



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

BRENNO FERNANDES DA CUNHA LIMA

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PELA RIPARINA III EM PACIENTES  
INFECTADOS COM VÍRUS DA CHIKUNGUNYA**

JOÃO PESSOA – PB  
2019

BRENNO FERNANDES DA CUNHA LIMA

AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PELA RIPARINA III EM PACIENTES  
INFECTADOS COM VÍRUS DA CHIKUNGUNYA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profª Drª. Tatjana Keesen de Souza Lima.

JOÃO PESSOA – PB

2019

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L732a Lima, Brenno Fernandes da Cunha.

Avaliação da modulação da resposta imune pela Riparina  
III em pacientes infectados com vírus da Chikungunya /  
Brenno Fernandes da Cunha Lima. - João Pessoa, 2019.  
67 f. : il.

Orientação: Tatjana Keesen de Souza Lima.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. CHIKV. 2. Célula T. 3. Acetilcolina. 4. Produtos  
naturais. I. Lima, Tatjana Keesen de Souza. II. Título.

UFPB/BC



### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e seis dias do mês de abril de 2019, às 10:00h, em sessão pública na sala 10 do bloco administrativo do Centro de Biotecnologia, deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente e composta pelos avaliadores: 1. Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Profa. M.<sup>a</sup> Rephany Fonseca Peixoto (PPg Multicêntrico Fisiologia/UFPB), o discente Brenno Fernandes da Cunha Lima, matrícula 11502169, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **"Avaliação da modulação da resposta imune pela Riparina III em pacientes infectados com vírus da Chikungunya"**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.

\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora

\_\_\_\_\_  
Avaliador 1

\_\_\_\_\_  
Discente

\_\_\_\_\_  
Avaliador 2

Dedico esse trabalho à minha família  
sendo ela de sangue ou não,  
esse trabalho é nosso.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, por me apoiarem em absolutamente tudo que eu quis fazer e sempre por estarem comigo, meus primeiros professores e com quem eu mais aprendi sobre a vida, amo vocês.

Gostaria de agradecer aos meus irmãos, Bruno e Beatriz, por todos os momentos de companheirismo e ajuda durante esse caminho da vida e desta graduação, sem a ajuda dos dois eu definitivamente não teria me formado.

Queria agradecer aos meus padrinhos, tio Betinho e tia Mussolinia, por um suporte ininterrupto durante toda minha vida, a alegria de vocês me inspira todo dia, espero chegar onde vocês estão com esse sorriso no rosto que nunca deixaram de mostrar. Meus avôs e minha avó Appia, que infelizmente não puderam presenciar minha formação, espero que saibam o quanto eu gostaria de compartilhar isso com vocês.

Gostaria de agradecer à minhas avós e minha tia Fábria, a quem eu considero quase uma segunda mãe pra mim, todos vocês sempre estão em meus pensamentos e no meu coração, agradeço imensamente por todos os bons momentos que vocês compartilharam comigo.

Beatriz, minha companheira, todo esse percurso da graduação que trilhamos juntos será inesquecível, quatro anos de muito amor e muita felicidade acompanhado de muita correria e muito desespero (não foi pouco mesmo) da universidade. Enfim chegamos na linha de chegada com muito companheirismo, apoio e aprendizado, sem você com certeza teria sido exponencialmente mais difícil chegar até o fim, te amo demais.

Gostaria de agradecer imensamente ao pessoal do laboratório com quem aprendi muito e continuo aprendendo, que além de colegas de laboratório viraram pessoas que possuo um carinho imenso, especialmente gostaria de agradecer a Fany, Pedro, Cinthia, Fernanda e Ju, o convívio com vocês foi, além de muito divertido, muito enriquecedor para minha formação.

Ao meu grupo de amigos, que não são poucos, por todo o apoio, risadas e desopiladas que vocês me proporcionaram. Gostaria de agradecer a Thiago, Bia Farias, Marcão, Miguel, Dimas, Hermano, Fernando, Mari, Felipe, Marcus, Mago, Gabriel, Ichibi e muitos mais. Tenho muita sorte de ter pessoas como vocês na minha vida, amo cada um de vocês.

Aos meus colegas de classe nestes quatro anos que proporcionaram um convívio leve e enriquecedor. Em especial Bia, Felipe e João, companheiros de seminários e da vida também. Chegar na universidade e conviver com vocês tornou tudo muito mais feliz e mais leve, definitivamente sendo as melhores coisas que esse curso me proporcionou.

Aos meus orientadores durante a graduação, Tatjana Keesen e Sávio Moita, não tenho como agradecer vocês o suficiente, tudo que aprendi com vocês será inesquecível e guardarei todo esse conhecimento com muito carinho. Obrigado por confiarem em mim no desenvolvimento dos trabalhos e por todos os momentos que compartilhamos juntos, guardo toda a experiência com muito carinho.

Gostaria também de agradecer a todos os meus professores durante esse caminho da graduação, que ‘dificultaram’ minha vida na escolha de uma área específica, pois todos eram tão apaixonados pelo que faziam que eu não tinha outra reação se não me

apaixonar por cada área ensinada, obrigado por todo conhecimento que vocês compartilharam comigo.

Por fim, gostaria de agradecer aos membros da banca avaliadora que se dispuseram a participar e contribuir para a melhora do trabalho.

“Dane-se o Capitão e o General,  
O amor é o mais alto grau da inteligência humana”

-Djonga; Ret (adaptado).

