 588–596, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.10.167>

DURAND, Marianne *et al.* Monocytes from patients with osteoarthritis display increased osteoclastogenesis and bone resorption: the In Vitro Osteoclast Differentiation in Arthritis study. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 148–158, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/art.37722>

E HARRELL, Frank. **Hmisc: Harrell Miscellaneous**. Versão 4.5-0. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=Hmisc>

FINK, Katja. Can We Improve Vaccine Efficacy by Targeting T and B Cell Repertoire Convergence? **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00110>

FOELLER, ME *et al.* Chikungunya infection in pregnancy – reassuring maternal and perinatal outcomes: a retrospective observational study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, [s. l.], v. 128, n. 6, p. 1077–1086, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1471-0528.16562>

FREEMAN, J. D. *et al.* Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. **Genome Research**, [s. l.], v. 19, n. 10, p. 1817–1824, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.092924.109>

GÉRARDIN, Patrick *et al.* Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e60, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050060>

GÖERTZ, Giel P *et al.* Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. e0005654, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005654>

GORSKI, J *et al.* Circulating T cell repertoire complexity in normal individuals and bone marrow recipients analyzed by CDR3 size spectratyping. Correlation with immune status. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], 1994.

GRIFFIN, Diane E. Alphaviruses. *In*: KNIPE, David M. *et al.* (org.). **Fields Virology**. 6th. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2013.

HARRE, Ulrike *et al.* Glycosylation of immunoglobulin G determines osteoclast differentiation and bone loss. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 6651, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms7651>

HERMAN, Sonja *et al.* Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 3041–3050, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/art.23943>

HINDLEY, J. P. *et al.* Analysis of the T-Cell Receptor Repertoires of Tumor-Infiltrating Conventional and Regulatory T Cells Reveals No Evidence for Conversion in Carcinogen-Induced Tumors. **Cancer Research**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 736–746, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1797>

HIRAYAMA, T *et al.* Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, [s. l.], v. 41, n. 11, p. 1232–1239, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/41.11.1232>

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**, [s. l.], v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900255>

HOU, Xianliang *et al.* T-cell receptor repertoires as potential diagnostic markers for patients with COVID-19. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 113, p. 308–317, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.10.033>

HUANG, Bixing *et al.* Complete Coding Sequence of a Case of Chikungunya Virus Imported into Australia. **Genome announcements**, [s. l.], v. 5, n. 19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00310-17>

HUBER, Wolfgang *et al.* Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. **Nature methods**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 115–121, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252>

ISHIDA, Norihiro *et al.* Large Scale Gene Expression Analysis of Osteoclastogenesis in Vitro and Elucidation of NFAT2 as a Key Regulator. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 43, p. 41147–41156, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M205063200>

IWANAGA, Toshihiko *et al.* Morphology and Functional Roles of Synoviocytes in the Joint. **Archives of Histology and Cytology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 17–31, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1679/aohc.63.17>

IWASAKI, Akiko; MEDZHITOV, Ruslan. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.3123>

JOSSERAN, Loïc *et al.* Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. **Emerging infectious diseases**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1994–1995, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1212.060710>

KEDZIERSKA, K.; TURNER, S. J.; DOHERTY, P. C. Conserved T cell receptor usage in primary and recall responses to an immunodominant influenza virus nucleoprotein epitope. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 14, p. 4942–4947, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0401279101>

KHAN, Afjal Hossain *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **The Journal of general virology**, [s. l.], v. 83, n. Pt 12, p. 3075–3084, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3075>

KIELIAN, Margaret; CHANEL-VOS, Chantal; LIAO, Maofu. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 796–825, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v2040796>

KIM, Jungtae *et al.* Wnt5a is secreted by follicular dendritic cells to protect germinal center B cells via Wnt/Ca<sup>2+</sup>/NFAT/NF- $\kappa$ B-B cell lymphoma 6 signaling. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 188, n. 1, p. 182–189, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102297>

