



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

YAN CHARLES DA SILVA BASTOS

NÍVEIS SÉRICOS DE IP-10, IL-8, MCP-1 E MIG E
DADOS LABORATORIAIS EM PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA FEBRE
CHIKUNGUNYA COM E SEM ARTRITE REUMATOIDE

RECIFE
2022

YAN CHARLES DA SILVA BASTOS

**NÍVEIS SÉRICOS DE IP-10, IL-8, MCP-1 E MIG E
DADOS LABORATORIAIS EM PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA FEBRE
CHIKUNGUNYA COM E SEM ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, área de concentração Medicina Tropical, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.

Coorientadora: Dr.^a Juliana Prado Gonçalves

RECIFE

2022

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

B327n	Bastos, Yan Charles da Silva Níveis séricos de IP-10, IL-8, MCP-1 e MIG e dados laboratoriais em pacientes na fase crônica da febre chikungunya com e sem artrite reumatoide / Yan Charles da Silva Bastos. – 2022. 45 f.; il. Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho. Coorientadora: Juliana Prado Gonçalves. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2022. Inclui referências, apêndice e anexo. 1. <i>Febre de chikungunya</i>. 2. Quimiocinas. 3. Artrite. I. Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (orientadora). II. Gonçalves, Juliana Prado (coorientadora). III. Título. 616.9792 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 - 234)
-------	--



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

YAN CHARLES DA SILVA BASTOS

**NÍVEIS SÉRICOS DE IP-10, IL-8, MCP-1 E MIG E
DADOS LABORATORIAIS EM PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA FEBRE
CHIKUNGUNYA COM E SEM ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, área de concentração Medicina Tropical, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Aprovado em: 29/04/2022.

BANCA EXAMINADORA:

Profª. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Heytor Victor Pereira da Costa Neco (Examinador Externo)

Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ (UFPE)

Profª. Dra. Andrea Nazaré Monteiro Rangel da Silva (Examinadora Externa)

Universidade Federal do Pará (UFPA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte dessa longa batalha, aos amigos, familiares e profissionais, com os quais tive a honra de aprender, trabalhar e receber incentivos morais que, com garantia, me ajudaram no processo e na conclusão deste trabalho.

Agradeço em especial as minhas orientadoras Prof^a Rosangela Coêlho, e Dr. Juliana Prado, pela paciência em buscar comigo o desenvolvimento tanto científico quanto profissional. Pois, apesar dos balanços, acreditaram em mim e na minha capacidade de construir os pilares, mesmo com tantos conflitos.

Aos amigos e familiares que são os principais pilares da força emocional. Independente do tempo ou momento.

A UFPE, CNPq e a Pós-graduação em Medicina Tropical com os quais, tanto burocraticamente quanto financeiramente, esse trabalho e pesquisa dependia para ser processado.

E agradeço por fim a Deus por mais esse combate vencido, sei que muitos outros virão.

“Árvore nenhuma cresce em direção ao céu, se suas raízes também não se estenderem até o inferno” (JUNG, 2011, p. 78).

RESUMO

O vírus chikungunya (CHIKV) pertencente à família *Togaviridae*, ao gênero *alfavírus*, causador da febre de chikungunya (CHIKF). A doença cursa com sintomas inespecíficos podendo evoluir com artralgia e/ou artrite, nos casos agudos e/ou crônicos. A persistência crônica da CHIKF está associada ao aumento, ou redução, dos níveis de fatores imunes, como as quimiocinas, envolvidas no processo inflamatório. O objetivo do estudo foi associar os níveis séricos das quimiocinas: CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 em pacientes com CHIKF e correlacionar seus níveis com as variáveis laboratoriais: contagem de leucócitos, proteína C reativa (PCR) e fator reumatoide (FR). Foram avaliados três grupos: pacientes com CHIKF sem artrite reumatoide (n=45), pacientes com CHIKF crônica com artrite reumatoide (n=43) e pacientes com artrite reumatoide (AR) sem o CHIKV (n=38), acompanhados no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. A pesquisa do anti-CHIKV (IgG) foi realizada pelo método ELISA no Setor de Virologia do Instituto de Pesquisa Keizo-Asami (iLIKA/UFPE), e as quimiocinas dosadas no Setor de Imunopatologia do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ-PE) pela técnica de citometria de fluxo. Houve associação entre as medianas dos níveis séricos de CXCL10 do grupo CHIKF sem AR e os grupos CHIKF com AR ($p=0.0076$) e o grupo só com AR ($p=0.0016$). As medianas dos níveis séricos de IL-8 foram maiores entre o grupo CHIKF sem AR e o grupo só com AR ($p=0.0017$). Os níveis de CCL2 e CXCL9 não se mostraram diferentes entre os grupos. Houve correlação positiva intermediária ($r= +0,49$) dos níveis séricos de CXCL10 com a PCR no grupo CHIKF com AR, e correlação positiva fraca ($r= +0,33$) dos níveis de CCL2 com FR e correlação negativa intermediária nos níveis séricos de CXCL9 com contagem de leucócitos ($r= -0,40$), ambos no grupo só com AR. Em conclusão, avaliando os resultados fica evidente o quão é difícil termos um perfil de dosagem desses fatores imunes que consista num padrão indicativo de cronicidade da doença, uma vez que há influências que interferem esses níveis.

Palavras-chaves: febre de chikungunya; quimiocinas; artrite.

ABSTRACT

The chikungunya virus (CHIKV) belonging to the family *Togaviridae*, to the *alphavirus* genus, causes chikungunya fever (CHIKF). A disease that courses with nonspecific symptoms can evolve with arthralgia and/or arthritis, in acute cases and/or diseases. The chronic persistence of CHIKF is associated with an increase or decrease in the levels of immunological factors, such as chemokines, involved in the inflammatory process. The objective of the study was associated with the serum levels of the chemokines: CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 in patients with CHIKF and correlating their levels with laboratory variables: leukocyte count, C-reactive protein (CRP) and rheumatoid factor (FR). There were three groups of patients: chronic CHIKF without rheumatoid arthritis (n=45), chronic CHIKF with rheumatoid arthritis (n=43) and rheumatoid arthritis (RA) without CHIKV (n=38), followed up at the Rheumatology Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco. The investigation of anti-CHIKV (IgG) was performed by the ELISA method in the Virology Sector of the Keizo-Asami Research Institute (iLIKA/UFPE), and the chemokines were dosed in the Immunopathology Sector of the Aggeu Magalhães Institute (FIOCRUZ-PE) by the technique of flow cytometry. There was an association between the medians of serum CXCL10 levels in the CHIKF group without RA and the CHIKF groups with RA ($p=0.0076$) and the group with RA alone ($p=0.0016$). Median serum IL-8 levels were higher between the CHIKF group without RA and the group with RA alone ($p=0.0017$). CCL2 and CXCL9 levels were not different between groups. There was an intermediate positive correlation ($r=+0.49$) of CXCL10 serum levels with CRP in the CHIKF group with RA, and a weak positive correlation ($r=+0.33$) of CCL2 levels with RR and an intermediate negative correlation in the levels serum CXCL9 with leukocyte count ($r= -0.40$), both in the RA-only group. In conclusion, evaluating the results, it is evident how difficult it is to have a dosage profile of these immune factors that consists of a pattern indicative of the chronicity of the disease, since there are influences that interfere with these levels.

Keywords: chikungunya fever; chemokines; arthritis

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Representação das estruturas morfológicas e genoma do CHIKV.....14

Figura 2 – Mostra os ciclos de transmissão do CHIKV, através dos vetores.....15

Artigo

Figura 1 – Concentrações séricas da CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10.....28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT – Aspartato Aminotransferase

AST – Alanina Aminostransferase

AR – Artrite

CHIKV – Vírus da Chikungunya

CHIKF – Febre da Chikungunya

CMV – Citomegalovírus

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IL – Interleucina

IPCS - Infecção Primária de Corrente Sanguínea

LIKA - Laboratório de Immunopatologia Keizo-Asami

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – Proteína C reativa

FR – Fator Reumatóide

PNSP – Programa Nacional de Segurança do Paciente

RNA – Ácido Ribonucléico

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO VÍRUS CHIKUNGUNYA.....	15
2.2	TRANSMISSÃO, EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DO VÍRUS CHIKUNGUNYA.....	15
2.3	DIAGNÓSTICO DA FEBRE CHIKUNGUNYA.....	17
2.4	ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E REUMATOLÓGICAS NA FEBRE CHIKUNGUNYA.....	18
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVO SECUNDÁRIO.....	21
4	METODOLOGIA.....	22
4.1	DESENHO, POPULAÇÃO E LOCAIS DE ESTUDO.....	22
4.1.1	Critérios de inclusão.....	22
4.1.2	Critérios de exclusão.....	22
4.2	COLETA DE DADOS E AMOSTRAS.....	22
4.3	TESTE ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTI-CHIKV (IGG).....	23
4.4	DOSAGEM DAS QUIMIOCINAS.....	23
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
4.6	ASPECTOS ÉTICOS.....	23
5	RESULTADOS.....	24
6	CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO.....	32
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32

REFERÊNCIAS.....	33
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	40
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA.....	42

1 INTRODUÇÃO

Na infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV), o principal sintoma associado é a febre chikungunya (CHIKF), que, além de causar sintomas inespecíficos, pode levar a sintomas progressivos de desordem articular, como artralgia e/ou artrite, nos casos agudos e/ou crônicos (BRASIL, MINISTÉRIO da SAÚDE, 2017). Estudos mostram que fatores imunológicos podem influenciar na imunopatologia da doença, como quimioninas e citocinas (NG L. et al., 2009; DEEBA F. et al., 2015).

Há seis principais quimioninas envolvidas no mecanismo da CHIKF a saber: proteína-10 induzida por interferon- γ (IP-10/CXCL10), monócina induzida por interferon- γ (MIG/CXCL9), proteína-1 quimioatraente de monócito (MCP-1/CCL2), interleucina-8 (IL-8), proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α /CCL3), proteína inflamatória de macrófagos-1b (MIP-1b/CCL4) e a regulado na ativação de células T normais expressas e secretadas (RANTES/CCL5), e a ação imunológica, seja por aumento ou redução, dessas quimioninas estão associadas ao desfecho desfavorável da CHIKF (NG L. et al., 2009; REDDY V. et al., 2014; CHANG et al., 2018; NINLA-AESONG P., MITARNUN W. and NOIPHA K., 2019).

No estudo de NG L. et al., (2009) foi observado que durante fase aguda da CHIKF, entre 2º e 19º dias de sintomatologia, os pacientes apresentaram níveis elevados da CXCL10 e CXCL9, devido a uma ação anti-inflamatória por eliminação do vírus da circulação. Enquanto CCL2, CCL3 e CCL4 permaneceram em níveis normais e os níveis da CCL5 encontravam-se diminuídos, principalmente em pacientes graves.