## RESUMO

O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus transmitido pelos mosquitos da espécie *Aedes spp.* pertencente ao gênero *Alphaviridae* e à família *Togaviridae* sendo o agente etiológico responsável pela Febre da Chikungunya (CHIKF). Doença que se caracteriza por febre alta, dor de cabeça, exantemas e dor articular, podendo evoluir para um quadro crônico caracterizado por artrite debilitante que pode durar meses ou anos. Durante a fase inicial da doença, é comum uma resposta imune modulada pela imunidade inata seguido por uma resposta adaptativa caracterizada majoritariamente por células T CD8<sup>+</sup>. Em infecções virais, essas células caracterizam forte resposta a viremia por expressão de citocinas e destruição de células infectadas pelo vírus, porém não se sabe completamente seu papel durante a fase aguda da doença e se ela pode influenciar no desenvolvimento da fase crônica. A riparina III é um produto natural extraído do fruto imaturo do louro, acredita-se que essa molécula possui função moduladora em canais de Ca<sup>2+</sup> regulados por acetilcolina. Recentemente, foi descoberto que linfócitos e outras células imunes expressam receptores muscarínicos e nicotínicos e são capazes de sintetizar acetilcolina, provavelmente sendo capazes de estimular esses receptores de forma autócrina e/ou parácrina. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade imunomoduladora da riparina III em linfócitos do tipo CD8<sup>+</sup> em pacientes apresentando quadro agudo e crônico de Chikungunya. Para isso, foram coletadas amostra de sangue periférico de indivíduos controles (n=6), pacientes agudos (n=5) e pacientes crônicos (n=5), essas amostras foram analisadas por citometria de fluxo no intuito de identificar o linfócito T CD8<sup>+</sup> e avaliar a expressão de marcadores como CD69, IL-17, CD107, Granzima e Perforina. Nos grupos sem tratamento com riparina, foi observado um aumento de todos os marcadores avaliados durante a fase aguda, enquanto na fase crônica observou apenas um aumento na expressão de CD69 e IL-17, aumento este consideravelmente menor que na fase aguda. Nos grupos tratados com riparina, foi observado uma elevação da expressão de IL-17 e CD69 em grupos controle, e em pacientes com a forma clínica aguda, uma diminuição significativa na expressão de IL-17. Esses resultados sugerem que a fase aguda da CHIKV é marcada por forte ação pró-inflamatória e citotóxica exercida pelo linfócito T CD8<sup>+</sup>, e que a expressão elevada em casos crônicos indica participação destas células na patologia. Ainda, os resultados sugerem que a riparina III pode possuir uma atividade moduladora diversa dependendo do estado imunológico do indivíduo, e isso pode estar diretamente relacionado com a expressão de receptores muscarínicos e nicotínicos durante diferentes estados do linfócito T CD8<sup>+</sup>, elucidando parte da modulação da acetilcolina em linfócitos T CD8<sup>+</sup> em casos de viremia e demonstrando certa atividade anti-inflamatória por parte da riparina III.

Palavras-chave: CHIKV; Célula T; Acetilcolina; Produtos naturais

## ABSTRACT

The Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus transmitted by *Aedes spp.* mosquitoes, this virus is part of the *Alphaviridae* genus and the *Togaviridae* family and is the etiologic agent responsible for Chikungunya Fever (CHIKF). This disease is characterized by high fever, headaches, several rashes and articular pain, that can evolve to a chronic state characterized by severe arthritis that could last for months or even years. During its initial phase, the normal response is associated by strong innate immunity followed by adaptative immunity characterized majoritarilly by T CD8<sup>+</sup> lymphocytes. In viral infections, these cells modulate strong antiviral response by expressing cytokines and destroying virus infected cells, however its function during acute phase and if it's able to contribute to the development of a chronic phase remains uncertain. Riparin III is a natural product isolated from the unripe fruit of the louro tree, it is believed that this molecule is capable of having a modulatory function in Ca<sup>2+</sup> channels regulated by acetylcholine. Recently, it was discovered that T lymphocytes express muscarinic and nicotinic receptors and that they are able to synthetize acetylcholine, probably being capable of activating their own receptors by an autocrine or paracrine manner. The main objective of this work was to evaluate the immunomodulatory activity of riparin III in T CD8<sup>+</sup> lymphocytes in patients afflicted with an acute or chronic form of Chikungunya. For that, peripheric blood samples were collected from healthy individuals (n=6), acute patients (n=5) and chronic patients (n=5), these samples were analyzed by flow citometry in order to identify the CD8<sup>+</sup> lymphocyte and evaluate the expression of markers such as CD69, IL-17, CD107, Granzyme and Perforin. In the groups that weren't treated with riparin, it was observed an increase in all of the markers analyzed during acute phase, however in the chronic state only CD69 and IL-17 were shown as overexpressed in relation to control, although the control increase is significantly lower than the increase in the acute phase. In groups treated with riparin III, it was observed an increase in IL-17 and CD69 in healthy individuals, and in acute patients an decrease in the expression of IL-17. These results suggest that the acute phase of CHIKV is characterized by strong pro-inflammatory and cytotoxic response carried out by T CD8<sup>+</sup> lymphocytes, and the overexpression of some markers in chronic phase may indicate a role for the cells on that state of the disease. Also, the results suggest that riparin III may have a diverse modulatory activity depending on the immunologic state of the individual, and that might be directly linked to the expression of muscarinic and nicotinic receptors on T CD8<sup>+</sup> lymphocytes, shedding some light in the modulation made by acetylcholine in T CD8<sup>+</sup> lymphocytes activating during viremia and showing certain anti-inflammatory activity by riparin III.

Keywords: CHIKV; T cell; Acetylcholine; Natural products

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura do vírus da Chikungunya.....	20
Figura 2 - Mapa ilustrando locais que apresentam ou apresentaram infecções por Chikungunya. .....	23
Figura 3 -Porcentagem de células T CD8+ em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III. ....	40
Figura 4 - Porcentagem de células T CD8+ expressando CD69 em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III. ....	41
Figura 5 - Porcentagem de células T CD8+ expressando CD107 em pacientes controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III. ....	42
Figura 6 - Porcentagem de células T CD8+ expressando granzima, perforina e granzima/perforina em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III. ....	43
Figura 7 - Porcentagem de células T CD8+ expressando IL-17 em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III .....	45