KIM, Nacksung *et al.* A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 195, n. 2, p. 201–209, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20011681>

KOROTKEVICH, Gennady *et al.* Fast gene set enrichment analysis. **bioRxiv**, [s. l.], p. 60012, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/060012>

KRAEMER, Moritz UG *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, [s. l.], v. 4, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>

KREJBICH-TROTOT, Pascale *et al.* Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 314–325, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.10-164178>

KUKITA, Akiko *et al.* The transcription factor FBI-1/OCZF/LRF is expressed in osteoclasts and regulates RANKL-induced osteoclast formation in vitro and in vivo. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 63, n. 9, p. 2744–2754, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/art.30455>

KUMAR, Rajesh *et al.* Antibody-based therapeutic interventions: possible strategy to counter chikungunya viral infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 104, n. 8, p. 3209–3228, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253->

020-10437-x

LABADIE, Karine *et al.* Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 894–906, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI40104>

LACEY, David L *et al.* Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. **Nature reviews. Drug discovery**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 401–419, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd3705>

LE COUPANEC, Alain *et al.* Co-Infection of Mosquitoes with Chikungunya and Dengue Viruses Reveals Modulation of the Replication of Both Viruses in Midguts and Salivary Glands of *Aedes aegypti* Mosquitoes. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 18, n. 8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18081708>

LEE, CHING HUA, Regina; MOHAMED HUSSAIN, Khairunnisa; CHU, Justin Jang Hann. Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. e0007610, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007610>

LEFRANC, M.-P. IMGT, the International ImMunoGeneTics Information System. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s. l.], v. 2011, n. 6, p. pdb.top115-pdb.top115, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.top115>

LEVY, David E; MARIÉ, Isabelle J; DURBIN, Joan E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. **Current Opinion in Virology**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 476–486, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.11.001>

LI, Bo *et al.* Ultrasensitive detection of TCR hypervariable-region sequences in solid-tissue RNA-seq data. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 482–483, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng.3820>

LIAO, Yang; SMYTH, Gordon K; SHI, Wei. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. 8, p. e47–e47, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz114>

LIBERZON, A. *et al.* Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 27, n. 12, p. 1739–1740, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr260>

LIM, Elisa X Y *et al.* Mosquitoes as Suitable Vectors for Alphaviruses. **Viruses**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v10020084>

LIU, Xiao; WU, Jinghua. History, applications, and challenges of immune repertoire research. **Cell Biology and Toxicology**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 441–457, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10565-018-9426-0>

LOGAN, Catriona Y.; NUSSE, Roel. THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 781–810, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>

LONG, Kristin M. *et al.*  $\gamma\delta$  T Cells Play a Protective Role in Chikungunya Virus-Induced Disease. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 433–443, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JVI.02159-15>

LOVE, Michael I; HUBER, Wolfgang; ANDERS, Simon. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 550, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

LUO, W. *et al.* Analysis of the interindividual conservation of T cell receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain variable regions gene in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical & Experimental Immunology**, [s. l.], v. 154, n. 3, p. 316–324, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03770.x>

MAEDA, Kazuhiro *et al.* Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 405–412, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.2653>

MANIMUNDA, Sathya P *et al.* Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 104, n. 6, p. 392–399, 2010a. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.01.011>

MANIMUNDA, Sathya P *et al.* Outbreak of chikungunya fever, Dakshina Kannada District, South India, 2008. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 83, n. 4, p. 751–754, 2010b. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0433>

MANZOOR, Khanzadi Nazneen *et al.* The global emergence of Chikungunya infection: An integrated view. **Reviews in Medical Virology**, [s. l.], v. 32, n. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/rmv.2287>

MARTÍ-CARVAJAL, Arturo *et al.* Interventions for treating patients with chikungunya virus infection-related rheumatic and musculoskeletal disorders: A systematic review. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. e0179028, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179028>

