



## Investigación original

# Respuesta inmunitaria de una población del Caribe colombiano infectada con el virus chikungunya



Juan Jaller Raad<sup>a,b,\*</sup>, Ana Segura Rosero<sup>c</sup>, Jecenia Vidal Martínez<sup>d</sup>, Alexander Parody<sup>e</sup>, Rodolfo Jaller Raad<sup>f</sup>, Dayana Caballero Tovar<sup>g</sup>, Patricia Camargo López<sup>g</sup>, Miguel Giraldo Ramírez<sup>g</sup>, Jorge Blanco Magdaniel<sup>g</sup> y Luis Andrade Celedón<sup>g</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Reumatología, Facultad de Medicina, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia

<sup>b</sup> Centro de Reumatología y Ortopedia de Barranquilla, Colombia

<sup>c</sup> Grupo Inmuno, Facultad de Medicina, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia

<sup>d</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Grupo de estudio diabetes, enfermedades metabólicas y cardiovasculares, Facultad de Medicina, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia

<sup>e</sup> Grupo Caribe de Investigación en Enfermedades de tipo Infeccioso y Resistencia Microbiana, Facultad de Medicina, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia

<sup>f</sup> Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia

<sup>g</sup> Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Metropolitana de Barranquilla, Colombia

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

### Historia del artículo:

Recibido el 8 de enero de 2016

Aceptado el 29 de marzo de 2016

On-line el 17 de mayo de 2016

### Palabras clave:

Chikungunya

Infección

Interferón

Mosquito

*Aedes aegypti*

Linfocito

## R E S U M E N

**Introducción:** La infección por el virus chikungunya se ha convertido en un problema de salud pública, tanto por su afección inmediata sobre la salud y calidad de vida de los pacientes y sus familias, como por las complicaciones a medio y largo plazos. Es necesario llevar a cabo la caracterización inmunológica de esta afección, como paso importante para el futuro desarrollo de estrategias tendentes a disminuir su incidencia y agresividad.

**Objetivo:** Caracterizar inmunológicamente una población del Caribe colombiano con diagnóstico clínico y serológico de infección por el virus chikungunya.

**Material y métodos:** Estudio descriptivo, longitudinal, prospectivo, en 109 pacientes con diagnóstico clínico y confirmación serológica de infección por el virus chikungunya, atendidos en el Servicio de Emergencias de la Fundación Hospital Universitario Metropolitano y en la consulta externa del Centro de Reumatología y Ortopedia. A partir de la toma de muestra de sangre periférica, se determinaron anticuerpos tipo inmunoglobulina G o M contra el virus chikungunya, por ensayo inmunoenzimático y pruebas de serología inmunológicas, orientadas al diagnóstico de enfermedades reumatológicas.

**Resultados:** Se obtuvieron resultados positivos para anticuerpos tipo inmunoglobulina G contra el virus chikungunya en 109 pacientes. Los resultados para anticuerpos antipéptido cíclico citrulinado, factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, anticuerpo anti-ADN, fueron negativos en la mayoría de los sujetos.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [juanjaller@gmail.com](mailto:juanjaller@gmail.com) (J. Jaller Raad).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rcreu.2016.03.003>

0121-8123/© 2016 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

**Conclusión:** Los pacientes no se encontraban en un proceso de replicación viral, característico de la fase aguda de la enfermedad. No hubo resultados positivos en las pruebas de laboratorio relacionadas con enfermedades reumatológicas. Las concentraciones altas halladas son sugerentes de un proceso inflamatorio articular con artralgias severas, que puede mimetizar las condiciones de una enfermedad reumatológica.

© 2016 Asociación Colombiana de Reumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Immunological response of a population from the Caribbean region of Colombia infected with the chikungunya virus

### A B S T R A C T

**Keywords:**  
Chikungunya  
Infection  
Interferon  
Mosquito  
*Aedes aegypti*  
Lymphocyte

**Introduction:** Chikungunya virus infection has become a public health problem, due to its immediate effect on the health and quality of life of patients and their families, as well as complications in the medium and long term. Its necessary to determine immunological characteristics of this affection as an important step for the future development of strategies to reduce its incidence and aggressiveness.