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>APC</b>	Célula Apresentadora de Antígeno ( <i>Antigen Presenting Cell</i> )
<b>CCL2</b>	Proteína quimiotática 1 do monócito
<b>CCL4</b>	Proteína quimiotática 4 do monócito
<b>CCL5</b>	Proteína quimiotática 5 do monócito
<b>CD4</b>	Cluster de diferenciação tipo 4
<b>CD3</b>	Cluster de diferenciação tipo 3
<b>CD8</b>	Cluster de diferenciação tipo 8
<b>CD69</b>	Cluster de diferenciação tipo 69
<b>CD95</b>	Cluster de diferenciação tipo 95
<b>CD95L</b>	Ligante do cluster de diferenciação tipo 95
<b>CD107</b>	Cluster de diferenciação tipo 107
<b>ChAT</b>	Colina acetil-transferase
<b>CHIKF</b>	Febre da Chikungunya
<b>CHIKV</b>	Chikungunya Vírus
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>ECSA</b>	Linhagem viral do leste/central/sul africano
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferon do tipo $\alpha$
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon do tipo $\gamma$
<b>IgG</b>	Imunoglobulina tipo G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina tipo M
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina tipo 1 $\beta$
<b>IL-2</b>	Interleucina tipo 2
<b>IL-8</b>	Interleucina tipo 8
<b>IL-10</b>	Interleucina tipo 10
<b>IL-12</b>	Interleucina tipo 12
<b>IL-17</b>	Interleucina tipo 17

<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
<b>IP-10</b>	Proteína induzida por Interferon- $\gamma$ 10
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>NK</b>	Célula <i>Natural Killer</i>
<b>nsP</b>	Proteínas não-estruturais
<b>ORF</b>	Janela de Abertura de Leitura
<b>PBMC</b>	Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) ( <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )
<b>PFU</b>	Unidades Formadoras de Placas ( <i>Plaque-forming units</i> )
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	Fosfolipase tipo $\gamma$
<b>PLC-<math>\beta</math>1</b>	Fosfolipase tipo $\beta$ 1
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	Reação de polimerase em cadeia a tempo real
<b>Th1</b>	Célula T auxiliar tipo 1
<b>Th17</b>	Célula T auxiliar tipo 17
<b>TCR</b>	Receptor da célula T
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral tipo $\alpha$

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO .....	19
2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO .....	20
2.3 EPIDEMIOLOGIA .....	21
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	23
2.5 DIAGNÓSTICO .....	25
2.6 IMUNOLOGIA .....	26
2.7 RIPARINA III .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL .....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	33
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	33
4.2 SELEÇÃO DE CASOS AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE .....	33
4.3 OBTENÇÃO DOS LEUCÓCITOS .....	33
<b>4.3.1 Banco de amostras</b> .....	33
<b>4.3.2 Obtenção do soro</b> .....	33
<b>4.3.3 Obtenção de leucócitos</b> .....	34
<b>4.3.4 Extração do RNA viral</b> .....	34
4.4 TRATAMENTO COM RIPARINA III .....	34
4.5 IMUNOFLORESCÊNCIA DAS CÉLULAS T CD8 <sup>+</sup> .....	34
<b>4.5.1 Protocolo de marcação dos leucócitos após o tratamento com as drogas em estudo</b> .....	34
<b>4.5.2 Anticorpos monoclonais fluorescentes</b> .....	35
<b>4.5.3 Citometria de fluxo</b> .....	35
4.6 ANÁLISE ESTÁTISTICA .....	36
<b>5 RESULTADOS</b> .....	38
5.1 DADOS DOS PACIENTES AVALIADOS .....	38
5.2. NÚMERO DE CÉLULAS T CD8 <sup>+</sup> EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III .....	40
5.3. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T CD8 <sup>+</sup> EXPRESSANDO CD69 EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III .....	40

5.4. AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO POR CÉLULAS T CD8+ EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III.....	41
5.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE GRÂNULOS PELAS CÉLULAS T CD8+ EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLES TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III. ....	42
5.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-17 EM CÉLULAS T CD8+ EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLES EM PACIENTES TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III .....	44
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	47
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	54
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	56
<b>9 APÊNDICES</b> .....	63

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

Recentemente os vírus transmitidos por artrópodes, também conhecidos como arbovírus, têm sido uma enorme problemática para a saúde pública, tanto do Brasil como do mundo. Em 2015, surtos de Zika, Dengue e Chikungunya preocuparam e reafirmaram a importância da pesquisa em relação a essas doenças, onde a globalização e o desenvolvimento de grandes centros urbanos permitiram uma distribuição global desses vírus, sendo observado infecções de Chikungunya em todos os continentes ao longo dos anos desde sua descoberta (CDC, 2019a).

O vírus da Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus pertencente à família *Togaviridae* (THIBERVILLE et al., 2013). O vírus foi originalmente isolado em 1952 na Tanzânia na região de Makonde, onde seu nome significa “aquilo que curva” no dialeto Makonde, devido aos graves sintomas de artralgia associadas pela infecção por Chikungunya (MARTINEZ et al., 2019). Sua transmissão habitual é realizada através do repasto sanguíneo de mosquitos da espécie *Aedes* spp, como o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, sendo o seu principal vetor o *Ae. aegypti* em áreas urbanas e o *Ae. albopictus* em áreas rurais (MONTERO, 2015).

Dentre os sintomas mais comuns que podem ser observados durante uma infecção por CHIKV na fase aguda estão a febre alta, dor de cabeça, artralgia e mialgia severa e exantema (BURT et al., 2012). Geralmente, a febre da Chikungunya é uma doença autolimitada, ou seja, os sintomas observados desaparecem alguns dias após a sua manifestação sem necessidade de tratamento específico, porém, em cerca de 40% dos casos (MCCARTHY et al., 2018), os pacientes infectados podem apresentar uma fase crônica caracterizada por artrite que tende a persistir por meses ou até anos, sintoma característico em infecções por alfavírus (LWANDE et al., 2015; MCCARTHY et al., 2018).

Analisando a faceta imunológica, a fase aguda da infecção por Chikungunya é caracterizada por uma forte resposta da imunidade inata, com forte presença de IFN- $\alpha$  e outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, acompanhada por uma resposta adaptativa, inicialmente desempenhada por linfócitos T CD8<sup>+</sup>, com intuito de erradicar com maior efetividade a instauração do vírus nas células do corpo e controlar as células infectadas (WAUQUIER et al., 2010). Apesar das respostas imunológicas dos pacientes que contraíram a febre da Chikungunya não serem totalmente elucidadas, é possível observar a importância do linfócito T CD8<sup>+</sup> durante o processo de recuperação do

enfermo, e, apesar de ser extensivamente conhecida a resposta do linfócito T CD8<sup>+</sup> frente à várias infecções virais, ainda existem lacunas importantes que necessitam ser preenchidas na instauração da febre Chikungunya, especialmente pelo fato desta doença apresentar um desenvolvimento para um quadro crônico no qual esse linfócito também toma parte (MCCARTHY et al., 2018).