MARTINS, Ezequias B. *et al.* Chikungunya Virus Shedding in Semen: A Case Series. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 1879, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v14091879>

MASON, P.J.; HADDOW, A.J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953: An additional note on Chikungunya virus isolations and serum antibodies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 238–240, 1957. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(57\)90022-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(57)90022-6)

MAVALE, Mangala *et al.* Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [s. l.], v. 83, n. 6, p. 1242–1244, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0577>

MERCK, Estelle *et al.* Ligation of the FcRγ Chain-Associated Human Osteoclast-Associated Receptor Enhances the Proinflammatory Responses of Human Monocytes and Neutrophils. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 176, n. 5, p. 3149–3156, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3149>

MIAO, Ya-Ru *et al.* ImmuCellAI: A Unique Method for Comprehensive T-Cell Subsets

Abundance Prediction and its Application in Cancer Immunotherapy. **Advanced Science**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 1902880, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/advs.201902880>

MILES, John J; DOUEK, Daniel C; PRICE, David A. Bias in the  $\alpha\beta$  T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. **Immunology & Cell Biology**, [s. l.], v. 89, n. 3, p. 375–387, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/icb.2010.139>

MILLER, Henry E.; BISHOP, Alexander J. R. Correlation AnalyzeR: functional predictions from gene co-expression correlations. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 206, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04130-7>

MORA, Thierry; WALCZAK, Aleksandra M. Quantifying lymphocyte receptor diversity. In: DAS, Jayajit; JAYAPRAKASH, Ciriyaam (org.). **Systems Immunology**. 1. ed. Boca Raton, EUA: CRC Press, 2018. p. 183–198. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781315119847-11>

MOSE, Lisle E. *et al.* Assembly-based inference of B-cell receptor repertoires from short read RNA sequencing data with V'DJer. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 32, n. 24, p. 3729–3734, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw526>

MOSS, P. A. *et al.* Extensive conservation of alpha and beta chains of the human T-cell antigen receptor recognizing HLA-A2 and influenza A matrix peptide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 88, n. 20, p. 8987–8990, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.20.8987>

MOURAD, Omar; MAKHANI, Leila; CHEN, Lin H. Chikungunya: An Emerging Public Health Concern. **Current Infectious Disease Reports**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11908-022-00789-y>

MOVÉRARE-SKRTIC, Sofia *et al.* Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. **Nature medicine**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 1279–1288, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.3654>

MURPHY, Kenneth; WEAVER, Casey. **Janeway's Immunobiology**. 9. ed. New York: Garland Science, 2017. ISSN 0717-6163. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

NAITO, A *et al.* Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 353–362, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1999.00265.x>

NAZAROV V *et al.* **Immunarch: Bioinformatics Analysis of T-Cell and B-Cell Immune Repertoires**. Versão 0.9.0. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://immunarch.com/>

NEGISHI-KOGA, Takako *et al.* Immune complexes regulate bone metabolism through FcR $\gamma$  signalling. **Nature Communications**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 6637, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms7637>

NIKOLICH-ŽUGICH, Janko; SLIFKA, Mark K.; MESSAOUDI, Ilhem. The many important facets of T-cell repertoire diversity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 123–132, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri1292>

NORET, M. *et al.* Interleukin 6, RANKL, and Osteoprotegerin Expression by Chikungunya Virus-Infected Human Osteoblasts. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 206, n. 3, p. 455–457, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis368>

NUNES, Marcio Roberto Teixeira *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 102, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0348-x>

OISHI, Isao *et al.* The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 645–654, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00662.x>

OKAMOTO, Kazuo *et al.* Osteoimmunology: The Conceptual Framework Unifying the Immune and Skeletal Systems. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 1295–1349, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2016>

OKSENBERG, Jorge R. *et al.* Selection for T-cell receptor V $\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$  gene

rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. **Nature**, [s. l.], v. 362, n. 6415, p. 68–70, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/362068a0>

PACHOLCZYK, Rafal *et al.* Origin and T Cell Receptor Diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T Cells. **Immunity**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 249–259, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.016>

PANNARAJ, Pia S. *et al.* Molecular alterations in human milk in simulated maternal nasal mucosal infection with live attenuated influenza vaccination. **Mucosal Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 1040–1047, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00537-4>

PANTALEO, G *et al.* Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. **Nature**, [s. l.], v. 370, n. 6489, p. 463–467, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/370463a0>

PARHAM, Peter. **The Immune System**. 4. ed. [S. l.: s. n.], 2015.