**Objective:** To characterize immunologically a population from colombian caribbean with serologic and clinic diagnosis of chikungunya virus infection.

**Material and methods:** A descriptive, longitudinal, and prospective study was conducted on in 109 patients with a clinical diagnosis and serological confirmation of chikungunya virus infection and attended in the emergency department of the Fundación Hospital Universitario Metropolitano and the Orthopaedic and Rheumatology Centre. Immunoglobulin G or M type antibodies against Chikungunya virus were determined in a peripheral blood sample using immuno-enzymatic serological and immunological test in order to diagnose rheumatic diseases.

**Results:** Tests were positive for immunoglobulin G type antibodies against chikungunya virus in all of the 109 patients. The results for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, rheumatoid factor, antinuclear, and anti-DNA antibodies were negative in almost all of the 109 patients.

**Conclusion:** Patients were not in a viral replication process that characterises the acute phase of the disease. There were no positive results in laboratory test related to rheumatic diseases. High concentrations of certain pro-inflammatory interleukins were found in patients, and the clinical manifestations in these, suggest an inflammatory joint process with severe arthralgia that can mimic the symptoms of a rheumatic disease.

© 2016 Asociación Colombiana de Reumatología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

La infección por virus chikungunya (CHIKV) se adquiere por la picadura del mosquito hembra *Aedes aegypti* o *Aedes albopictus*<sup>1-3</sup>. El virus penetra en los capilares subcutáneos, iniciando su replicación en los macrófagos de la dermis, fibroblastos y células endoteliales, desde donde es transportado a los ganglios linfáticos adyacentes al inóculo, difundiendo por la circulación a tejidos y órganos como hígado, músculos y articulaciones<sup>4,5</sup>.

La mayoría de los pacientes infectados presentan manifestaciones agudas, subagudas y crónicas, aunque del 3 al 12% cursan asintomáticos<sup>6,7</sup>. Durante el período de incubación silencioso (2 a 4 días), interviene el sistema inmunitario innato<sup>8-11</sup>, y tiempo después la respuesta inmunitaria específica<sup>12</sup> que, en la mayoría de los casos, logra un barrido inicial del virus<sup>13,14</sup>.

Durante la respuesta inflamatoria inicial, el interferón 1 $\alpha$ , al unirse a su receptor de superficie celular, produce la activación de tirosinquinazas, que conducen a la producción de varias enzimas inhibitoras de la replicación del virus en las células infectadas, que han escapado a la acción de las células asesinas naturales (NK)<sup>15-17</sup>.

El ácido nucleico viral induce la secreción de interferón 1 $\beta$  que, al unirse a su receptor de superficie celular, libera enzimas que frenan la síntesis proteica, inhibiendo la transducción del ARN viral y degradando de esta manera el ARN mensajero viral. La producción del interferón  $\gamma$  es mediada por linfocitos T activados por antígenos que le son presentados; este interferón actúa sobre células NK, macrófagos, linfocitos T y B, modificando la producción de anticuerpos. Posteriormente, se desarrolla la respuesta inmunitaria específica, con liberación de citoquinas, que atraen leucocitos al sitio de la replicación viral<sup>18-20</sup>.

Por su parte, la inmunidad celular está mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL CD8+), encargados de neutralizar y destruir las células infectadas, mediante la liberación de enzimas, previa unión del receptor de membrana T CD8+, con el complejo mayor de histocompatibilidad I (HLA I) en la superficie de células infectadas<sup>21</sup>.

La respuesta linfocitaria T CD4+(LTh), se basa en la liberación de interleucinas (IL) específicas. Las células Th1 producen: IL2, interferón gamma (INF $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), con características proinflamatorias. Las células Th2, secretan IL4, IL5, IL6 e IL10 y promueven la producción de anticuerpos mediada por los linfocitos B<sup>22,23</sup>.

Durante la fase aguda de la infección por el CHIKV, hay elevación del interferón alfa (INF $\alpha$ ), mediada por la IL-1, IL-2 y TNF $\alpha$ . El INF $\alpha$  es producido por linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, células NK y osteoblastos, entre otros, sus efectos antivirales incluyen la inhibición de la replicación viral, la activación de macrófagos y células NK.