Chaaithanya K. I. et al., (2011), observaram em pacientes com CHIKF recuperados, CHIKF aguda e crônica, um grande aumento no nível de CXCL10 e um aumento moderado no nível de CXCL9 em pacientes agudos. Os níveis de IL-8 e CCL2 foram mais elevados em pacientes com artrite crônica.

No entanto, Reddy V. et al., (2014) pacientes com CHIKF que apresentavam carga viral alta, os níveis de CXCL10, CXCL9 e CCL2 encontravam-se mais elevados, quando comparados aos pacientes com carga viral baixa. Além disso, os níveis dessas duas últimas quimioninas ainda permaneciam elevadas nos quatro casos de artralgia persistente. Foi observado ainda que os níveis do CCL5 estavam diminuídos, como também relatado no estudo de NG. L et al. 2009, nos grupos com alta e baixa carga viral, e nos quatro casos de artralgia persistente.

Contrariamente, Chang A. et al. (2018) pesquisaram a presença do CHIKV no líquido sinovial em pacientes com sintomas de artrite crônica persistente, além da análise dos níveis de quimiocinas CCL5, CCL3 e CCL4, os quais os autores não encontraram alteração em comparação ao grupo controle saudável.

Contudo, foram encontrados níveis elevados de CCL3 e CCL4 e, principalmente, CCL2 nos casos graves, em um estudo realizado em 2019, por Ninla-aesong, P., Mitarnun W. and Noipha K., analisando casos graves e não graves da CHIKF, após cinco anos da infecção. Os autores concluíram que o CCL2, associado a outras citocinas, pode estimular a artralgia crônica, acentuando a redução de CCL5 nos casos graves.

Todas as pesquisas apontam que níveis reduzidos de CCL5, podem ser considerados um potencial marcador de gravidade na CHIKF (NG L. et al., 2009; HOARAU J. ET AL., 2010; NINLA-AESONG P., MITARNUN W. and NOIPHA K., 2019).

Considerando que, a maioria dos estudos investigaram os níveis de quimiocinas nos pacientes com CHIKF na fase aguda, estudos com pacientes de vários níveis de gravidade e de estágio da doença são necessários para confirmar o papel da resposta imune em patologias articulares crônicas observadas na infecção por CHIKV (CHIRATHAWORN C., CHANSAENRO J. and POOVORAWAN Y., 2020).

Portanto, esse estudo associou os níveis séricos de CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 em pacientes na fase crônica da febre Chikungunya com e sem artrite reumatóide, e correlacionou com os dados laboratoriais (proteína C reativa, fator reumatoide e a contagem de leucócitos).

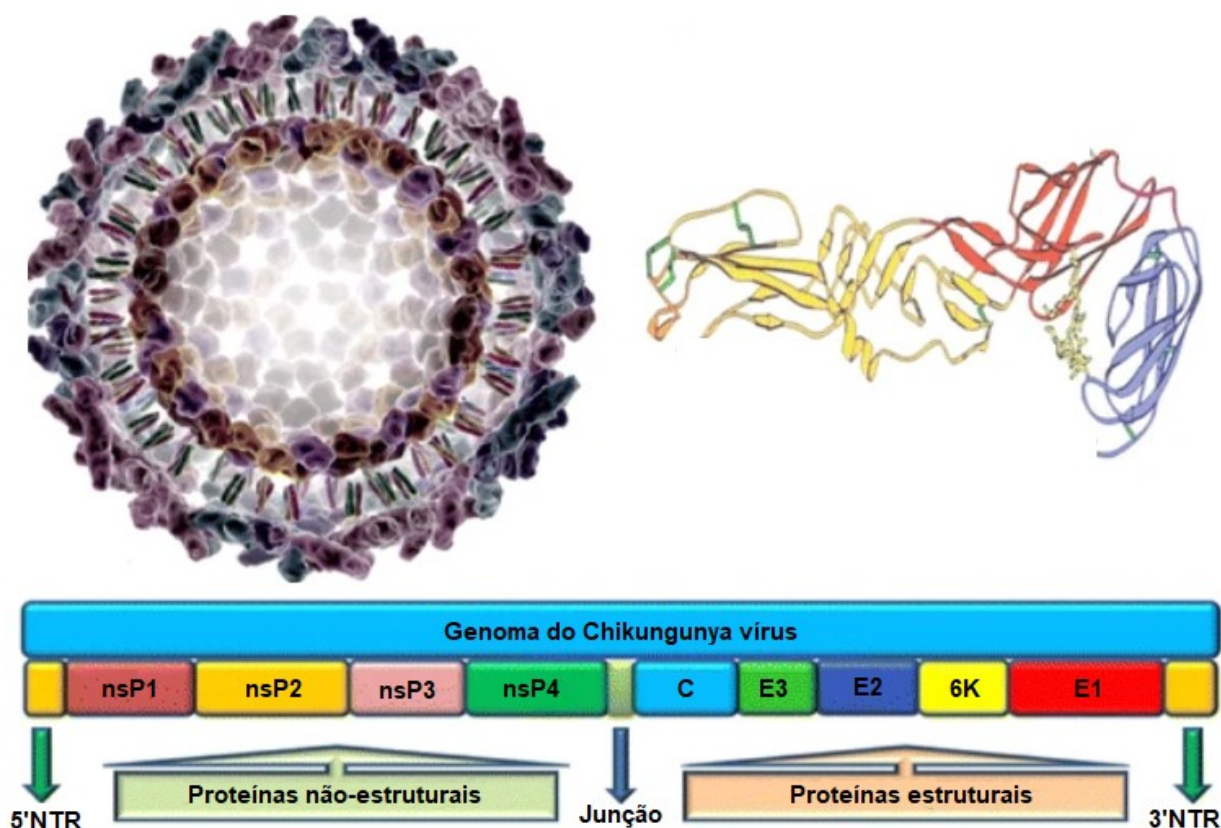
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CHIKV

O CHIKV foi isolado pela primeira vez em 1953, durante o primeiro surto urbano ocorrido, numa epidemia que eclodiu na Tanzânia. O nome chikungunya deriva da postura “curvada” adotada pelos nativos da região, durante crises de dores severas nas regiões articulares (H. W. LUMSDEN, 1953; ROBINSON M. C. 1955).

O CHIKV é um alphavírus pertencente à família Togaviridae (REGENMORTEL V. et al., 2000) Como todo alphavírus, possui capsídeo de diâmetro de 60-70nm, e envelope esférico, contendo um genoma de RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 12kb, codificando quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) e três proteínas estruturais (C, E1, E2) (STRAUSS AND STRAUSS, 1994)(Figura 1).

Figura 1. Representação da estrutura morfológica e genoma do CHIKV.



Fonte: Adaptado de SCHUFFENECKER I. et. al., 2006.

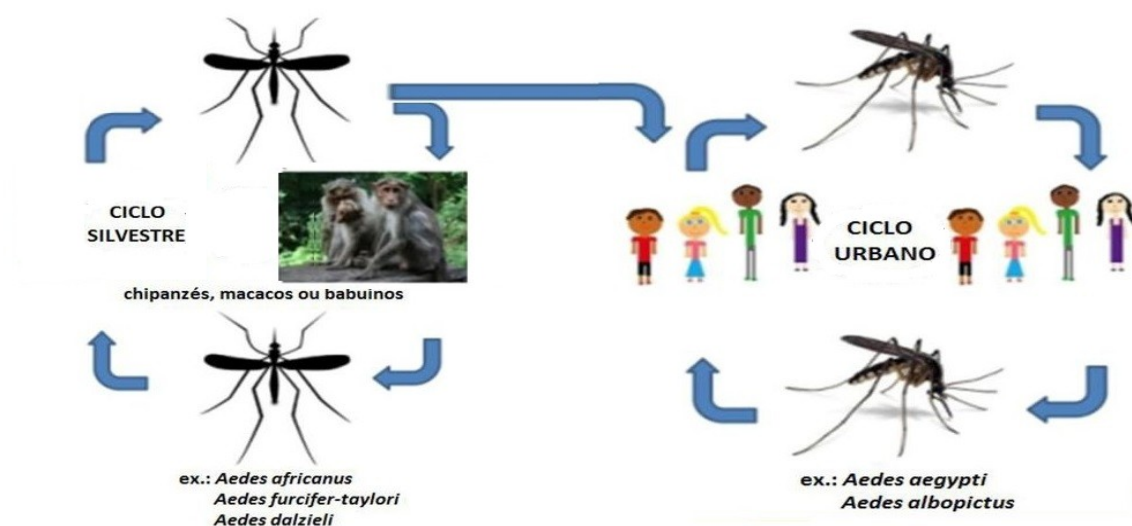
Seu genoma tem uma região curta 5' não traduzida e uma região mais longa 3' não traduzida, composto por estruturas *stem-loop* e repetições diretas que podem estar associadas à adaptação do vírus aos vetores hospedeiros (CHEN R. et al., 2013).

Possuem um ciclo replicativo rápido e são sensíveis a dissecação e temperaturas acima de 58° C (KHAN et al., 2002) (Figura 2). O CHIKV possui quatro genótipos identificados até então: o West Africa (WA) da África Ocidental, o ECSA (África Oriental, Central e Sul), o genótipo Ásia e o Oceano Índico (IO). (SCHUFFENECKER I. 2006; VAN BORTEL et al., 2014;).

2.2 TRANSMISSÃO, EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DO CHIKV

CHIKV pode ser transmitido pela picada de mosquitos *Aedes aegypti* e/ou *Aedes albopictus* em dois diferentes ciclos: zonas urbanas e/ou zonas rurais e silvestre. O *Aedes aegypti*, é o principal vetor humano em zonas urbanas, estando distribuído principalmente na África, América e Ásia. (SINGH S. and UNNI S., 2011; HIGGS S. and VANLANDINGHAM D., 2015) (figura 3).

Figura 2. Representação dos ciclos de transmissão do CHIKV.



Fonte: Adaptado de THIBOUTOT M. et al., 2010

A transmissão pelos *Aedes albopictus* foi descoberta em 2005, devido o mosquito ser responsável por uma epidemia nas Ilhas Reunion, e por surtos nas ilhas do Oceano Índico e casos na Europa, nos quais estudos filogenéticos encontraram uma única mutação no gene E1 do envelope viral, responsável pelo aumento da aptidão do CHIKV

em infectar o *Aedes albopictus* (TSETSARKIN K. A et al. 2007; TSETSARKIN K. A. et al. 2011; SAVAGE H. et al. 2015). Contudo, além da picada do mosquito infectado, pode ocorrer também a transmissão por via vertical, aos neonatos (NGOAGOUNI et al., 2017).