PETTIT, A R *et al.* TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. **The American journal of pathology**, [s. l.], v. 159, n. 5, p. 1689–1699, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63016-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63016-7)

PHUKLIA, Weerawat *et al.* Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. **Virus Research**, [s. l.], v. 177, n. 2, p. 179–188, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.08.011>

PRICE, David A. *et al.* Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 202, n. 10, p. 1349–1361, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20051357>

QUINN, Anthony *et al.* T cells to a dominant epitope of GAD65 express a public CDR3 motif. **International Immunology**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 967–979, 2006. Disponível em:



<https://doi.org/10.1093/intimm/dxl033>

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2020.

RAJAPAKSE, Senaka; RODRIGO, Chathuraka; RAJAPAKSE, Anoja. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 104, n. 2, p. 89–96, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.07.031>

RAMACHANDRAN, V *et al.* Persistent arthralgia among Chikungunya patients and associated risk factors in Chennai, South India. **Journal of postgraduate medicine**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 3–6, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0022-3859.128795>

RAMOS-JUNIOR, Erivan S.; TAIRA, Thaise M.; FUKADA, Sandra Y. Bone—From macrophage to osteoclast and osteolytic diseases. *In: MACROPHAGES IN THE HUMAN BODY*. [S. l.]: Elsevier, 2022. p. 161–180. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821385-8.00011-1>

RICHARD J. KUHN. Togaviridae. *In: KNIPE, David M. et al. (org.). Fields Virology*. 6th. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2013.

ROBINSON, Marion C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. I. Clinical Features. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 28–32, 1955. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90080-8)

ROOT, Allen W. Disorders of calcium and phosphorus homeostasis in the newborn and infant. *In: PEDIATRIC ENDOCRINOLOGY*. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 209-276.e1. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4858-7.00017-2>

RUEDA, Juan C. *et al.* Human Genetic Host Factors and Its Role in the Pathogenesis of Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 9, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.654395>

RUIZ SILVA, Mariana *et al.* Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells. **Scientific reports**, [s. l.], v. 6, p. 32288, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep32288>

SAINZ-PEREZ, Alexander *et al.* The T-cell Receptor Repertoire of Tumor-Infiltrating Regulatory T Lymphocytes Is Skewed Toward Public Sequences. **Cancer Research**, [s. l.], v. 72, n. 14, p. 3557–3569, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0277>

SALES, Gabriella Maria Pitt Gameiro *et al.* Treatment of chikungunya chronic arthritis: A systematic review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 63–70, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.01.63>

SAMBRI, Vittorio *et al.* The 2007 epidemic outbreak of Chikungunya virus infection in the Romagna region of Italy: a new perspective for the possible diffusion of tropical diseases in temperate areas? **The new microbiologica**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 303–304, 2008.

SAÚDE, Ministério da. **Chikungunya: clinical management**. 1st. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.

SAÚDE, Ministério da. **Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 47 de 2022**. Brasília, DF: [s. n.], 2022.