Los efectos del INF $\alpha$  son potenciados por el INF $\gamma$ , una vez es secretado por las células Th1 activadas. Los síntomas como el dolor muscular y la fiebre están relacionados con la producción de interferones<sup>24-26</sup>.

Considerando que la respuesta inmunitaria regula el control de la enfermedad, esta dependerá de la situación inmunitaria subyacente en cada paciente, tal como la presencia de un estado reumatológico premórbido (artritis reumatoide)<sup>27-29</sup>.

En el medio regional, hasta el momento, no se han encontrado trabajos que muestren la caracterización inmunológica de los pacientes infectados con CHIKV, por lo que surgió la necesidad de llevar a cabo el presente trabajo, con el objetivo de analizar su respuesta inmunitaria, relacionando los casos de artralgias más graves, como el resultado de un defecto en los mecanismos de defensa<sup>30-33</sup>.

## Materiales y métodos

Estudio descriptivo, longitudinal y prospectivo, realizado en 109 pacientes, con diagnóstico clínico y serológico de infección por CHIKV, de octubre de 2014 a agosto de 2015, con edades comprendidas entre 22 y 82 años, atendidos en la Fundación Hospital Universitario Metropolitano (FHUM) y el Centro Reumatológico y Ortopédico, de la ciudad de Barranquilla. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de los sujetos después del inicio de los síntomas, en un tiempo promedio de 49 días, para la determinación de pruebas de laboratorio inmunológicas y medición de las concentraciones de INF e IL, según protocolo Affymetrix Biocience.

A todas las muestras se les realizó ELISA (*quantitative enzyme-linked immunosorbent assay, second generation*) para determinación de anticuerpos tipo IgG e IgM contra CHIKV, inmunofenotipificación de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo, con anticuerpos monoclonales (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8), concentración de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL8, IL-10, IL-12, IL-17, INF $\gamma$ , INF $\alpha$ , TNF $\alpha$ , factor reumatoide, péptido citrulinado, proteína C reactiva, anticuerpos antinucleares y anti-DNA.

La prueba ELISA utilizada, pertenecía a la casa comercial eBioscience, Inc- An affymetrix Company, y fue realizada en la ciudad de Barranquilla.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados en forma consecutiva durante su atención en el servicio de urgencias de la FHUM y en la consulta externa del Centro Reumatológico y Ortopédico de Barranquilla, los cuales reunieron los criterios de inclusión para participar en el estudio.

Los criterios de inclusión establecidos fueron: caso sospechoso (fiebre mayor a 38,5°C, artralgia severa o artritis de comienzo agudo, sin otra condición médica que lo explique y brote). Pacientes con anti-CHIKV positivo tipo IgM o IgG, por ELISA. Consentimiento informado diligenciado y firmado.

Se excluyeron aquellos con diagnóstico previo o presunto de enfermedad reumatológica, o con resultados positivos para: péptido citrulinado, factor reumatoide, ASTO, ácido úrico, anticuerpos antinucleares con título mayor 1/160 o pacientes que no firmaran el consentimiento.

Durante la recolección de la información, se aplicó un formulario que permitió analizar: el tiempo de inicio y duración de los síntomas, dolor o inflamación, afecciones articulares, artralgias, mialgias, cefalea, dolor de espalda, fiebre, brote, náuseas e incapacidad laboral y, en algunos casos, el diagnóstico de artritis reumatoide (AR), según los criterios establecidos por ACR/EULAR<sup>38</sup>. De forma periódica los pacientes fueron evaluados clínicamente a los 9 meses.

El análisis estadístico, descriptivo e inferencial, de las manifestaciones clínicas, permitió observar el comportamiento y la afectación inmuno-reumatológica.

## Ética

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Metropolitana y de la FHUM. Los pacientes participantes fueron debidamente informados, diligenciaron y firmaron el consentimiento. Durante el estudio se aplicaron las Normas de Buenas Prácticas Clínicas en Investigación.