Atualmente, não existe uma vacina comercial ou tratamento padronizado para a infecção pelo vírus da Chikungunya, apesar de algumas já estejam em testes clínicos (WEAVER et al., 2012), sendo o tratamento recomendado para a fase aguda repouso, ingestão abundante de líquido e utilização de anti-inflamatórios não esteroidais para o alívio sintomático. No caso da fase crônica, tratamento geralmente se dá semelhante ao utilizado em artrite reumatoide, com a utilização de metotrexato para diminuição do quadro inflamatório (MARTINEZ et al., 2019). A ausência de tratamento viáveis e específicos para Chikungunya deixam a desejar, visto que a existência de um controle dessa doença poderia auxiliar no não desenvolvimento da fase crônica. Dessa forma, a prospecção por um tratamento ou fármaco adequado seria de grande importância para a melhoria da qualidade de vida daqueles afligidos por esta virose.

A utilização de moléculas provindas de produtos naturais vêm sendo uma estratégia de grande interesse para a indústria farmacêutica, tendo contribuído vastamente na descoberta e desenvolvimento de importantes agentes terapêuticos. As riparinas, moléculas extraídas dos frutos imaturos da *Aniba riparia*, planta pertencente à família Lauraceae e conhecida popularmente como louro, são moléculas de origem natural que demonstraram possuir interessante atividade farmacológica, entre elas atividades anti-inflamatória (CARVALHO et al., 2013), ansiolítica (OLIVEIRA, 2012) e espasmolítica (THOMAS et al., 1994; CASTELO BRANCO et al., 2000), esta última sendo relacionada com a inibição da contração provocada pela acetilcolina e com modulação na concentração de cálcio intracelular. Dentre as riparinas testadas (riparina I, II e III), a riparina III se destacou como melhor candidato em cobaias na atividade bloqueadora dos canais de cálcio no íleo e no útero de murinos (CASTELO BRANCO et al., 2000). Estes canais de cálcio estão intrinsecamente ligados à ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e uma modulação imunológica pró-inflamatória (LEWIS, 2013). Pensando nisto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito imunomodulador da Riparina III na atividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em pacientes infectados por CHIKV tanto na sua fase aguda quanto na fase crônica.

# **REFERENCIAL TEÓRICO**

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

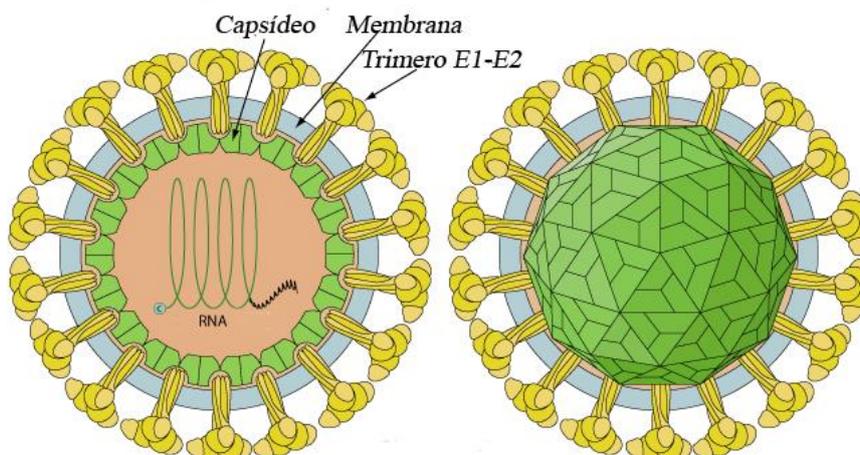
### 2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

O vírus da Chikungunya, como todos do gênero *Alphavirus*, possui formato esférico com um envelope formado por uma membrana fosfolipídica e caracterizado por um RNA de cadeia simples de senso positivo, com cerca de 12kb de comprimento e que codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1 a nsP4), cinco proteínas estruturais (E1, E2, E3, C e 6K) traduzidas a partir de duas sequências de abertura de leitura (ou ORFs – *Open Reading Frames*) (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017; SOLIGNAT et al., 2009). O vírus apresenta em seu genoma um cap de N-metil guanosina na posição final da extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3', assemelhando-se a um RNA mensageiro (RNAm) eucariótico (Figura 1).

As proteínas E1 e E2 são glicoproteínas presentes no envelope fosfolipídico da CHIKV, estas são responsáveis pela adesão e entrada do vírus nas células a serem infectadas (SILVA et al., 2017), esta adesão ocorre quando ocorre associação do CHIKV a um receptor celular ainda não descoberto, enquanto a penetração do patógeno na célula está associado a via endocítica clatrina-dependente (SOLIGNAT et al., 2009). As proteínas não-estruturais nsP1-4 codificadas no genoma do CHIKV estão diretamente envolvidos na replicação viral (BURT et al., 2017). As proteínas E3 e 6K são peptídeos líderes das estruturas E2 e E1, respectivamente. Eles são normalmente associados à marcadores de secreção e raramente são encontrados em um vírion maduro (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017; OMAN; DONK, 2010).

A primeira linhagem viral identificada do Chikungunya é de origem africana, isolada na floresta de Semliki. Acredita-se que esse vírus se espalhou pela Ásia através de navegações e, durante os subsequentes surtos epidêmicos causados por esse patógeno, foram isoladas outras linhagens virais, sendo atualmente reconhecidas quatro linhagens: a linhagem do oeste africano, a linhagem do leste, centro e sul africano (ECSA), e a asiática (BURT et al., 2017).

Figura 1 - Esquema da estrutura do vírus da Chikungunya



Fonte: [https://viralzone.expasy.org/625?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species) (Adaptado).