As preocupações com a dispersão e estabelecimento do CHIKV nas Américas e em outros países cresceram principalmente a partir de 2011, quando um surto, com mais de 11.000 casos, ocorreu na República Democrática do Congo. Em 2013, a disseminação dos casos com transmissão autóctone ocorreu em vários países do Caribe, e em janeiro de 2014 foram detectados os primeiros casos em países da área continental da América Central e Sul (BRASIL, 2015; BOLETIM Volume 47 N° 34 – 2016). Até julho de 2021, foram notificados 63.713 casos prováveis (30 casos por 100 mil habitantes) no Brasil. Tendo as regiões Nordeste e Sudeste apresentadas as maiores taxas de incidência, 67,8 casos/100 mil habitantes e 25,1 casos/100 mil habitantes, respectivamente. Confirmados sete óbitos no país em 2021 (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO Volume 52 N° 28 – 2021). Pernambuco está entre os municípios do Nordeste que apresentam altas taxas de incidência para CHIKV, com 182 casos por 100mil habitantes e um total de 17.502 casos, até julho de 2021 (BOLETIM EPIDEMIOLOGICO Volume 52 N° 28 – 2021).

Em relação à patogênese, a CHIKF é caracterizada por febre alta ($>39^{\circ}\text{C}$), dor de cabeça, rash maculopapular, eritema e uma poliartralgia debilitante com período de incubação de 3-7 dias. Sendo a poliartralgia e mialgia associadas, geralmente, é o que a distingue de outras infecções como a dengue. A CHIKF também é comumente associada com plaquetopenia, linfopenia e elevados níveis de transaminases (BORGHERINI G. et al., 2007; SUHRBIER A, JAFFAR-BANDJEE M. and GASQUE P. et al., 2012; MINER J.J et al., 2015). Os sintomas menos comuns incluem manifestações oculares como conjuntivite, uveíte, episclerite e retinite (MAHENDRADAS P., AVADHANI K. and SHETTY R., 2013)

Durante a fase aguda (3 a 10 dias), podem surgir hipermelanose, hiperpigmentação, fotossensibilidade, dermatite esfoliativa, vesículas, bolhas, lesões vasculares, exacerbação de dermatoses preexistentes como psoríases e ulceração de mucosa, além de sintomas digestivos como diarreia, vômito, náusea ou dor abdominal. Com a evolução da doença, o paciente entra na fase subaguda que pode persistir por até 3 meses, com desaparecimento da febre, podendo haver agravamento ou

persistência da artralgia. (SANTOS et al., 2015; BRASIL, MINISTÉRIO da SAÚDE, 2017).

A fase crônica é caracterizada pela persistência dos sintomas da fase aguda e subaguda, principalmente pela presença de dor articular, musculoesquelética e neuropática. Alguns fatores de risco são apontados como principais durante esta fase, como idade acima de 45 anos, com significância maior no sexo feminino, desordem articular preexistente e maior intensidade das lesões articulares na fase aguda. Podendo cursar com ou sem edema, limitação de movimento, deformidade e ausência de eritema (BRASIL, MINISTÉRIO da SAÚDE, 2017).

2.3 DIAGNÓSTICO DA CHIKF

Em pacientes com suspeita clínica de CHIKF na fase aguda, a avaliação da linfopenia é o achado hematológico mais frequente na CHIKF, sendo mais intensa na fase virêmica (WAVER S. and LECUIT M., 2015). Há elevação da proteína C reativa (PCR), e avaliação das enzimas hepáticas: creatinina e glicemia de jejum, a depender das comorbidades e sinais de gravidade associados (WAVER S. and LECUIT M., 2015) e uso de fármacos, especialmente em pacientes idosos (SIMONS F. et al. 2014). CRUZ L.; FRUTUOSO L., 2017). Na fase crônica, é de suma importância avaliar a situação do paciente antes de introduzir a terapia, sendo solicitados os marcadores para: vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus da hepatite C (HCV), citomegalovirus (CMV), vírus da hepatite B (HBV), *Toxoplasma gondii* entre outros microrganismos, além de raio-X de tórax (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2015; SANTELLI A., CRUZ L.; FRUTUOSO L., 2017).

O diagnóstico laboratorial específico do CHIKV, padrão-ouro, é o isolamento viral. O RNA viral é detectado pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real quantitativa (qPCR) e a reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) (MATHEW et al., 2017; SANTELLI A., CRUZ L., FRUTUOSO L., 2017). Além das técnicas moleculares podem ser realizadas a pesquisa de anticorpos específicos anti-CHIKV(IgM) e anti-CHIKV(IgG) através da técnica imunoenzimática (ELISA) (MATHEW et al., 2017; SANTELLI A., CRUZ L., FRUTUOSO L., 2017).

2.4 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS E REUMATOLÓGICAS DA CHIKF

As citocinas e quimiocinas são importantes mediadores imunológicos que conduzem as respostas imunes. As quimiocinas controlam os padrões migratórios e o posicionamento de todas as células imunológicas (NG. et al., 2009; GRIFFIT J., SOKOL C. and LUSTER A., 2014). Seus níveis séricos são investigados em indivíduos infectados por CHIKV, os quais podem estar associados com outros fatores como: carga viral do CHIKV, a condição clínica do indivíduo antes da infecção, a idade, e alterações reumatológicas, entre outros fatores (NG. et al., 2009; REDDY V et al. 2014; DEEBA F. et al., 2015; CHANG Y. et al. 2018).

O principal mecanismo envolvido na patogênese da CHIKF está na desregulação dos mecanismos de controle do processo inflamatório (CHIRATHAWORN C. et al., 2010). Assim sendo, alterações histopatológicas sinoviais e outras artropatias crônicas, após a fase aguda da infecção por CHIKV, são semelhantes às encontradas em pacientes com artrite reumatóide, que incluem hiperplasia sinovial, proliferação vascular e infiltração de macrófagos perivasculares (HOARAU J et al., 2010). O vírus infecta células do músculo esquelético, macrófagos, sinoviócitos e osteoblastos levando à produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que promovem destruição óssea e da cartilagem (CHEN et al., 2015). Em estudos com animais infectados com CHIKV foram demonstrados necrose periosteal, proliferação óssea e isquemia multifocal da medula óssea (GOUPIL B. et al., 2016).

A CXCL10 foi uma quimiocina inicialmente descoberta como sendo induzida pelo interferon (IFN)- γ , capaz de ser produzida por diversos tipos de células, incluindo monócitos (CIESIELSKI CJ. et al., 2002; VAZIRINEJAD R. et al., 2014). É responsável pelo recrutamento de diversos leucócitos para local afetado, bem como a perpetuação da resposta inflamatória local (HASSANSHAHI G et al., 2008; FILIPPO K et al., 2013) induzindo também efeitos angiostáticos (GOTSCH F. et al., 2007). Na CHIKF, essa quimiocina encontra-se elevada durante fase aguda da doença, ligando-se ao CXCR3, e ativando resposta Th1, favorecendo o *clearance* viral (NG L. et al., 2009) e tendendo a aumentar seus níveis a depender da maior carga viral (REDDY V. et al., 2014). A CXCL10, ainda participada da regulação da migração de monócitos/macrófagos, células

T de memória e NK, podendo contribuir para a ativação imune persistente na CHIKF, levando à cronicidade da doença (KELVIN A. et al., 2011).

A CXCL-9 é uma quimiocina inflamatória importante no recrutamento de células T ativadas para os locais de infecção, mediante resposta Th-1 e Th-2 (HARDISON JL et al., 2006), e, assim como a CXCL10, possui efeitos angiostáticos em células endoteliais microvasculares humanas (CRAWFORD M. et al., 2010). Na CHIKF, o CXCL9 encontra-se elevado durante fase aguda, favorecendo a eliminação do vírus (NG L. et al., 2009). Contudo, já foi descrita em casos de artralgia persistente, permanecendo ainda elevada dois meses após sintomas agudos (REDDY V. et al., 2014). Bem como IP-10, participa da regulação da migração de monócitos/macrófagos, células T de memória e NK, podendo contribuir para a ativação imune persistente na CHIKF (KELVIN A. et al., 2011).

Outra quimiocina importante na imunopatogenese da CHIKF é a CCL2, que estimula a quimiotaxia de monócitos e macrófagos, e vários eventos celulares associados à quimiotaxia, incluindo o fluxo de Ca^{+} e a expressão de integrinas (RAZ E. and MAHABALESHWAR H., 2009; PALOMINO D.C. and MARTI L.C., 2015). Tem função de agir como indutor da expressão de citocina em monócitos, e em altas concentrações, desperta explosões oxidativas (JIANG Y. et al., 1992). Sua expressão foi identificada aumentada em algumas doenças, como na aterosclerose e nos sinoviócitos em artrite reumatoide (ZHANG L. et al. 2015; RAGHU H. et al., 2016), pois monócitos e macrófagos desempenham um papel importante na fisiopatologia da artrite (TANABE I. S. et al., 2018). Na CHIKF, a CCL2 se apresenta elevada, estando correlacionado com o aumento da carga viral durante fase aguda, e seus níveis permanecem elevados em casos de artralgia persistente, elevando-se ainda mais nos casos graves, sendo cogitado como biomarcador de gravidade (REDDY V. et al., 2014; NINLA-AESONG P., MITARNUN W. and NOIPHA K., 2019).

A CCL5 é uma quimiocina inflamatória que induz expressão de integrinas, como por exemplo associados a função linfocitária, estando envolvida na adesão e movimentação de leucócitos através do tecido ao sítio inflamatório. As células T são capazes de induzir mais expressão de RANTES, através do receptor CCR5, amplificando a resposta imune (SCHALL T. et al., 1988; WIEDERMANN C. Et al., 1993). Além disso, estudos descreveram uma influência do RANTES e do CCR5 em desordens metabólicas como na aterosclerose (KUZIEL W. et al., 2003; KEOPHIPHATH M. et al.,

2010). Na CHIKF, apresenta-se com alta redução de seus níveis na fase aguda, principalmente em casos graves de trombocitopenia (NG L. et al., 2009), podendo estar reduzida em casos de artralgia persistente com alta carga viral, sendo indicada como um marcador de gravidade (HOARAU J. ET AL., 2010; REDDY V. et al., 2014; NINLA-AESONG P., MITARNUN W. and NOIPHA K., 2019).