## Análisis estadístico

Todos los datos fueron ingresados en el programa Microsoft Excel versión 2010, para el análisis estadístico se utilizó el programa Statgraphics XVI, donde se obtuvo el promedio y desviación estándar para las variables cuantitativas, frecuencia y porcentajes para las variables cualitativas.

Para las variables cuantitativas se utilizó la prueba t de Student para establecer la existencia o no de diferencias significativas entre los valores promedios. Se calculó la medida de asociación odds ratio, para medir el nivel de relación entre los síntomas y los marcadores de laboratorio determinados, considerando los valores del grupo control sano para cada prueba.

## Resultados

Un total de 109 pacientes fueron estudiados, a los cuales se les tomó muestra de sangre periférica. El rango de edad de la población osciló entre 22 y 82 años, con un mayor porcentaje (56%) entre las edades de 41 a 60 años. Con respecto a la

**Tabla 1 – Signos y síntomas presentes en los participantes**

Signo/síntoma	Porcentaje
<i>Dolor articular</i>	
Manos	82%
Tobillos	80%
Pies	72%
Codos	57%
<i>S. musculares y periarticulares</i>	
Artralgia	76%
Mialgia	72%
Dolor de espalda	61%
Edema periarticular	55%
<i>S. Generales o no articulares</i>	
Fiebre	89%
Brote	73%
Cefalea	69%
Náuseas	31%
Vómitos	19%
Sangrado de mucosas	5%
Astenia	82%
Manifestaciones cutáneas	80%
Meningo encefalitis	57%

Fuente: plantilla de seguimiento de resultados de laboratorio de FHUM.

actividad y persistencia de la sintomatología, la edad no fue determinante. En cuanto al género, se encontró un predominio femenino, que corresponde al 89% de la población analizada, desempeñándose el 40% de ellas, como amas de casa.

Aunque el objetivo principal del estudio fue caracterizar la respuesta inmunitaria de los pacientes infectados con el CHIKV, es importante resaltar las manifestaciones clínicas halladas durante la atención médica (tabla 1). En este contexto, los síntomas más característicos fueron: poliartritis simétrica en pequeñas articulaciones y tobillos, con una persistencia de más de 6 semanas de los síntomas, con lo cual los pacientes cumplían los criterios para AR (fig. 1).

En el momento de la recolección inicial de la información, todos los pacientes presentaban por lo menos una artralgia persistente (tabla 1), y un 10% de ellos síntomas de poliartritis, que por el tiempo de evolución se clasificó la enfermedad en etapa subaguda (persistencia de los síntomas por un tiempo mayor a 8 días e inferior a 3 meses). No hubo pacientes en el estudio que se encontraran en la fase aguda.

A los 9 meses se realizó nueva evaluación clínica de los pacientes, un 72% de los mismos mostró persistencia de artralgias y edema periarticular predominantemente en tobillos, lo que indicaba cronicidad de la enfermedad.

Por otro lado, todos los pacientes incluidos en el estudio tuvieron resultados positivos para anticuerpos anti-CHIKV tipo IgG. Las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T se encontraron disminuidas: el 95% de la población expresó menos de 700 linfocitos T CD3+/mm<sup>3</sup>, las de linfocitos T CD4+ también estuvieron disminuidas en un 63% de los participantes, así como 71% de los mismos con respecto a los linfocitos T CD8. En cuanto a la relación CD4/CD8, el 51% de los participantes presentó valores entre 1-2,5, denotando un

equilibrio de la subpoblación de linfocitos CD4 respecto a linfocitos CD8 (tabla 1).

Por otro lado, el 85,7% de los pacientes tuvo resultados de anticuerpos antinucleares negativos. Dos pacientes mostraron títulos mayores a dilución 1/80, y un solo paciente presentó DNA positivo. El factor reumatoide y el péptido anticitrulina estuvieron negativos en el 95,8% de los pacientes. Finalmente, las concentraciones de interleucinas proinflamatorias, IL1 $\beta$ , IL2, IL6, IL8, IL17, IFN $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , se encontraron aumentadas en el 95% de los pacientes (fig. 2).