## 2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO

O vírus da Chikungunya apresenta dois ciclos de transmissão distintos: o ciclo enzoótico e o ciclo urbano (SILVA et al., 2018a). Estes dois ciclos têm como responsáveis pela propagação do vírus diferentes espécies de mosquitos do gênero *Aedes*. A transmissão enzoótica tem como responsáveis vários dípteros do gênero *Aedes*, como o *Ae. furcifer* e *Ae. taylori* (SILVA et al., 2018a) e ocorre quando a fêmea realiza o repasto sanguíneo em um primata não-humano ou em roedores infectados. Ao se alimentar de sangue infectado pelo CHIKV este díptero se torna um vetor deste vírus, que se replica ao penetrar as células epiteliais do intestino médio do *Aedes spp.*, onde posteriormente infecta as glândulas salivares e ovários do vetor, desta maneira o vírus pode ser transmitido para um novo hospedeiro através da saliva em um repasto sanguíneo posterior (LIM et al., 2018). O ciclo urbano ocorre majoritariamente por ação de duas espécies: *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (LIM et al., 2018), onde o repasto sanguíneo em humanos infectados podem acarretar um possível ciclo de transmissão quando um *Aedes* não-infectado realizar um repasto posterior em um humano saudável. Estas duas espécies são as principais responsáveis pela transmissão do CHIKV em todos os continentes que esse agente etiológico foi observado, isso se deve a alta capacidade adaptativa do *Ae. aegypti* a ambientes urbanos, que o permite realizar seu ciclo de vida em áreas domésticas (HIGUERA; RAMÍREZ, 2019).

Além dos ciclos de transmissão convencionais, também foi relatado a transmissão venérea do vírus para fêmeas de *Aedes* saudáveis a partir de contaminação

vertical de dípteros machos (MAVALE et al., 2010), também foi documentada a presença do vírus em gerações posteriores de descendentes de uma fêmea infectada (CHOMPOOSRI et al., 2016), estes dois fenômenos podem explicar o reaparecimento do CHIKV em regiões que a mesma tinha sido considerada erradicada. Também foi observado transmissão vertical entre mãe-feto em humanos (CAMPOS et al., 2016), além disso, a carga viral foi identificada em sêmen, sugerindo a possibilidade de infecção por relações sexuais, porém não foi confirmado nenhum caso de transmissão venérea em humanos (BANDEIRA et al., 2016a).

A fêmea do *Aedes aegypti* realiza a inoculação viral através do repasto sanguíneo, onde o vírus é introduzido nos capilares subcutâneos após a lesão provocada na derme do hospedeiro. Uma vez dentro dos capilares, o CHIKV inicia sua replicação após adentrar células da pele, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (PETITDEMANGE et al., 2015). Essa infecção intracelular ocorre após a ligação da glicoproteína E2 presente no vírus a receptores ainda não documentados da célula. Em seguida, o vírus adentra a célula através de uma endocitose mediada por clatrina, e, finalmente entra em meio citoplasmático após uma fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal mediada pela proteína E1 (SILVA et al., 2017). Ao chegar no citoplasma, o capsídeo presente no CHIKV é desestruturado para a liberação do RNA viral no citosol para a realização da tradução do mesmo e a síntese de proteínas não-estruturais nsP1-4 para produzir a estrutura de replicação responsável pela replicação do material genético, essa maquinaria se posiciona em estruturas adjacentes à membrana plasmática (SILVA et al., 2017). Por fim, as proteínas estruturais E1 e E2 são processadas no retículo endoplasmático e posteriormente transportadas para membrana plasmática onde o vírus é estruturado a partir de uma espécie de brotamento na membrana (SILVA et al., 2017).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

O vírus da Chikungunya, de origem africana, foi primeiramente isolado no planalto de Makonde na Tanzânia em 1952, após um surto de uma infecção por um vírus similar à dengue, porém com uma queixa de um novo sintoma, uma grave artralgia (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017). Acredita-se que existiram surtos prévios aos do planalto de Makonde, porém devido a semelhança sintomática do

CHIKV à dengue, a epidemia foi erroneamente atribuída ao vírus da dengue (SILVA et al., 2017).

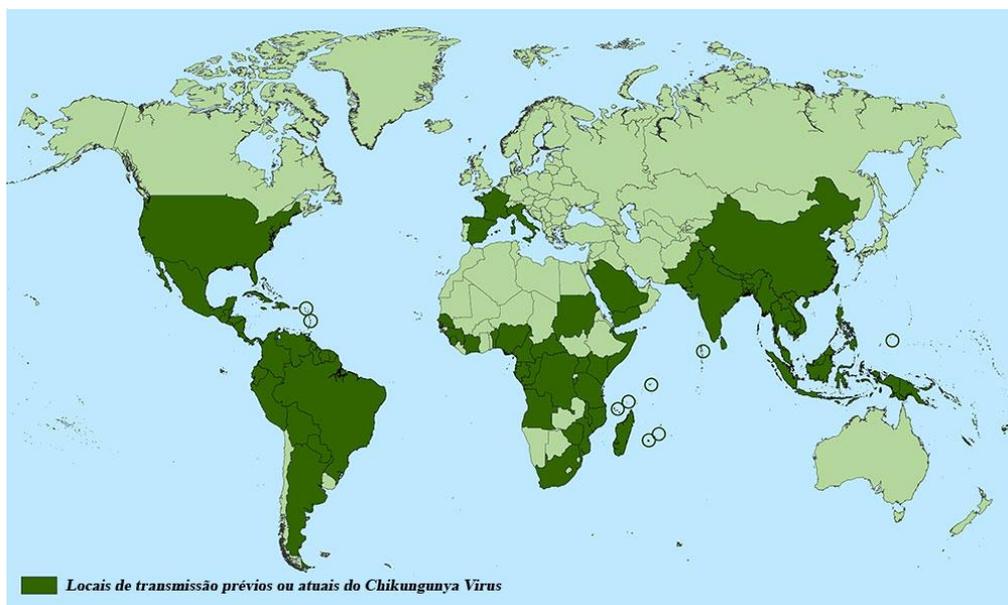
Desde o isolamento, o vírus permaneceu causando pequenos surtos em países africanos e sul asiáticos (POWERS; LOGUE, 2007). Apenas em 2004 um surto de maior escala foi observado, onde uma epidemia observada no Quênia se espalhou por vários países africanos e por ilhas do Oceano Índico, como a ilha de Comores e La Réunion, onde 215.000 e 255.000 pessoas foram infectadas pelo CHIKV, respectivamente (SILVA et al., 2017). Acredita-se que este surto se atribuiu a uma mutação na glicoproteína envelope E1 (a mutação E1-A226V) do vírus, que facilitou sua infecção em *Ae. albopictus*, tornando-os vetores mais viáveis (SILVA et al., 2017). Em 2007 foi documentado o aparecimento da CHIKV na Europa, que foi introduzida na Itália através de um viajante infectado (REZZA et al., 2007). Outra aparição do CHIKV na Europa foi observada em 2010 na França, onde dois casos autóctones do vírus foram documentados (GRANDADAM et al., 2011). Em 2013, a região dos Caribes foi a primeira região das Américas que sucedeu a detecção da primeira infecção, onde ocorreu rápida transmissão para outras regiões, resultando em 42 países e territórios da América do Sul, Central e do Norte apresentando casos documentados até o início de 2015 (BURT et al., 2017).