A IL-8/CXCL8 é uma quimiocina inflamatória que tem como principal função o recrutamento de neutrófilos ao sítio inflamatório, e tem como principais receptores CXCR1 e CXCR2 (BAGGIOLINI M. AND CLARK-LEWIS I., 1992; PALOMINO D. C. and MARTI L. C., 2015) Suas funções também envolvem induzir à reorganização do citoesqueleto, alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular, ativação de integrinas, exocitose de proteínas granulares e *respiratory burst*. Há algumas doenças inflamatórias crônicas, como psoríase, artrite reumatoide, doenças pulmonares, em que há super-expressão da IL-8 (CAMP R. et al., 1991; MARTICH GD et al., 1991; PALOMINO D. C. and MARTI L. C., 2015). Na CHIKV crônica os níveis de IL-8 foram elevados em pacientes com artrite crônica, além disso, elevado níveis de IL-8 no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide foi relatado em vários estudos (CHAAITHANYA K. I. et al., 2011).

Portanto, sabendo das importantes funções dessas quimiocinas, tanto no aumento quanto diminuição de seus níveis pelo sistema imunológico, nosso estudo buscou compreender o perfil dos níveis séricos das quimicinas associadas com a febre chikungunya, em pacientes com CHIKF crônica e/ou artrite reumatoide associado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Verificar a existência de associação dos níveis séricos de CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 entre os grupos: pacientes na fase crônica da febre Chikungunya com e sem artrite e pacientes só com artrite reumatoide, e verificar se há correlação com os dados laboratoriais (proteína c reativa, fator reumatoide e a contagem de leucócitos).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar associação dos níveis das quimiocinas entre os grupos: CHIKF crônica sem artrite; CHIKF crônica com artrite e pacientes só com artrite reumatoide;
- Verificar associação dos níveis das quimiocinas com as variáveis laboratoriais (PCR, FR e contagem de leucócitos) entre os grupos estudados;
- Verificar correlação os níveis das quimiocinas com as variáveis laboratoriais (PCR, FR e contagem de leucócitos) nos grupos estudados.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO, POPULAÇÃO E LOCAL DO ESTUDO

Trata-se de um estudo analítico com três grupos de pacientes com CHIKF crônica e/ou artrite reumatóide, acompanhados no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Grupo A (n=45): pacientes com CHIKF crônica sem artrite reumatoide(AR), porém, cursando com poliartralgia persistente; Grupo B (n=43): pacientes com CHIKF crônica e com AR; Grupo C (n=38): pacientes com AR sem CHIKV. Todos faziam uso de anti-inflamatórios e/ou corticóides.

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na pesquisa indivíduos maiores de 18 anos, com a presença do anti-CHIKV (IgG) positivo, conforme protocolo do ministério da saúde, e o diagnóstico da artrite reumatoide foi realizado pelos reumatologistas responsáveis pelos pacientes.

4.1.2 Critérios de exclusão

Indivíduos que possuam outras doenças autoimunes diferentes da artrite reumatoide, e que possuam alguma alteração reumatológica anterior ao diagnóstico da infecção pelo CHIKV.

4.4 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

Cada participante da pesquisa assinou, em duas vias de igual teor, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A), que lhe assegura o cumprimento das normas da resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde. Os dados sociodemográficos (sexo e idade) foram obtidos durante a entrevista para o preenchimento do formulário da pesquisa (apêndice B), e os dados laboratoriais (PCR, FR e contagem de leucócitos) através dos prontuários dos participantes. Em seguida, foi realizada a coleta de 5 mL de sangue, em tubo seco, e as amostras encaminhadas ao Setor de Virologia do LIKA para processamento e armazenamento -20°C até do ELISA.

4.5. TESTE ELISA PARA A DETECÇÃO DO ANTI-CHIKV (IGG)

A detecção do anti-CHIKV (IgG) foi realizada pelo método ELISA, utilizando kits comerciais (EUROIMMUN® - Germany), seguindo as instruções do fabricante, sendo uma metodologia qualitativa, com resultados expressos como reagente e não reagente.

4.6 DOSAGEM DAS QUIMIOCINAS

A avaliação dos níveis séricos das quimiocinas CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o kit Cytometric–Bead Array–(CBA) (BD Bioscience®, San Diego, Califórnia, EUA). O ensaio CBA utiliza beads de captura revestidas com anticorpo específico para determinada citocina/quimiocina, possuindo fluorescência e tamanhos conhecidos. Para cada dosagem das quimiocinas, foram utilizados 25µL de soro (não diluído) com limite de detecção de 2 a 2.500 pg/mL. A leitura do teste foi realizada no citômetro BD FACSCalibur™ em colaboração com o Setor de Imunopatologia do IAM/Fiocruz.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a normalidade amostral das concentrações de quimiocinas e as variáveis laboratoriais foi utilizado o teste de D'Agostino. Em seguida, foram realizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para comparação entre os grupos. A correlação entre as variáveis e as concentrações das quimiocinas foi verificada aplicando-se o teste de correlação de Spearman, e determinando o resultado segundo o coeficiente de correlação linear de Pearson (r), no qual considera-se o valor de $r = 0,20$ a $0,39$ (fraco); $0,40$ a $0,59$ (moderado) e $0,70$ a $0,89$ (forte). Para todos os testes foi considerado como significativo o valor de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 9 v.9.01.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

A pesquisa fez parte de um projeto maior intitulado “Aspectos Epidemiológicos, Sorológicos, Imunológicos, Clínicos e Genéticos na Febre Chikungunya” aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (17712619.5.0000.5208) (Anexo A).

5 RESULTADOS

Artigo no formato *short communication* submetido à revista ...

“ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 E DADOS LABORATORIAIS EM PACIENTES NA FASE CRÔNICA DA FEBRE CHIKUNGUNYA COM E SEM ARTRITE REUMATÓIDE”

Resumo

O chikungunya vírus (CHIKV) é um *alphavírus* pertencente à família *Togaviridae*, que pode causar a febre chikungunya (CHIKF), cujo sintoma mais associado a evolução da doença se dá pelas artrites/altragia. Sugere-se que a persistência crônica da CHIKF com a artrite esteja associada ao aumento, ou redução, das concentrações de fatores imunes, como as quimiocinas, envolvidas no processo inflamatório. O presente estudo teve como objetivo quantificar os níveis das quimiocinas: CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 nos pacientes com febre chikungunya e associar/correlacionar os níveis destas quimiocinas com as variáveis laboratoriais: contagem de leucócitos, proteína C reativa (PCR) e fator reumatoide (FR). O estudo foi composto por três grupos: pacientes com febre chikungunya crônica sem artrite (n=45), febre chikungunya crônica com artrite (n=43) e pacientes somente com artrite (n=38). Os participantes do estudo eram acompanhados no Ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. A pesquisa do anti-CHIKV (IgG) foi realizada no Setor de Virologia do LIKA/UFPE pelo método ELISA, e as quimiocinas foram dosadas no Setor de Imunopatologia do Instituto Aggeu Magalhães, por citometria de fluxo. Houve associação significativa dos níveis séricos de CXCL10 entre o grupo CHIKF sem artrite em comparação com os grupos CHIKF com artrite ($p=0.0076$) e o grupo com artrite reumatóide ($p=0.0016$). Os níveis de IL-8 foram maiores apenas no grupo CHIKF sem artrite em comparação ao grupo artrite sem CHIKV ($p=0.0017$). Os níveis de CCL2 e CXCL9 não se mostraram diferentes entre os grupos. No grupo CHIKF com artrite houve correlação positiva intermediária ($p=0.009$; $r=+0,49$) entre CXCL10 e proteína C reativa. Além disso, houve correlação positiva fraca ($p=0,03$; $r=+0,33$) entre CCL2 e fator reumatoide, e uma correlação negativa intermediária entre CXCL9 e a contagem de leucócitos ($p=0,04$; $r=-0,40$), ambos no grupo com artrite reumatoide. Em conclusão, os estudos envolvendo níveis das quimiocinas na CHIKF mostram-se divergente, uma vez que a influência desses níveis depende de fatores como: sintomatologia e fases da doença.

Palavras-chaves: chikungunya; febre chikungunya; quimiocinas

1 Introdução

A infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV), transmitido pela picadas dos mosquitos *Aedes aegypti* e/ou *Aedes albopictus*, causa a febre chikungunya (CHIKF), que, além de causar sintomas inespecíficos, pode levar a sintomas progressivos de desordem articular, como artralgia e/ou artrite, nos casos agudos e/ou crônicos [1]. Estudos mostram que fatores imunológicos podem influenciar na imunopatologia da doença, como quimiocinas e citocinas [2; 3]. Estas quimiocinas funcionam como ação anti-inflamatória ou recrutadora de leucócitos ao sítio de infecção contra CHIKV [8]. Porém, observa-se que em alguns casos esse favorecimento da resposta imune pode levar ao aumento ou diminuição de seus níveis, desfavorecendo o quadro clínico, levando a cronicidade dos sintomas de artrite na CHIKF [3; 4; 5]. Há seis principais quimiocinas envolvidas no mecanismo da CHIKF a saber: CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4 e CCL5 [2; 4; 5; 6; 7].

Algumas dessas quimiocinas como CXCL10 e CXCL9 estão envolvidas com o controle da carga viral, especialmente na fase aguda da doença [1; 4]. Enquanto outras como CCL2 e CCL5 são cogitadas como marcadores de gravidade da CHIKF [6; 8]. A abordagem dos estudos varia a população e a fase da doença analisada, sendo assim há uma importância em mais observações em diferentes estágios da doenças, a fim de entender esse mecanismo de regulação [9]. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo verificar a associação nos níveis da quimiocinas CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10, com cronicidade da febre chikungunya em pacientes com e sem artrite reumatoide (AR), e a correlação com o fator reumatoide, proteína C reativa e contagem de leucócitos.

2 Metodologia

2.1 Desenho, População e Local do estudo

Trata-se de um estudo analítico de comparação entre grupos, que foi desenvolvido utilizando amostras de pacientes acompanhados no ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os pacientes foram agrupados de acordo com a CHIKF e presença da artrite reumatoide. Sendo o grupo A, pacientes com CHIKF sem AR, porém, com poliartralgia persistente; grupo B, pacientes CHIKF com AR; grupo C, paciente somente com AR.

Todos os pacientes faziam uso de medicamentos anti-inflamatórios e/ou corticóides. Os parâmetros biológicos (idade e sexo) e os dados laboratoriais (proteína C reativa (PCR), fator reumatoide (FR) e contagem de leucócitos) foram obtidos dos prontuários dos pacientes. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (17712619.5.0000.5208).