## Discusión

Aunque el 75% de los pacientes incluidos en el estudio presentaron más de 10 articulaciones afectadas, cumpliendo con los criterios de afectación articular establecidos por la ACR/EULAR, la presentación clínica de manifestaciones como el brote, la fiebre y la coexistencia del brote epidemiológico en la ciudad, marcaban una diferencia con el diagnóstico de AR e inclinaban el diagnóstico clínico hacia una infección viral.

Se encontró una disminución de la respuesta inmunitaria, mediada por las poblaciones y subpoblaciones de linfocitos T, lo que indicaría un diagnóstico de linfocitopenia secundaria a la infección viral. Pero a diferencia de la disminución linfocitaria encontrada en la infección por el virus HIV, el balance entre CD4/CD8, en los pacientes infectados con CHIKV, se mantiene en favor de las células TH (CD4+).

El índice CD4/CD8 fue mayor a 1, destacando la capacidad funcional de producción en estos pacientes de una respuesta inmunitaria específica, así como el parcial equilibrio de las subpoblaciones linfocitarias. A diferencia de lo encontrado en la AR, en donde existe también un balance positivo entre CD4/CD8, en esta entidad encontramos aumentadas las subpoblaciones de LTH<sup>39</sup>.

La linfocitopenia a expensas de los linfocitos CD4+, que se observa en los pacientes con VIH, difiere de la disminución de la respuesta inmunitaria celular hallada en los pacientes con CHIKV, por cuanto en estos últimos el índice de la relación CD4/CD8 es positivo, de tal forma que el 63% de la población que presentó menos de 300 linfocitos CD4/mm<sup>3</sup>, presentó de igual forma menos de 200 linfocitos CD8/mm<sup>3</sup>, lo cual mostraría una inmunodeplección transitoria, posiblemente resultado de un efecto inmunomodulador. En contraposición, la linfocitopenia en VIH se acompaña de un desbalance linfocitario con predominio de células CD8, con efecto inmunosupresor y asociado a infecciones oportunistas<sup>40</sup>.

El FNT $\alpha$ , al igual que las interleucinas IL17 (fig. 1), IL1 $\beta$  (fig. 2) e IL8 se encuentran aumentadas apreciablemente, lo cual coincide con los valores encontrados regularmente en procesos inflamatorios activos de carácter viral, ampliamente referenciados<sup>41,42</sup>.

Las concentraciones de INF $\alpha$ , cercanas a los valores del grupo control sano, se explicarían por el hecho de que esta proteína se eleva durante la fase aguda de la enfermedad y no hubo pacientes en esa fase.

Debido al mimetismo clínico que exhibe la fiebre CHIK con enfermedades reumatológicas como la AR, es importante comparar ambas entidades dentro del marco de la respuesta inmunitaria. En el suero de los pacientes infectados,

se encontró un incremento de las interleucinas proinflamatorias analizadas, principalmente IL2 e IL8, que superaron unas 2 veces el valor del grupo control sano.

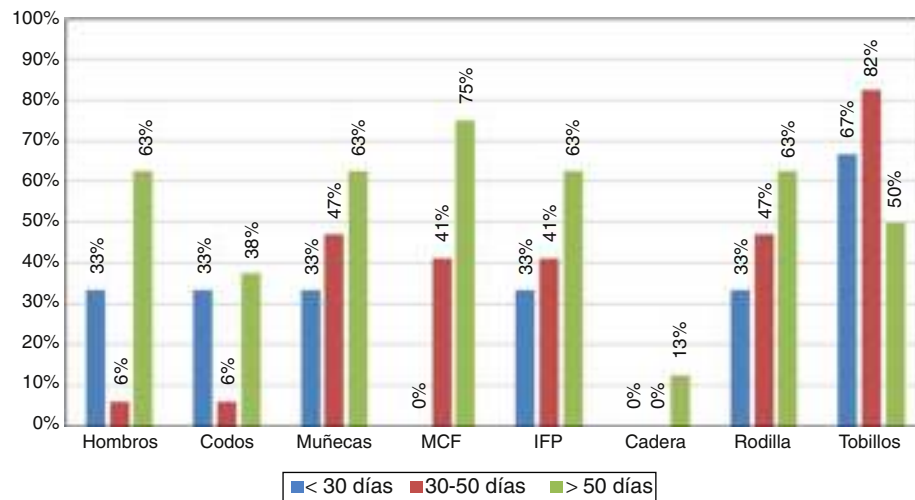
Esta respuesta obedecería al estímulo que ejerce la disminución de linfocitos CD4, hallada en los pacientes infectados con CHIKV, en la producción de IL2. Estos datos son consistentes con lo publicado por otros autores, después de analizar el perfil de citoquinas en adultos y jóvenes con AR, pero que a diferencia de nuestra población fueron positivos para anticuerpos antipeptidos citrulinados<sup>16,17,33</sup>.