No Brasil, o primeiro caso autóctone foi documentado em 2014 na cidade de Oiapoque no Amapá, e em Feira de Santana na Bahia (SILVA et al., 2018b). Após análise molecular do vírus, foi observado que os dois casos possuíam diferentes linhagens, o encontrado no Amapá pertencia à linhagem asiática enquanto a encontrada na Bahia se identificava como a linhagem ECSA (SILVA et al., 2018b). Entre o período do primeiro caso em 2014 e o fim de 2015, foram identificados 47.830 novos casos (SILVA et al., 2018b), este número possivelmente é maior devido ao fato do CHIKV ser uma virose onde o paciente se recupera rapidamente, em boa parte dos casos sem a necessidade de ir à órgãos de saúde e notificar o caso. Um dos maiores fatores de sucesso para a introdução do CHIKV no Brasil foram as características climáticas e ambientais, que favorecem a disseminação do *Ae. aegypti* e do *Ae. albopictus*, os principais transmissores. Acoplado ao clima, outro fator importante para a instauração da epidemia de Chikungunya é a imunidade não específica da população para o CHIKV, uma vez que o contato da população com este agente etiológico é inédito.

Desde o início da infecção de Chikungunya no Brasil, o Ministério da Saúde incluiu a doença nos Boletins Epidemiológicos, documentos eletrônicos de livre acesso

ao público que são emitidos de formas mensal e semanalmente, informando casos de doenças sazonais, sendo de grande importância para monitoramento de infecções por arboviroses como Dengue, Zika e Chikungunya e outras doenças. De acordo com o Boletim Epidemiológico emitido pelo Ministério da Saúde, do período do dia 30/12/2018 até o início de fevereiro de 2019, foram registrados 4.149 casos possíveis de infecção pelo CHIKV, correspondendo uma incidência de 2,0 casos/100 mil habitantes (SVS, 2019).

Figura 2 - Mapa ilustrando locais que apresentam ou apresentaram infecções por Chikungunya.



Fonte: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html> (Adaptado).

## 2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Assim como as outras arboviroses, as manifestações clínicas da infecção por Chikungunya são majoritariamente sintomatológicas. Após a infecção do vírus através do repasto sanguíneo do mosquito, o CHIKV possui um período de incubação assintomática que dura em média três a sete dias (PETITDEMANGE et al., 2015). Comparada às outras arboviroses, a febre da Chikungunya apresenta maiores chances de apresentar sintomas, onde cerca de 75% dos infectados apresentam alguma manifestação da doença, enquanto no caso da Zika e Dengue, apenas 20% dos pacientes apresentam infecções sintomáticas (MARTINEZ; LA GARZA; CUELLAR-BARBOZA, 2019). Após o período de incubação, o sintoma mais comum observado nos pacientes é uma febre alta, e associada à outras manifestações como cefaleia,

mialgia, diarreia, artralgia, dor abdominal, êmese e erupções cutâneas (PETITDEMANGE et al., 2015).

Dentre todos os indícios da infecção, a poliartralgia é o sintoma mais característico da febre da Chikungunya (CHIKF), afetando principalmente, mas não restritivamente as articulações dos tornozelos, pulsos e falanges (PETITDEMANGE et al., 2015). Normalmente, estes sintomas se resolvem até o 21º dia de infecção, porém, em alguns casos, a artrite pode perdurar por meses ou até anos, instaurando a fase pós-aguda que consiste na persistência das dores por até três meses, e posteriormente a fase crônica que possui tempo indefinido para cessão das dores (EDINGTON; VARJÃO; MELO, 2018).

A fase crônica tende a acometer cerca de 10 a 60% dos infectados e é caracterizada normalmente por poliartrite, sendo fatores de risco importantes para a instauração dessa condição clínica a idade avançada, sexo feminino e gravidade da artralgia na fase aguda (MCCARTHY et al., 2018). O CHIKV também possui a capacidade de infectar osteoblastos, podendo ser um dos fatores para a artrite erosiva (BURT et al., 2017). Apesar de a artrite causada pela CHIKF ser sintomaticamente semelhante à artrite reumatoide, indícios mostram que não há uma correlação direta entre uma infecção por Chikungunya e o desenvolvimento de um quadro de artrite reumatoide, isso pode ser confirmado pela ausência do fator reumatoide (RF) e do anticorpo anticitrulina (AcP) nos pacientes que apresentavam a fase crônica (MANIMUNDA et al., 2010).

Além dos sintomas habituais da infecção, a CHIKF pode apresentar manifestações não usuais, como por exemplo a presença da síndrome de Guillain-Barré, também foram observados casos de hepatite e manifestações cardiológicas. Na fase crônica da doença também foram relatadas incidências incomuns, como alopecia e complicações oftalmológicas como retinite e uveíte também foram identificadas (SILVA et al., 2018a e WEAVER et al., 2012). Em casos de infecções congênitas, foram observados sintomas variados nos recém-nascidos, como febre, apneia, encefalite, falta de apetite e uma variedade de manifestações cutâneas, como lesões bolhosas e irritações (CARVALHO et al., 2019; GOPAKUMAR et al., 2012; BANDEIRA et al., 2016b).