2.2 Métodos de pesquisa do CHIKV e dosagem das quimiocinas

A pesquisa do anti-CHIKV (IgG), para confirmação do contato com o vírus, foi realizada no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Kenzo Asami (LIKA)/UFPE pelo método do teste imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais (EUROIMMUN®) seguindo as instruções do fabricante e os resultados expressos em reagentes e não reagentes. A dosagem das concentrações séricas das quimiocinas CCL2, IL-8, CXCL9, CXCL10 foi realizada no Setor de Imunopatologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM)/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), por citometria de fluxo, utilizando o método *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD Bioscience, San Diego, Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

2.3 Análise estatística

As associações dos níveis séricos das quimiocinas e os valores das variáveis laboratoriais (PCR, FR e Contagem de leucócitos) foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A fim de analisar a correlação entre as variáveis e as concentrações das quimiocinas aplicou-se o teste de correlação de Spearman. Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados significantes. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 9.

3 Resultados

Foram analisados 126 pacientes, sendo divididos nos três grupos de estudo, grupo A (45), grupo B (43) e grupo C (38). Dentro dos parâmetros biológicos apresentados, a média de idade foi de 54,3 anos ($\pm 11,9$) com prevalência do sexo feminino, representando 89,7% (113/126) da população estudada. Obtivemos também os valores das medianas das quimiocinas dosadas em cada grupo, bem como os valores

das medianas das variáveis laboratoriais. A distribuição desses dados podem ser vistos na tabela 1.

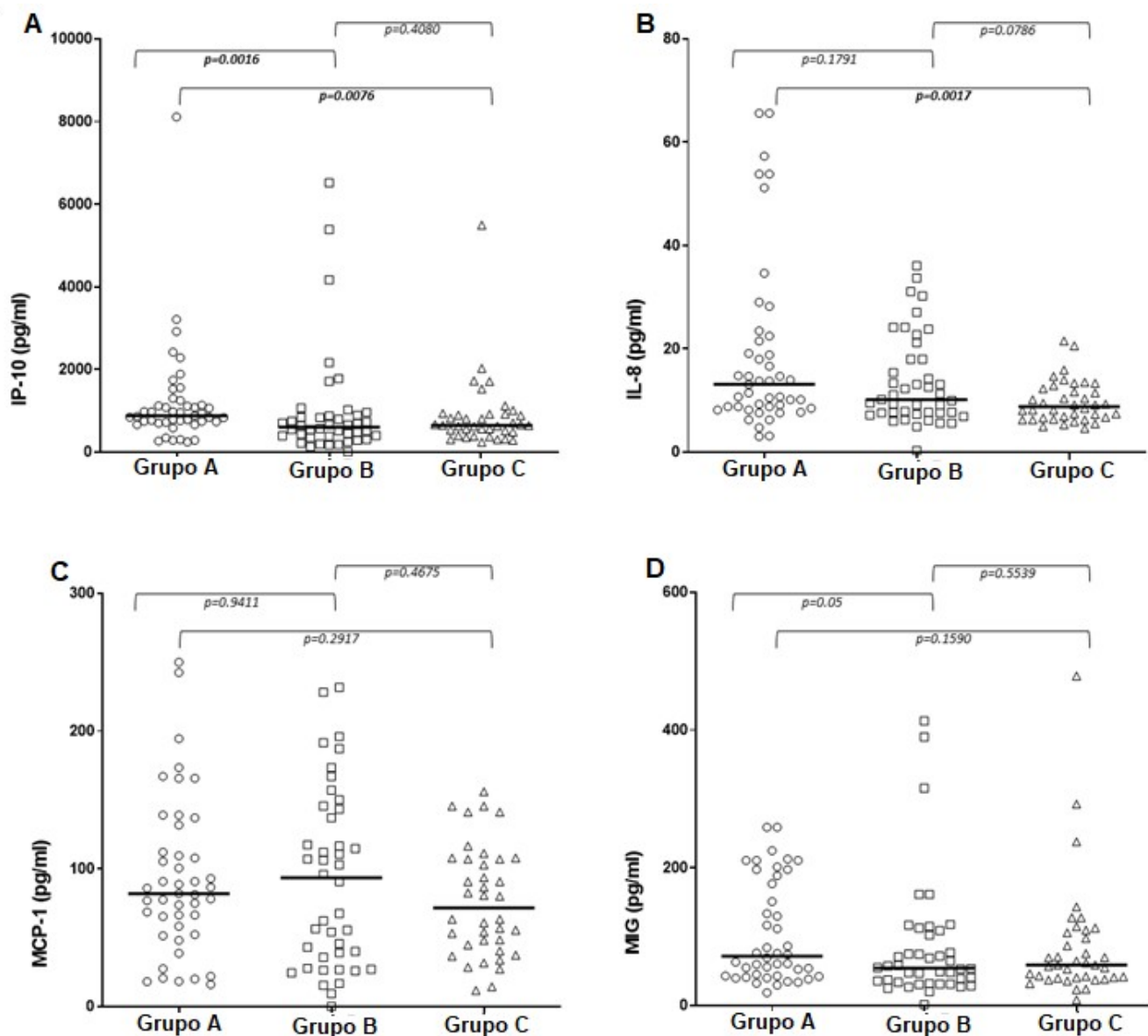
Tabela 1 - Distribuição dos participantes do estudo, em cada grupo analisado, de acordo parâmetros biológicos, mediana das quimiocinas e das variáveis laboratoriais.

	Grupo A n = 45	Grupo B n = 43	Grupo C n = 38
Média de idade (anos)	55,2 (± 11,5*)	54,9 (± 10,9)	53,4 (± 13,34)
Sexo			
Masculino	4 (8,8%)	7 (16,3%)	3 (7,9%)
Feminino	41 (91,2%)	36 (83,7%)	35 (92,1%)
Quimiocinas			
CXCL10	878,7 pg/ml	603,7 pg/ml	647,6 pg/ml
IL-8	13,11 pg/ml	10,16 pg/ml	8,81 pg/ml
CCL2	81,96 pg/ml	93,40 pg/ml	71,68 pg/ml
CXCL9	71,64 pg/ml	54,26 pg/ml	58,87 pg/ml
Variáveis Laboratoriais			
Proteína C reativa	0,15 mg/dl	0,30 mg/dl	0,15 mg/dl
Fator reumatoide	0,10 ui/ml	23.50 ui/ml	41.50 ui/ml
Contagem de leucócitos	6790 mm ³	8100 mm ³	6140 mm ³

*Desvio padrão. **GRUPO A:** Chikungunya sem artrite; **GRUPO B:** Chikungunya com artrite; **GRUPO C:** artrite reumatoide (AR).

A figura 1 demonstra os níveis séricos da CXCL10 (figura 1A), IL-8 (figura 1B), CCL2 (figura 1C) e CXCL9 (figura 1D) nos três grupos estudados. Na análise da CXCL10 (1A) não verificamos associação entre os pacientes do grupo B e C, porém foi observada associação entre o grupo A e B e A e C, e na análise da IL-8 (1B) é possível observar uma associação somente entre os grupos A e C.

Figura 1 – Concentrações séricas da IP-10, IL-8, MCP-1 e MIG.



Valores de p obtidos através do teste de Mann-Whitney; Kruskal-Wallis. **GRUPO A:** Chikungunya sem artrite; **GRUPO B:** Chikungunya com artrite; **GRUPO C:** artrite reumatoide (AR).

A variável FR apresentou associação nos grupos B e C ($p < 0,0001$). No entanto, os níveis das variáveis PCR e contagem dos leucócitos não se mostraram associados nos três grupos.

Quanto as correlações, no grupo B foi observada uma correlação positiva intermediária ($p=0.009$; $r=0,49$) entre CXCL10 e PCR. Além disso, no grupo C houve uma correlação positiva baixa de CCL2 com o FR ($p=0,037$ e $r=0,33$), e uma correlação negativa intermediária da CXCL9 com a contagem de leucócitos ($p=0,045$ e $r=-0,40$).

4 Discussão

Alterações dos níveis de quimiocinas podem estar associados a persistência da CHIKF, por desregulação de seus papéis na inflamação, levando a cronicidade de sintomas mais severos desenvolvidos durante fase aguda, como artrite e artralgia [1; 9].

Assim, nosso estudo foi composto por pacientes crônicos para a CHIKF numa faixa etária média de 54 anos, sendo a maioria dos pacientes do sexo feminino. Esses dados corroboram com o estudo epidemiológico realizado no Rio de Janeiro em 2018 [11] mostrando que as mulheres eram as mais acometidas (83,9%), principalmente na faixa etária de 50-69 anos, progredindo para uma condição clínica sub-aguda ou crônica da CHIK.

Com relação a análise das quimiocinas, a CXCL10 é uma quimiocina pró-inflamatória que promove o recrutamento de células T nos sítios inflamatórios nos pacientes com CHIKV [2]. Estudos anteriores mostraram que os níveis do CXCL10 foram mais elevados na fase aguda da doença, quando comparados com pacientes na fase crônica [2; 4, 5]. Essa molécula está aumentada em pacientes com artrite, sendo que este aumento pode estar associado com a expressão de seus receptores como CCR5 e CXCR3, por ação de células T sinoviais Th1 auxiliares, estimulando liberação de CXCL10, que funciona como quimiotactante das células T [14; 15], mantendo o perfil inflamatório e crônico nessa condição. Entretanto, nosso estudo encontrou níveis da CXCL10 mais elevados no grupo A, ressaltando que esse grupo de pacientes apresentava poliartralgia sem associação com artrite, aumentando essa quimiocina, mesmo na ausência de artrite.

Em relação aos níveis significativamente elevados da IL-8 (Fig. B), no grupo A, poderia ser justificado ainda persistente condição inflamatória da poliartralgia. No entanto, o estudo de Chaaitanya I. K. et al. (2011) [4], observou níveis mais elevados da IL-8 no grupo CHIKF crônica com artrite, quando comparados ao controle saudável, recuperados da CHIKF e CHIKF aguda. De acordo com esse estudo, a IL-8 desempenha um papel fundamental na patogênese da artrite na CHIKF crônica, contrariamente ao nosso estudo, que encontrou níveis mais elevados no grupo com CHIKF sem artrite reumatoide associada, mas com poliartralgia persistente, caracterizando uma inflamação persistente.

Os níveis de CCL2 (Fig. 1C) não apresentaram diferença significativa entre os grupos. No entanto, os estudos envolvendo está quimiocina na CHIKF divergem quanto a sua concentração, a depender da condição clínica dos grupos analisados. O estudo de Ng L. et al. [2] em pacientes na fase aguda da CHIKF, e o de Chang A. Y. et al. [6] em pacientes com CHIKF crônica, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de CCL2, quando comparados ao grupo controle saudável. No entanto, Deeba F. et al., [3] mostraram um aumento da CCL2 na fase aguda, estando relacionado com maior carga viral, assim como, elevadas concentrações desta quimiocina foram relatadas em pacientes com CHIKF grave com artrite crônica por Ninla-aesong p. et al. [7], sendo CCL2 associada, pelo estudo, com o aumento da artralgia crônica nestes pacientes.