Los diferentes niveles de expresión de las citoquinas dan cuenta del pleiotropismo, en el curso de una misma enfermedad o entre diversas enfermedades reumatológicas, en nuestro estudio los niveles de IL6 y TNF $\alpha$ , estuvieron por encima del grupo control sano, con un comportamiento similar al hallado en el grupo de AR, dentro de un estudio comparativo realizado entre AR y artritis idiopática juvenil, en el cual aunque en ambas entidades estas citoquinas estaban aumentadas, fue superior en el grupo de AR que en la artritis idiopática juvenil<sup>18,34,35</sup>.

En cuanto a la expresión de la IL10 antiinflamatoria, no hubo una elevación y por lo tanto sus efectos inmunorreguladores y supresores sobre el IL1 $\beta$  e IFN $\gamma$  no se evidenciaron<sup>19,36,37</sup>.

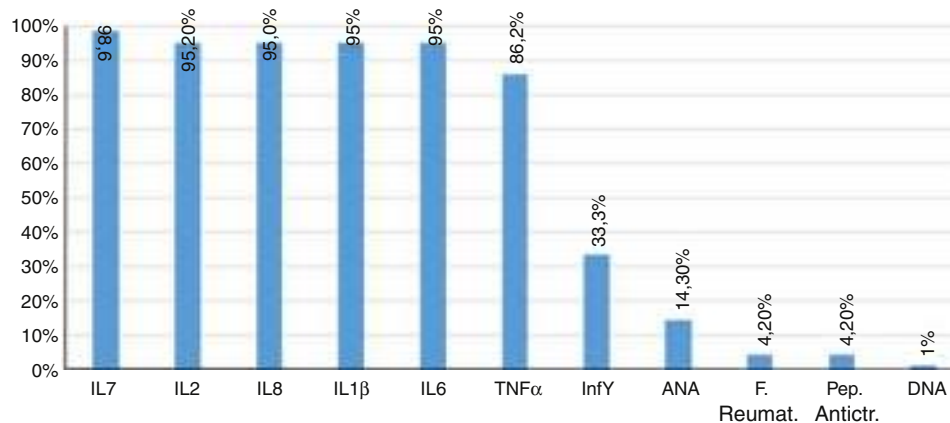
Los resultados de factor reumatoide, anticuerpos antinucleares, anti-ADN y anticitrulina negativos, indican que en la infección por CHIKV no existe una respuesta de tipo autoinmunitario, por esta razón, se considera que se trata de una inflamación articular con mediadores de inflamación muy similar a lo que podríamos encontrar en enfermedades reumatológicas, especialmente en la AR, aunque no se pudo determinar que hubiese una respuesta autoinmune desarrollada por la infección del virus, hallada en procesos reumatológicos. No obstante, habría que esperar en una próxima evaluación en los pacientes con persistencia de los síntomas articulares, las pruebas de laboratorio inmunológico (ANA, DNA, FR, anticitrulina) y observar reacciones autoinmunes.

Se plantea realizar estudios en líquido sinovial, para determinar si la disminución de las células T CD4 y TCD8 en sangre



**Figura 1 – Presencia de síntomas evolución de 30 a 60 días**

Fuente: Plantilla de seguimiento de resultados de laboratorio de FHUM.



**Figura 2 – Marcadores proinflamatorios en sujetos con CHK**

Fuente: Plantilla de seguimiento de resultados de laboratorio de FHUM.