Casos de óbito são raros em uma infecção por Chikungunya, geralmente são acompanhados por outras complicações clínicas prévias do paciente e/ou idade avançada. Em um estudo na ilha de La Reunion que abrangeu 157 pacientes apenas

cinco destes pacientes vieram a óbito, onde a média de idade dos infectados era de 79.4 anos, variando de 70 a 88 anos (BORGHERINI et al., 2007).

## 2.5 DIAGNÓSTICO

Os métodos que podem ser utilizados para a detecção da infecção por Chikungunya podem ser tanto diretos quanto indiretos, onde o método direto se trata da identificação da presença do vírus do paciente, ou seja, com enfoque em identificar componentes virais como material genético do mesmo ou antígenos, enquanto o indireto consta na observação de sinais de respostas imunes do hospedeiro ao vírus (MONTERO, 2015). A escolha do teste utilizado dependerá dos recursos disponíveis para realização do mesmo e o tempo que se passou desde a instauração da doença.

Normalmente, é realizado um diagnóstico preliminar baseado em algumas informações do paciente, como sintomas, se o mesmo habitou ou frequentou áreas endêmicas e sua rotina em geral. Uma das maiores dificuldades para o diagnóstico através de sintomas clínicos da Chikungunya é sua semelhança a outras arboviroses, como Dengue e Zika, desta forma, estas suspeitas só podem ser confirmadas através de testes mais específicos, especialmente em áreas que estes vírus cocirculam (CDC, 2019b; JOHNSON et al., 2016). Caso seja observado manifestações clínicas relacionadas à infecção por Chikungunya e esteja confirmado que o paciente visitou áreas endêmicas, ele será caracterizado como um suspeito de contrair CHIKV.

O teste direto normalmente utilizado para a detecção do CHIKV em um paciente é a reação de polimerização em cadeia utilizando transcriptase reversa (RT-PCR) com primers específicos para amplificação do material genético viral. Geralmente ele é utilizado quando existe uma grande carga viral no sangue e no soro do hospedeiro, desta forma, este teste é realizado assim que os sintomas aparecem e pode ser realizado até seis dias depois da instauração sintomática para que a detecção por esta técnica seja bem-sucedida (JOHNSON et al., 2016).

O isolamento viral é outro teste direto utilizado para detecção de Chikungunya, apesar de não ser regularmente utilizado para diagnóstico rotineiramente. A técnica consiste na coleta de soro de um paciente com até sete dias do estabelecimento da doença e na inoculação do mesmo em linhagens celulares de mamíferos ou insetos suplementadas por um meio de cultura. A detecção de replicação viral por ensaios de imunofluorescência ou RT-PCR indicam um resultado positivo para um quadro de infecção por Chikungunya. (SILVA et al., 2018a).

Testes indiretos para diagnóstico são geralmente utilizados quando o paciente já apresenta mais de seis dias de infecção, podendo ser detectados a imunoglobulina M e imunoglobulina G (IgM e IgG, respectivamente). A detecção dos anticorpos IgM e IgG é a partir de ensaios imunológicos como ensaio imuno-absorvente de captura por ligação de anticorpo (ELISA), onde o IgM pode ser detectada em fases agudas e pós-agudas, englobando um período de dois dias até três meses da instauração da doença, enquanto o IgG pode ser detectado por muitos anos (SILVA et al., 2018; JOHNSON et al., 2016).

## 2.6 IMUNOLOGIA

Após a inoculação do vírus em um hospedeiro proveniente do repasto sanguíneo de um mosquito fêmea, o CHIKV adentra os capilares subcutâneos e se replica em células como fibroblastos, macrófagos e células endoteliais (PETITDEMANGE, 2015). Após a reprodução nas células infectadas, o vírus se espalha rapidamente pelo sistema circulatório atingindo taxas médias de viremia de  $10^7$  PFU/mL de plasma na fase aguda da infecção, que ocorre nos primeiros seis dias após a inoculação viral (THIBERVILLE et al., 2013). Como em outras infecções virais, a resposta imune inicial da CHIKV é mediada por forte presença de interferons de tipo I e outras quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (NG et al., 2009; PETITDEMANGE et al., 2015; SILVA et al., 2017).

Normalmente, os sintomas relacionados à fase aguda são resolvidos dentro de duas semanas após às manifestações sintomáticas, a diminuição da carga viral está relacionada ao desenvolvimento da resposta adaptativa CHIKV-específica (TANABE et al., 2018). Acredita-se que casos crônicos e o dano ao tecido sinovial estão relacionados à persistência de material genético e proteínas do vírus em locais imunoprivilegiados como o tecido sinovial, acoplados à persistência do CHIKV também foi observada nestes tecidos a expressão gênica de IL-10, CCL2 e IFN- $\alpha$  (HOARAU et al., 2010).

A primeira linha de defesa contra a CHIKV são as células da imunidade inata como por exemplo células Natural Killer (NK), que possuem a capacidade de mediar uma resposta antiviral através da produção de citocinas imunoregulatórias (como IFN- $\gamma$ ) e promover atividade citotóxica através de grânulos citolíticos e por receptores de membrana (PETITDEMANGE et al., 2011), ao mesmo tempo que a infiltração de NKs em tecidos sinoviais promovem atividade pró-inflamatória e instauração de artralgia (HOARAU et al., 2010). Os macrófagos e monócitos apresentam uma dualidade em sua

função na infecção, onde ao mesmo tempo que o macrófago serve como reservatório viral contribuindo para danos associados à tecidos sinoviais, eles também podem contribuir com o controle viral através da sua atividade fagocítica e expressão de quimiocinas como CCL2, CCL4, CCL5, IL-8 e IP-10, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos que por sua vez auxiliam na defesa antiviral (PETITDEMANGE et al., 2013; SOURISSEAU et al., 2007). A artralgia também é agravada por respostas pró-inflamatórias associadas à migração de macrófagos e monócitos para os tecidos sinoviais. Além disso, RNA e antígeno viral foram detectados em macrófagos do tecido sinovial, acredita-se que esse fator está relacionado à instauração da fase crônica da doença (HOARAU et al., 2010; MCCARTHY et al., 2018). A imunidade adaptativa também desempenha importante papel no *clearance* do CHIKV, anticorpos de isotipos IgM e IgG são detectados em média dois e sete dias após o aparecimento dos sintomas (TANABE et al., 2018; SILVA et al., 2017), e estão diretamente relacionados com a neutralização direta do vírus a partir da ligação com a estrutura proteica E2 e com a ativação do sistema complemento (FOX; DIAMOND, 2016 e SMITH et al., 2015).