SCHILTE, Clémentine *et al.* Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e2137, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137>

SCHOCH, Conrad L. *et al.* NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. **Database**, [s. l.], v. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

SHAO, Yue *et al.* Biological functions of macrophage-derived Wnt5a, and its roles in human diseases. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 41, p. 67674–67684, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11874>

SILVA, José V.J. *et al.* A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology,

clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 188, p. 213–224, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.003>

SIMIZU, B *et al.* Structural proteins of Chikungunya virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 254–258, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.51.1.254-258.1984>

SIMON, Joel S; BOTERO, Sergio; SIMON, Sanford M. Sequencing the peripheral blood B and T cell repertoire - Quantifying robustness and limitations. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 463, p. 137–147, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.10.003>

SING, G. A molecular comparison of T lymphocyte populations infiltrating the liver and circulating in the blood of patients with chronic hepatitis B: Evidence for antigen-driven selection of a public complementarity-determining region 3 (CDR3) motif. **Hepatology**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1288–1298, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.24026>

SIX, Adrien *et al.* The Past, Present, and Future of Immune Repertoire Biology – The Rise of Next-Generation Repertoire Analysis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 4, n. NOV, p. 1–16, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00413>

SOARES-SCHANOSKI, Alessandra *et al.* Systems analysis of subjects acutely infected with the Chikungunya virus. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. e1007880, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007880>

STUBBINGTON, Michael J T *et al.* T cell fate and clonality inference from single-cell transcriptomes. **Nature Methods**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 329–332, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3800>

SUBRAMANIAN, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>

SUN, Han *et al.* Signatures of B Cell Receptor Repertoire Following Pneumocystis

Infection. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636250>

TAKAHASHI, Naoyuki; KOBAYASHI, Yasuhiro; UDAGAWA, Nobuyuki. Osteoclasts. *In*: PRINCIPLES OF BONE BIOLOGY. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 111–131. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814841-9.00005-1>

TAKAYANAGI, Hiroshi *et al.* Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. **Developmental Cell**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 889–901, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00369-6](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00369-6)

THIBERVILLE, Simon-Djamel *et al.* Chikungunya Fever: A Clinical and Virological Investigation of Outpatients on Reunion Island, South-West Indian Ocean. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. e2004, 2013a. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002004>

THIBERVILLE, Simon-Djamel *et al.* Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral research**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>

TRAUTMANN, Lydie *et al.* Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 175, n. 9, p. 6123–6132, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.6123>

TSALIK, Ephraim L *et al.* The Host Response to Viral Infections Reveals Common and Virus-Specific Signatures in the Peripheral Blood. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 12, p. 741837, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.741837>

UMEMURA, T. *et al.* Analysis of T cell repertoire in the liver of patients with chronic hepatitis C. **Clinical & Experimental Immunology**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 120–126, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01274.x>

VAN AALST, Mariëlle *et al.* Long-term sequelae of chikungunya virus disease: A systematic review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 15, p. 8–22, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2017.01.004>

VIDAL, Emily Raquel Nunes *et al.* Epidemiological burden of Chikungunya fever in Brazil, 2016 and 2017. **Tropical Medicine & International Health**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 174–184, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tmi.13711>

VOSS, James E *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, [s. l.], v. 468, n. 7324, p. 709–712, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature09555>

WANG, C. *et al.* High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 107, n. 4, p. 1518–1523, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0913939107>

WAUQUIER, Nadia *et al.* The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 204, n. 1, p. 115–123, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq006>

WEINSTEIN, J. A. *et al.* High-Throughput Sequencing of the Zebrafish Antibody Repertoire. **Science**, [s. l.], v. 324, n. 5928, p. 807–810, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1170020>

WONG, B R *et al.* The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 273, n. 43, p. 28355–28359, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28355>

XU, Xianghe *et al.* Leukemia/lymphoma-related factor (LRF) or osteoclast zinc finger protein (OCZF) overexpression promotes osteoclast survival by increasing Bcl-xl mRNA: A novel regulatory mechanism mediated by the RNA binding protein SAM68. **Laboratory Investigation**, [s. l.], v. 102, n. 9, p. 1000–1010, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41374-022-00792-w>

YACTAYO, Sergio *et al.* Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 214, n. suppl 5, p. S441–S445, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw390>