Os níveis séricos de CXCL9 (Fig. 1D) não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados. No entanto, outros estudos [1; 3] encontraram níveis mais elevados da CXCL9 em pacientes na fase aguda da CHIKF, favorecendo o *clearease viral*. Essa discordância com nosso estudo pode estar relacionada com o perfil dos pacientes estudados, uma vez que analisamos apenas pacientes na fase crônica da doença.

Em relação os níveis elevados do FR no grupo B e no grupo C (Tabela 1), pode ser explicado pela própria condição da artrite reumatoide elevar os níveis do FR [25], pois é um marcador já utilizado para o diagnóstico desta doença, sendo FR-IgM a isoforma mais comum [28].

Quanto as correlações com as variáveis, uma correlação positiva intermediária entre CXCL10 e PCR foi encontrada no grupo B, contudo, a literatura não descreve uma correlação direta entre esses dois fatores. Sendo assim, sugerimos que devido a ação pró-inflamatória e sua participação no recrutamento de células, esta quimiocina pode estar mantendo o perfil da resposta inflamatória local, contribuindo para a condição crônica desses pacientes [34; 35].

Verificamos, também, uma correlação positiva baixa entre CCL2 e FR no grupo C, corroborando com outras pesquisas que relataram haver aumento da concentração de CCL2 em pacientes com artrite reumatoide [45], podendo este ser um biomarcador para avaliar a atividade da doença [48].

Por fim, foi encontrada uma correlação negativa intermediária entre CXCL9 e contagem de leucócitos no grupo C. Isto pode ser explicado pelo fato da artrite reumatoide

não se tratar de uma infecção viral, uma vez que a CXCL9 atua no recrutamento de linfócitos T ativados, através da resposta Th1 primária, estando associada ao recrutamento de agentes pró-inflamatórios nos sítios de inflamação para eliminação do patógeno [55; 56; 57].

5 Conclusões

No entanto, apesar da necessidade de mais estudos para compreensão do comportamento destas quimiocinas no diferentes estágios e sintomatologia da CHIKF, foi possível concluir que IP-10 e IL-8 possuem um papel importante na persistência crônica da inflamação, podendo estarem envolvidas na perpetuação da artrite. Contudo, MCP-1 não apresentou diferença significativa na associação entre os grupos, neste caso, os níveis séricos desta quimiocina variam de acordo com a população selecionada para análise, e não termos observado a associação não descarta sua importância patologia crônica da CHIKF ou na artrite reumatóide. A quimiocina MIG também não mostrou diferença significativa na associação, contudo, sabe-se que esta quimiocina é expressa na fase aguda durante o clearance viral, mas nossos grupos foram compostos por pacientes crônico da CHIKF. Houve uma correlação positiva entre IP-10 e PCR, no grupo B, que ocorre devido ao processo inflamatório persistente da infecção somado a condição da artrite, pois PCR é um marcador inflamatório. Assim como, a mesma correlação positiva foi encontrada entre MCP-1 e FR, no grupo C, pois níveis elevados de MCP-1 são associados a artrite reumatoide, que, naturalmente, possuem níveis de FR elevados. Já entre MIG e contagem de leucócitos, houve correlação negativa no grupo C, que pode ser explicada pela artrite reumatoide não se tratar de uma infecção por agente viral como o CHIKV, pois MIG atua recrutando linfócitos T.

6 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- Os níveis séricos de IP-10 e IL-8 foram maiores no grupo A quando comparados ao grupo B e ao grupo C.
- Os níveis séricos de MIG e MCP-1 não foram significativamente diferentes entre os grupos.
- Houve correlação positiva intermediária entre IP-10 e PCR no grupo B
- Houve correlação positiva fraca entre MCP-1 e FR, e uma correlação negativa intermediária entre MIG e contagem de leucócitos, ambos no grupo C.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avaliando os nossos resultados e dos outros estudos envolvendo a dosagem dos níveis séricos dessas quimiocinas, fica evidente o quão ainda é difícil termos um perfil de dosagem desses fatores imunes, que consista num padrão indicativo da cronicidade da doença, uma vez que a influência desses níveis séricos depende de fatores como: sintomatologia e fases da doença. Portanto, ressaltamos a importância de mais estudos para que seja possível, no cruzamento de resultados entre estudos, determinar um padrão do perfil sérico dessas quimiocinas na CHIKF crônica, com ou sem artrite reumatoide associada. Assim, poderia ser utilizado imunobiológicos, para supressão ou estimulação dessas quimiocinas, como tratamento, visando melhorar o quadro das artrites ou poliartralgia da CHIKF crônica dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. **BRASIL, Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.** Chikungunya: manejo clínico – Brasília: 2017. 65 p.: il. Acesso em:<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/chikungunya_manejo_clinico_1ed.pdf> ISBN 978-85-334-2494-4.
2. NG, L.F., CHOW, A., SUN, Y.J., KWEK, D.J., et al.; IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PLoS One.** 2009;4(1):e426. DOI:10.1371/journal.pone.0004261.
3. DEEBA, F., ISLAM, A., KAZIM, S.N, et al. Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. **Pathog Dis.** 2016 Apr;74(3):ftv119. DOI: 10.1093/femspd/ftv119.
4. CHAAITANYA I.K., MURUGANANDAM N., SUNDARAM SG, KAWALEKAR O. et al., Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. **Viral Immunol.** 2011 Aug;24(4):265-71. doi: 10.1089/vim.2010.0123.
5. REDDY, V., MANI, R.S., DESAI, A., RAVI, V. Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. **J Med Virol.** 2014 Aug;86(8):1393-401. doi: 10.1002/jmv.23875.
6. CHANG, A.Y., MARTINS, K.A.O., ENCINALES, L., Chikungunya Arthritis Mechanisms in the Americas: A Cross-Sectional Analysis of Chikungunya Arthritis Patients Twenty-Two Months After Infection Demonstrating No Detectable Viral Persistence in Synovial Fluid. **Arthritis Rheumatol.** 2018 Apr;70(4):585-593. DOI: 10.1002/art.40383.
7. NINLA-AESONG, P., MITARNUN, W., NOIPHA, K. Proinflammatory Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Persistent Arthralgia and Severe Disease After Chikungunya Virus Infection: A 5-Year Follow-Up Study in Southern Thailand. **Viral Immunol.** 2019 Dec;32(10):442-452. DOI: 10.1089/vim.2019.0064.
8. MINER, JJ, AW-YEANG, H.X., FOX, J.M., TAFFNER S., et al.; Chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol.** 2015 May;67(5):1214-1220. DOI: 10.1002/art.39027.
9. CHIRATHAWORN, C., CHANSAENROJ, J., POOVORAWAN, Y. Cytokines and Chemokines in Chikungunya Virus Infection: Protection or Induction of Pathology. **Pathogens** (2020) May 27;9(6):415. DOI: 10.3390/pathogens9060415.
10. LUMSDEN, W.H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1955 Jan;49(1):33-57. DOI: 10.1016/0035-9203(55)90081-x.
11. KOHLER, L. I.; AZEVEDO, J.; LIMA, M. A.; MARINHO, R. A. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes com evolução subaguda e crônica de infecção por

- Chikungunya. **Rev Soc Bras Clin Med.** (2018) jan-mar;16(1):13-7. ISSN: 2525-2933.
12. ROBINSON, MC. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1955 Jan;49(1):28-32. DOI: 10.1016/0035-9203(55)90080-8.
 13. REGENMORTEL, M.H.V. Introduction to the species concept in virus taxonomy. Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **San Diego: Academic Press;** 2000. pp. 3–16.
 14. Aggarwal A, Agarwal S, Misra R. Chemokine and chemokine receptor analysis reveals elevated interferon-inducible protein-10 (IP)-10/CXCL10 levels and increased number of CCR5+ and CXCR3+ CD4 T cells in synovial fluid of patients with enthesitis-related arthritis (ERA). **Clin Exp Immunol.** 2007;148(3):515-519. doi:10.1111/j.1365-2249.2007.03377.x
 15. FIRESTEIN G., BUDD R., GABRIEL S., et al., **Tratado de reumatología. 10a ed.** España: Elsevier; 2018:850p.
 16. STRAUSS, J.H., STRAUSS, E.G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev.** 1994 Sep;58(3):491-562. **Erratum in: Microbiol Rev** 1994 Dec;58(4):806.
 17. CHEN, R., WANG, E., TSETSARKIN, K.A., et al; Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. **PloS Pathog.** 2013;9(8):e1003591. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003591.
 18. KHAN, A. F., MORITA, K., PARQUET, M.C., et al.; Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology** Volume 83, Issue 12 (2002). DOI: 10.1099/0022-1317-83-12-3075.
 19. SCHUFFENECKER, I., ITEMAN, I., MICHAULT, A., et al.; Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Med.** 2006 Jul;3(7):e263. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030263.
 20. VAN BORTEL, W., DORLEANS, F., ROSINE, J., et al.; Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. **Euro Surveill.** 2014 Apr 3;19(13):20759. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20759.
 21. BRASIL. **MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE.** Febre de chikungunya: manejo clínico. 2015.
 22. BRASIL. **Boletim Epidemiológico: Ministério da Saúde 2016;** v. 47, n. 34. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>. Acesso: 26 dezembro 2020.
 23. BRASIL. **Boletim Epidemiológico: Ministério da Saúde 2021;** v. 52, n. 28. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>. Acesso: 25 Dezembro 2021.