**Tabla 2 – Valores de linfocitos T: CD3, CD4, CD8 e índice linfocitario CD4+ /CD8+**

Rango Cel/mm <sup>3</sup>	Porcentaje (%) n = 109
L. T CD3 +	
246-699	95
700 - 2100	5
L. T CD4	
119-299	63
300 - 1400	37
L. T CD8	
70- 199	71
200 - 900	29
Índice linf. CD4+ /CD8+	
< 1	0
1- 1,49	51
1,5 - 2,5	39
> 2,5	9

Fuente: plantilla de seguimiento de resultados de laboratorio de FHUM.

periférica obedece, como en modelos animales, a la fijación y activación de estos linfocitos en tejidos.

## Conclusión

Se encontró una respuesta inmunitaria viral de los participantes en el estudio, aunque no se produjeron anticuerpos específicos.

La mayor parte de los participantes mostraron un gran componente de tipo dolor poliarticular de forma persistente, por lo que se considera importante realizar un seguimiento de la evolución clínica y del perfil inmunitario, y continuar las investigaciones durante las fases aguda, hiperaguda y crónica, de la fiebre CHIKV.

Debido a la gran similitud en la sintomatología clínica, entre la fiebre CHIKV y la AR, los reumatólogos deben estar alerta con los pacientes que presenten afectación de pequeñas articulaciones y que de cierta forma cumplan con los criterios para el diagnóstico de AR de la ACR/EULAR, deben además tener en cuenta la importancia de realizar un diagnóstico diferencial en los lugares endémicos para CHIKV (tabla 2).

## Responsabilidades éticas

**Protección de personas y animales.** Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

**Confidencialidad de los datos.** Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

**Derecho a la privacidad y consentimiento informado.** Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

## Financiación

Universidad Metropolitana, Fundación Hospital Universitario Metropolitano y Centro de Reumatología y Ortopedia.

## Conflicto de intereses

Declaramos que no tenemos interés comercial o asociativo alguno, que represente un conflicto de intereses con el trabajo presentado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Erin J, Fischer M. Chikungunya virus in the Americas-what a vector- borne pathogen can do. *N Engl J Med.* 2014;371:887-9.
- CDC. CHIKUNGUNYA: Information for healthcare providers. [revisado 22 Jul 2014; consultado 5 Nov 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV.Clinicians.pdf> CDC
- Tsetsarkin K, Chen R, Sherman M, Weaver S. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Curr Opin Virol.* 2011;1:310-7.
- Gould EA, Coutard B, Malet H, Morin B, Jamal S, Weaver S, et al. Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Res.* 2010;87:111-24.
- Pialoux G, Gauzere B, Jaureguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7:319-27.
- Sissoko D, Malvy D, Ezzedine K, Renault P, Moschetti F, Ledrans M, et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3:e389.
- Mohan A, Kiran D, Manohar I, Kumar D. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. *Indian J Dermatol.* 2010;55:54-63.
- Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. *J Infect Dis.* 2011;204:115-23.
- Venugopalan A, Ghorpade R, Chopra A. Cytokines in acute chikungunya. *PLoS One.* 2014;9:e111305.
- Hoarau J, Jaffar Bandjee M, Krejbich Trotot P, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B, et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J Immunol.* 2010;184:5914-27.
- Alla S, Combe B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2001;25:337-46.
- Kelvin A, Banner D, Silvi G, Moro M, Spataro N, Gaibani P, et al. Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1279.
- Tripathy A, Tandale B, Balaji S, Hundekar S, Ramdasi A, Arankalle V. Envelope specific T cell responses & cytokine profiles in chikungunya patients hospitalized with different clinical presentations. *Indian J Med Res.* 2015;141:205-12.
- Chopra A, Saluja M, Venugopalan A. Effectiveness of chloroquine and inflammatory cytokine response in patients with early persistent musculoskeletal pain and arthritis