24. BAGGIOLINI M, CLARK-LEWIS I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Lett.** 1992 Jul 27;307(1):97-101. DOI:10.1016/0014-5793(92)80909-z.
25. AMARAL J.K., BILSBORROW J.B., SCHOEN R.T. Chronic Chikungunya Arthritis and Rheumatoid Arthritis: What They Have in Common. **Am J Med.** 2020;133(3):e91-e97. Doi:10.1016/j.amjmed.2019.10.005
26. PAHO - Pan American Health Organization, World Health Organization; **Chikungunya: communicable diseases and health analysis.** Data, maps and statistics. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=5927&Itemid=40931&lang=en. Acesso em: 24 de Março 2021,
27. SINGH, S., UNNI, S. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Medical Virology** (2011) volume 21, Issue 2, pag-78-88. DOI: 10.1002/rmv.681.
28. NASS, F. R.; SKARE T. L.; GOELDNER I.; et al. Análise de quatro marcadores sorológicos na artrite reumatoide: associação com manifestações extra-articulares no paciente e artralgia em familiares. **Rev. Bras. Reumatol.** 57 (4) Jul-Aug (2017). DOI: 10.1016/j.rbre.2016.03.001
29. HIGGS S., VANLANDINGHAM D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 2015 Apr;15(4):231-40. DOI: 10.1089/vbz.2014.1745.
30. TSETSARKIN, K.A., VANLANDINGHAM, D.L., MCGEE, CE, HIGGS, S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathog.** 2007 Dec;3(12):e201. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030201.
31. TSETSARKIN, K.A., CHEN, R., SHERMAN, M.B., WEAVER, S.C. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. **Curr Opin Virol.** 2011 Oct;1(4):310-7. DOI: 10.1016/j.coviro.2011.07.004.
32. SAVAGE, H.M., LEDERMANN, J.P., YUG, L., BURKHALTER, K.L., et al.; Incrimination of *Aedes* (*Stegomyia*) *hensilli* Farner as an epidemic vector of Chikungunya virus on Yap Island, Federated States of Micronesia, 2013. **Am J Trop Med Hyg.** 2015 Feb;92(2):429-436. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0374.
33. NGOAGOUNI, C., KAMGANG, B., KAZANJI, M. et al. Potential of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* populations in the Central African Republic to transmit enzootic chikungunya virus strains. **Parasites Vectors** 10, 164 (2017). DOI:10.1186/s13071-017-2101-0.
34. SZENTES V., GAZDAG M., SZOKODI I. AND DÉZSI C.A. The Role of CXCR3 and Associated Chemokines in the Development of Atherosclerosis and During Myocardial Infarction. **Front. Immunol.** 9:1932. (2018) doi: 10.3389/fimmu.2018.01932

35. HASSAN SHAHI, G.; PATEL, S.S.; JAFARZADEH, A.A.; DICKSON, A.J.; Expression of CXC chemokine IP-10/Mob-1 by primary hepatocytes following heat shock. **Saudi Med J** 2007;28:514-518. DOI: 10.3923/rji.2008.21.28.
36. BORGHERINI, G., POUBEAU, P., STAIKOWSKY, F., LORY M., et al.; Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clin Infect Dis.** 2007 Jun 1;44(11):1401-7. DOI: 10.1086/517537.
37. SUHRBIER, A., JAFFAR-BANDJEE, M.C., GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses-an overview. **Nat Rev Rheumatol.** 2012 May 8;8(7):420-9. DOI: 10.1038/nrrheum.2012.64.
38. MAHENDRADAS, P., AVADHANI, K., SHETTY, R. Chikungunya and the eye: a review. **J Ophthalmic Inflamm Infect.** 2013 Feb 11;3(1):35. DOI: 10.1186/1869-5760-3-35.
39. SANTELLI, A. C. F. e S.; CRUZ, L. N.; FRUTUOSO L.C.V. Manejo Clínico Chikungunya. **Ministério da Saúde**, v. 2ª. edição, p. 77, 2017.
40. CAMP R., BACON K., FINCHAM N., MISTRY K., et al. Chemotactic cytokines in inflammatory skin disease. **Adv Exp Med Biol.** 1991;305:109-18. Review.
41. MARTICH GD, DANNER RL, CESKA M, SUFFREDINI AF. Detection of interleukin-8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents. **J Exp Med.** 1991;173(4):1021-4.
42. SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Virologia Humana. 3a Edição, Editora gen: **Grupo Editora Nacional, Guanabara Koogan**, 2015.
43. DUPUIS-MAGUIRAGA, L., NORET, M., BRUN, S., LE GRAND, R., et al.; Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Negl Trop Dis.** 2012;6(3):e1446. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001446.
44. THIBOUTOT, M.M., KANNAN, S., OKAWALEKAR, O.U., SHEDLOCK D.J., et al.; Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic?. **PLoS Negl Trop Dis.** 2010 Apr; 4(4): e623. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000623.
45. GRIFFITH, J.W., SOKOL, C.L., LUSTER, A.D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annu Rev Immunol.** 2014; 32:659-702. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
46. CHIRATHAWORN, C., RIANTHAVORN, P., WUTTIRATTANAKOWIT, N., POOVORAWAN, Y. Serum IL-18 and IL-18BP levels in patients with Chikungunya virus infection. **Viral Immunol.** 2010 Feb;23(1):113-7. DOI: 10.1089/vim.2009.0077.
47. COLLARES G. B.; PAULINO U. H. M. Aplicações clínicas atuais da proteína C reativa. **Revista médica de Minas Gerais**, volume 16.4 (2006). ISSN (on-line): 2238-3182. Acesso em 07/02/22: <http://rmmg.org/artigo/detalhes/579>

48. ZHANG L., YU M., DENG J., et al. Chemokine Signaling Pathway Involved in CCL2 Expression in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Yonsei Med J.* 2015;56(4):1134-1142. doi:10.3349/ymj.2015.56.4.1134
49. HOARAU, J.J.; JAFFAR, B.M.C.; KREJBICH, T.P.; DAS, T.; et al.; Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J Immunol.* 2010 May 15;184(10):5914-27. DOI: 10.4049/jimmunol.0900255.
50. LIOU L.B., FANG Y.F., TAN C.F., et al. A new laboratory surrogate (Monocyte Chemotactic Protein-1) for Disease Activity Score28: a favourable indicator for remission in rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* 2020;10(1):8238.(2020). doi:10.1038/s41598-020-65127-5
51. GOUPIL, B.A.; MORES, C.N.; A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. *Open Rheumatol J.* 2016 Nov 30;10:129-140. DOI: 10.2174/1874312901610010129.
52. CHEN, W.; FOO, S. S.; SIMS, N. A.; HERRERO, L. J.; WALSH, N. C.; MAHALINGAM, S. Arthritogenic alphaviruses: New insights into arthritis and bone pathology. *Trends in Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 35–43, 2015. DOI: 10.1016/j.tim.2014.09.005.
53. CIESIELSKI, C.J.; ANDREAKOS, E.; FOXWELL, B.M.; FELDMANN, M.; TNF α -induced macrophage chemokine secretion is more dependent on NF- κ B expression than lipopolysaccharides-induced macrophage chemokine secretion. *Eur J Immunol* 2002;32:2037-2045. DOI: 10.1002/1521-4141(200207)32:7.
54. VAZIRINEJAD, R.; AHMADI, Z.; KAZEMI A.M.; HASSANSHAHI G.; et al.; The Biological Functions, Structure and Sources of CXCL10 and Its Outstanding Part in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *Neuroimmunomodulation* (2014) vol. 21 n°6:322-330. DOI: 10.1159/000357780
55. ABRON J., SINGH N., MURPHY A., et al. Differential role of CXCR3 in inflammation and colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018; 9: 17928-17936. Online ISSN: 1949-2553
56. CHAMI, B., YEUNG, A., BUCKLAND, M. et al. CXCR3 plays a critical role for host protection against Salmonellosis. *Sci Rep* 7, 10181 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09150-z>
57. De FILIPPO, K.; DUDECK, A.; HASENBERG, M.; NYE, E.; Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood.* 2013 Jun 13;121(24):4930-7. DOI: 10.1182/blood-2013-02-486217.
58. GOTSCH, F.; ROMERO, R.; KUSANOVIC, J.P.; MAZAKI-TOVI, S.; et al.; The Fetal Inflammatory Response Syndrome. *Clin. obstetrics and gynecology:* september (2007) vol. 50, issue 3 – p.652-683. DOI: 10.1097/GRF.0B013E31811EBEF6
59. HARDISON, J. L.; WRIGHTSMAN, R. A.; CARPENTER, P. M.; LANE, T. E.; et al.; The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but

- do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infection and immunity** (2006) 74(1) 125–134. DOI: 10.1128/IAI.74.1.125-134.2006
60. CRAWFORD, M.A.; BURDICK, M.D.; GLOMSKI, I.J.; BOYER, A.E.; et al.; Interferon-inducible CXC chemokines directly contribute to host defense against inhalational anthrax in a murine model of infection. **PLoS Pathog.** 2010 Nov 18;6(11):e1001199. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001199.
 61. RAZ, E.; MAHABALESHWAR, H.; Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fisheye view. **Development.** 2009 Apr;136(8):1223-9. DOI: 10.1242/dev.022418.
 62. JUNG, C.G.; A natureza da psique. Petrópolis, RJ: Vozes, 2011a. **Obras completas de C. G. Jung**, v. 8/2.
 63. PALOMINO, D.C.T.; MARTI L.C.; Chemokines and immunity. **Einstein** vol.13 no.3 São Paulo July/Sep (2015). DOI: 10.1590/S1679-45082015RB3438.
 64. JIANG, Y.; BELLER, D.I.; FRENDEL, G.; GRAVES, D.T.; Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. **J Immunol.** 1992;148(8):2423-8.
 65. RAGHU, H.; LEPUS, C.M.; WANG, Q.; WONG, H.H.; et al.; CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. **Annals of the rheumatic diseases** (2017) 76(5), 914–922. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210426>
 66. ZHANG, L.; YU, M.; DENG, J.; LV X.; et al.; Chemokine Signaling Pathway Involved in CCL2 Expression in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Yonsei Med J.** 2015 Jul;56(4):1134-42. doi: 10.3349/ymj.2015.56.4.1134.
 67. WOLPE, S.D.; DAVATELIS, G.; SHERRY, B.; BEUTLER, B.; et al.; Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. **J Exp Med.** 1988 Feb 1;167(2):570-81. DOI: 10.1084/jem.167.2.570.
 68. WOLPE, S.D.; CERAMI, A.; Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. **FASEB J.** 1989 Dec;3(14):2565-73. DOI: 10.1096/fasebj.3.14.2687068.
 69. BROXMEYER, H.E.; COOPER, S.; LU, L.; MILLER, M.E.; et al.; Enhanced stimulation of human bone marrow macrophage colony formation in vitro by recombinant human macrophage colony-stimulating factor in agarose medium and at low oxygen tension. **Blood.** 1990 Jul 15;76(2):323-9.
 70. MENTEN, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J.; Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2002 Dec;13(6):455-81. DOI: 10.1016/s1359-6101(02)00045-x.
 71. CASTELLINO, F.; HUANG, A.Y.; ALTAN-BONNET, G.; STOLL, S.; et al.; Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T