- following chikungunya virus infection. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:319-26.
15. Reddy V, Mani RS, Desai A, Ravi V. Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/chemokine levels during acute Chikungunya virus infection. *J Med Virol.* 2014;86:1393-401.
  16. Chopra A, Saluja M, Venugopalan A. Effectiveness of chloroquine and inflammatory cytokine response in patients with early persistent musculoskeletal pain and arthritis following chikungunya virus infection. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:319-26, 2014.
  17. Gasque P, Couderc T, Lecuit M, Roques P, Ng LF. Chikungunya virus pathogenesis and immunity. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015;15:241-9.
  18. Teo T, Her Z, Tan J, Lum F, Lee W, Chan Y, et al. Caribbean and Chikungunya virus isolates differ in their capacity to induce proinflammatory Th1 and NK cell responses and acute joint pathology. *J Virol.* 2015;89:7955-69.
  19. Hawman D, Stoermer K, Montgomery S, Pal P, Oko L, Diamond M, et al. Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. *J Virol.* 2013;87:13878-88.
  20. Poo Y, Rudd P, Gardner J, Wilson J, Larcher T, Colle M, et al. Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3354.
  21. Chow A, Her Z, Ong E, Chen J, Dimatatac F, Kwek D, et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Infect Dis.* 2011;203:149-57.
  22. Chaaitanya I, Muruganandam N, Sundaram S, Kawalekar O, Sugunan A, Manimunda S, et al. Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. *Viral Immunol.* 2011;24:265-71.
  23. Rashad AA, Mahalingam S, Keller PA. Chikungunya virus: emerging targets and new opportunities for medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 2014;57:1147-66.
  24. Ribera A, Degasne I, Jaffar Bandjee M, Gasque P. Chronic rheumatic manifestations following chikungunya virus infection: clinical description and therapeutic considerations. *Med Trop (Mars).* 2012;72:83-5.
  25. Waymouth HE, Zoutman DE, Towheed TE. Chikungunya-related arthritis: case report and review of the literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;43:273-8.
  26. Dupuis-Maguiraga, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1446.
  27. Essackjee K, Goorah S, Ramchurn S, Cheeneebash J, Walker-Bone K. Prevalence of and risk factors for chronic arthralgia and rheumatoid-like polyarthritis more than 2 years after infection with chikungunya virus. *Postgrad Med J.* 2013;89:440-7.
  28. Rajapakse S, Rodrigo C, Rajapakse A. Atypical manifestations of chikungunya infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2010;104:89-96.
  29. Schilte C, Staikowsky F, Couderc T, Madec Y, Carpentier F, Kassab S, et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7:e2137.
  30. Chaaitanya I, Muruganandam N, Sundaram S, Kawalekar O, Sugunan A, Manimunda S, et al. Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. *Viral Immunol.* 2011;24:265-71.
  31. Chow A, Her Z, Ong E, Chen J, Dimatatac F, Kwek D, et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Infect Dis.* 2011;203:149-57.
  32. Dupuis-Maguiraga L, Noret M, Brun S, Le Grand R, Gras G, Roques P. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1446.
  33. Schaible H, von Banchet G, Boettger M, Brauer R, Gajda M, Richter F, et al. The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1193:60-9.
  34. Renault P, Solet JL, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:727-31.
  35. Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 2009;373:659-72.
  36. Tournebise P, Charlin C, Lagrange M. Neurological manifestations in Chikungunya: About 23 cases collected in Reunion Island. *Rev Neurol.* 2009;165:48-51.
  37. Win M, Chow A, Dimatatac F, Go C, Leo Y. Chikungunya fever in Singapore: Acute clinical and laboratory features, and factors associated with persistent arthralgia. *J Clin Virol.* 2010;49:111-4.
  38. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2569-81.
  39. Ortiz L, Arévalo M, Rosales D. Artritis reumatoide: algunos aspectos inmunológicos. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa.* 2010;4:42-56.
  40. Fausther-Bovendo H, Wauquier N, Cherfils-Vicini J, Cremer I, Debré P, Veillard V, et al. NKG2C is a major triggering receptor involved in the T cell mediated cytotoxicity against HIV-infected CD4 T cells. *AIDS.* 2008;22:217-26.
  41. Dokun A, Kim S, Smith H, Kang H, Chu D, Yokoyama W. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol.* 2001;2:951-6.
  42. Saeidi A, Buggert M, Che K, Kong Y, Velu V, Larsson M, et al. Regulation of CD8+ T-cell cytotoxicity in HIV-1 infection. *Cell Immunol.* 2015;298:126-33.