- cell-dendritic cell interaction. **Nature**. 2006 Apr 13;440(7086):890-5. DOI: 10.1038/nature04651.
72. SCHALL, T.J.; JONGSTRA, J.; DYER, B.J.; JORGENSEN, J.; et al.; A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. **J Immunol**. 1988 Aug 1;141(3):1018-25.
73. WIEDERMANN, C.J.; KOWALD, E.; REINISCH, N.; KAEHLER, C.M.; et al.; Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine. **Curr Biol**. 1993 Nov 1;3(11):735-9. DOI: 10.1016/0960-9822(93)90020-o.
74. ZERNECKE, A.; WEBER, C.; Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. **Cardiovasc Res**. 2010 May 1;86(2):192-201. doi: 10.1093/cvr/cvp391.
75. KUZIEL, W.A.; DAWSON, T.C.; QUINONES, M.; GARAVITO, E.; et al.; CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherogenesis in apoE knockout mice. **Atherosclerosis**. 2003 Mar;167(1):25-32. DOI: 10.1016/s0021-9150(02)00382-9.
76. KEOPHIPHATH, M.; ROUAULT, C.; DIVOUX, A.; CLÉMENT, K.; et al.; CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2010 Jan;30(1):39-45. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.197442.
77. HOARAU, J.J.; JAFFAR, B.M.C.; KREJBICH, T.P.; DAS, T.; et al.; Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **J Immunol**. 2010 May 15;184(10):5914-27 DOI: 10.4049/jimmunol.0900255.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

TERMO DE CONSSSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa: **ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E SNPs DAS CITOCINAS IL-1 β , IL-6, IL-10 E IL-17 COM AS ALTERAÇÕES REUMATOLÓGICAS PROVENIENTES DA INFECÇÃO PELO CHIKUNGUNYA (CHIKV) EM INDIVÍDUOS NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA**, que está sob a responsabilidade do pesquisador Luan Araújo Bezerra, com endereço: Avenida Professor Moraes Rego, s/n – Bloco “A” Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. Cidade Universitária cep: 50670-420/ Telefone (81) 32513881, 98606389/ E-mail: luanaraujolah@hotmail.com; para contato do pesquisador responsável (inclusive ligações a cobrar) e está sob a orientação da Profa. Dra. Maria Rosangela Cunha Duarte Coelho. Telefones para contato: 81 2126-8586, email: rcoelholika@gmail.com.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, assine as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem direito de retirar o conhecimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

O objetivo desta pesquisa é verificar a associação dos níveis séricos (níveis detectados no soro obtido no processamento de amostra de sangue) e SNPs (Polimorfismos de nucleotídeo de base única que são uma variação em um único nucleotídeo que ocorre a uma posição específica no genoma, subtendendo as diferenças em nossa susceptibilidade a doenças e também à gravidade da doença e a forma como nosso corpo responde aos tratamentos e manifestações de variações genéticas) das citocinas IL-1 β (-511), IL-6 (rs1800795) , IL-10 (-1082) e IL-17 (rs2275913), com as alterações reumatológicas e laboratoriais provenientes da infecção pelo CHIKV em indivíduos na fase crônica da doença, para isso, serão convidados os participantes por conveniência (demanda espontânea), onde os que aceitarem participar da pesquisa, serão encaminhados a uma sala reservada para realização de uma entrevista de modo individual. Poderá surgir o risco de constrangimento durante a entrevista, mas este risco será minimizado através de um adequado aconselhamento e conversa amigável, lembrando sempre que a participação é voluntária e toda a informação dada será confidencial. Após a entrevista, será realizada a coleta de duas amostras de 05 mL de sangue de uma veia. Serão utilizados materiais novos, estéreis, e descartáveis na coleta de sangue, o que diminuirá o risco de contaminação. Poderá surgir o risco do surgimento de hematomas ou o local onde for puncionada a veia ficar arroxado, mas os profissionais de coleta são experientes e tomarão os devidos cuidados para diminuir o risco de que o local fique arroxado e/ou dolorido.

Em relação aos benefícios, os indivíduos que participarem da pesquisa contribuirão de forma indireta para o avanço das pesquisas sobre o Chikungunya a qual a resposta imunológica pode afetar a evolução para forma crônica da doença, onde as citocinas podem desempenhar papel importante na patogênese das alterações reumatológicas ocasionadas durante a infecção, e essas alterações podem interferir na qualidade de vida dos indivíduos com a doença na fase crônica. Dessa forma, o benefício obtido através do desenvolvimento deste projeto, será uma possível causa para um melhor manejo clínico para a doença, pois ainda não existem medicamentos que combatam diretamente o vírus, apenas existem aqueles que atuam no processo inflamatório ocasionado pelo mesmo. As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em evento ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação. Os dados coletos nesta pesquisa, através do questionário aplicado pelo pesquisador, ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora e do orientando, no endereço, acima informado, pelo período mínimo de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de despesas). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudos, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 – Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel. : (81) 2126.88588 – E-mail: cepccs@ufpe.br.

(Assinatura do Pesquisador)

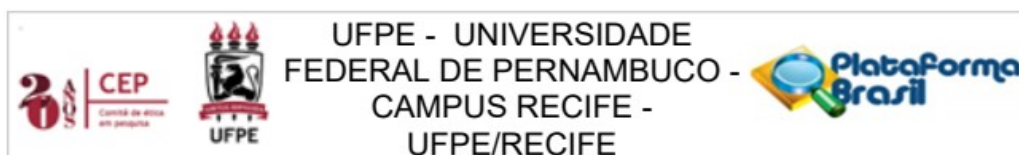
CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)
Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS E SNPs DAS CITOCINAS IL-1 β , IL-6, IL-10 E IL-17 COM AS ALTERAÇÕES REUMATOLÓGICAS PROVENIENTES DA INFECÇÃO PELO CHIKUNGUNYA (CHIKV) EM INDIVÍDUOS NA FASE CRÔNICA DA DOENÇA**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Recife, ____ de _____ de 201__.

Assinatura do participante (ou responsável legal): _____
Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar.

Assinatura da testemunha 1: _____
Assinatura da testemunha 2: _____

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS, SOROLÓGICOS, IMUNOLÓGICOS, CLÍNICOS E GENÉTICOS NA FEBRE CHIKUNGUNYA

Pesquisador: LUAN ARAUJO BEZERRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17712619.5.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.564.139

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado apresentado ao programa de Pós graduação em medicina tropical, pelo aluno LUAN ARAUJO BEZERRA, sob a orientação da Prof.^a Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho.

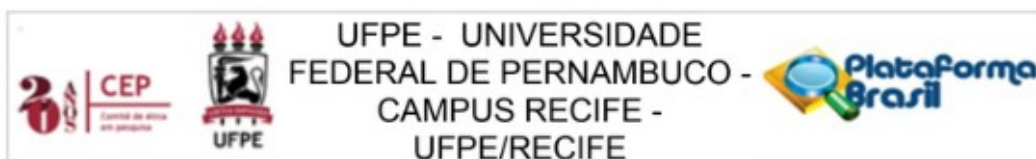
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Analisar os aspectos epidemiológicos, sorológicos, imunológicos, clínicos e genéticos da febre chikungunya.

Objetivos específicos:

- Estimar a frequência das alterações reumatológicas;
- Quantificar os níveis séricos das citocinas pró e anti-inflamatórias;
- Estimar a frequência alélica e genotípica dos polimorfismos;
- Verificar a associação entre os polimorfismos com os níveis séricos das citocinas pró e anti-inflamatórias;
- Verificar a associação entre os polimorfismos com as alterações reumatológicas;
- Verificar a associação entre os níveis séricos das citocinas pró e anti-inflamatórias com as alterações reumatológicas.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.564.139

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: o pesquisador refere que poderá surgir o risco de constrangimento durante a entrevista (que será realizada numa sala reservado do ambulatório de reumatologia). Informa que o risco será minimizado através de um adequado aconselhamento e conversa amigável, lembrando sempre que a participação é voluntária e toda a informação dada será confidencial. Informa ainda o risco do surgimento de hematomas no local onde for puncionada a veia, mas os profissionais de coleta são experientes e tomarão os devidos cuidados para diminuir o risco de que o local fique arroxado e/ou dolorido. Serão utilizados materiais novos, estéreis, e descartáveis na coleta de sangue, o que diminuirá o risco de contaminação. Existe ainda o risco de extravio de informações e dano de prontuários mas o pesquisador se compromete por meio de análise cautelosa, cuidadosa e em local apropriado, afim de preservar o prontuário do paciente e seus dados. O pesquisador apresentou termo de compromisso e confidencialidade.

Benefícios: serão indiretos uma vez que os resultados poderão contribuir para um melhor manejo clínico da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo transversal analítico. O tema é relevante. A pesquisa é viável. A morbimortalidade relacionada à CHIKF, interfere na qualidade de vida dos acometidos, gerando um grande impacto econômico e de saúde pública. A quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias e seus respectivos genes, na fase crônica da CHIKF, possibilitarão o estabelecimento de marcadores imunogenéticos de reconhecimento do agravamento das alterações reumatológicas que poderão contribuir para um melhor manejo clínico da doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados: 1 - folha de rosto; 2 - cartas de anuência do serviço de reumatologia e do SAME do HC; 3 - TCLE para maiores de 18 anos; 4 - termo de compromisso e confidencialidade; 5 - Projetos no formato plataforma e detalhado; 6 - lattes dos pesquisadores.

Recomendações:

Não há.

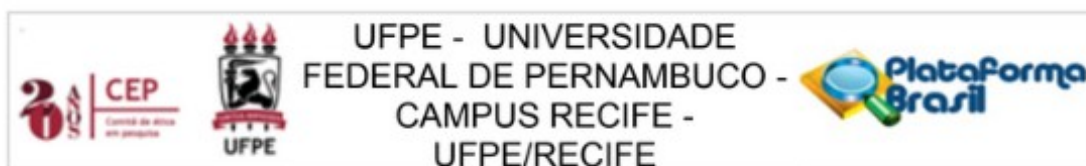
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.564.139

coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1285330.pdf	05/09/2019 11:52:39		Aceito
Outros	CARTADERESPSTAAPENDENCIAS.doc	05/09/2019 11:50:09	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEchikungunya.pdf	05/09/2019 11:48:07	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CEP.doc	05/09/2019 11:46:55	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	CurriculoREGINA.pdf	19/07/2019	LUAN ARAUJO	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.564.139

Outros	CurriculoREGINA.pdf	11:38:17	BEZERRA	Aceito
Outros	CurriculoVivianeMoraes.pdf	19/07/2019 11:38:00	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	curriculoRosangela.pdf	19/07/2019 11:37:17	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	CurriculoLuanapdf.pdf	19/07/2019 11:36:59	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	CurriculoGal.pdf	19/07/2019 11:36:43	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	curriculoLuan.pdf	19/07/2019 11:36:15	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	declaracaodevinculo.pdf	19/07/2019 11:35:46	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	TermodeCompromissoEConfiabilidade.pdf	19/07/2019 11:22:45	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	CartaAnuencuaReumatologia.pdf	19/07/2019 11:22:15	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Outros	CartaAnuenciaSame.pdf	19/07/2019 11:17:15	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	19/07/2019 11:05:33	LUAN ARAUJO BEZERRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 10 de Setembro de 2019

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br