Os linfócitos T tem sua função pouco elucidada na literatura, apesar de se mostrar bastante presente tanto na fase aguda quanto na fase crônica. As citocinas do perfil  $T_H1$  estão presentes no período inicial da infecção e ao mesmo tempo que promovem ativação celular também contribuem para lesões teciduais (PETITDEMANGE et al., 2015; VENUGOPALAN; GHORPADE; CHOPRA, 2014). Em estágios iniciais da doença, foi observada um quadro de linfopenia nos pacientes, condição que perdura por cerca de dois meses (PETITDEMANGE et al., 2015). Os linfócitos T  $CD8^+$  são ativados logo após a aparição dos sintomas, com seu pico de ativação ocorrendo nos dois primeiros dias após o surgimento das manifestações clínicas, enquanto as células T  $CD4^+$  possuem uma população reduzida em relação à um indivíduo saudável nestes dias iniciais, ocorrendo um pico de ativação destes linfócitos apenas a partir do quarto dia (WAUQUIER et al., 2010). Em contrapartida, os linfócitos T  $CD8^+$  e  $CD4^+$  estão presentes no fluido sinovial durante diferentes fases da doença, onde ambos se encontram durante a fase aguda e apenas as células T  $CD4^+$  persistem de maneira relevante na fase crônica, sendo possíveis contribuidores para um quadro pró-inflamatório nas articulações e a artrite associada (HOARAU et al., 2010).

Hoarau e colaboradores (2013) demonstraram que durante a fase crônica da doença o  $IFN-\gamma$  periférico foi majoritariamente produzido pelas células T  $CD8^+$ , e, em outras arboviroses, o papel do  $CD8^+$  na fase aguda está associado à rápida recuperação

dos pacientes de um quadro de poliartrite (POWERS; LOGUE, 2007). Em contrapartida, o T CD8<sup>+</sup> aparece ativado ou em estado inflamatório em casos de artrite autoimune, com a produção de TNF, IL-17 e granzima B aumentada em relação à indivíduos saudáveis (PETRELLI; VAN WIJK, 2016), a produção dessas citocinas está associada a um quadro pró-inflamatório capaz de agravar a patologia da fase crônica (OMIDIAN et al., 2018). De fato, estudos com murinos sugerem que um tratamento neutralizando IL-17 reduz a inflamação das articulações, a destruição da cartilagem e a erosão óssea (LUBBERTS et al., 2004).

A ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> pode ser detectada a partir da presença de CD69, sendo considerado um marcador de ativação dessas células imunes podendo ser observado apenas duas horas após ativação do linfócito (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017). A expressão de CD69 também está relacionada a cronicidade da doença, sendo identificadas em células T e NKs infiltradas nos tecidos sinoviais tanto na CHIKV, quanto na artrite reumatoide (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017; MCCARTHY et al., 2018).

Quando ativado, o linfócito T CD8<sup>+</sup> citotóxico (CTL) possui a capacidade de se conjugar à uma célula infectada e induzir sua apoptose por duas principais vias, a primeira via consiste na ligação do ligante Fas (CD95) presente no CTL com o receptor FasL (CD95L) da célula infectada, acarretando na ativação das caspases e induzindo a célula ao estado de apoptose (LOWIN et al., 1994). A segunda via baseia-se na liberação de proteínas citolíticas como granzima e perforina, esse processo ocorre através da degranulação do CTL, que pode ser observado através da presença do CD107, um marcador de degranulação (JENKINS; GRIFFITHS, 2010). A segunda via pode atuar de duas maneiras, na ativação da via das caspases pela granzima B, ou pela ativação de uma via independente de caspase, que causa danos ao DNA tanto da célula infectada quanto do vírus infectante, essa via é ativada pela granzima A (TRAMBAS; GRIFFITHS, 2003).

## 2.7 RIPARINA III

As riparinas são uma classe especial alcalóides que possuem função amida, também conhecidos como alcanidas. Essas moléculas foram primeiramente extraídas do fruto imaturo da *Aniba riparia*, uma árvore da família das Lauraceae normalmente encontrada na região da Amazônia e Guiana e popularmente conhecida como louro

(NUNES et al., 2013). Devido ao seu uso na medicina popular, essas moléculas despertaram interesse na investigação do seu potencial farmacológico, sendo facilmente obtidas em laboratórios de síntese orgânica, onde ganharam o nome riparina baseado na espécie da árvore a qual foram primeiramente isoladas.

A partir da *Aniba riparia* (Ness) Mez, foram extraídas uma variedade de riparinas, onde se destacaram as moléculas denominadas riparina I, II e III, justamente por apresentarem atividades farmacológicas interessantes, como a atividade ansiolítica e antidepressiva pela riparina I e III, e a atividade antinociceptora e anti-inflamatória pela riparina II provavelmente modulada por histamina e/ou acetilcolina (CARVALHO et al., 2013; CARVALHO et al., 2018; OLIVEIRA, I. C. M. O., 2012; SOUSA et al., 2004). Derivados sintéticos da riparina (como a riparina A e riparina B), apresentaram atividade anti-inflamatória em murinos por redução de níveis de citocina pró-inflamatórias e redução do número de neutrófilos e leucócitos na área de inflamação (SANTIAGO et al., 2015; SILVA et al., 2015).

Carvalho e colaboradores (2013) demonstraram uma atividade anti-inflamatória de uma das riparinas, caracterizada por uma redução de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na inflamação aguda, indicando que as riparinas possam ter outras atividades imunomoduladoras em respostas desempenhadas por células imunes.

As riparinas I, II e III apresentaram interessante atividade relaxadora em contrações provocadas por histamina e acetilcolina no íleo e no útero de cobaias, sendo a riparina III quase duas vezes mais efetiva que as outras moléculas, e sugerindo uma redução da concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular através da inibição da liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques via receptores de IP<sub>3</sub>, cuja atividade pode ser modulada através da ativação de receptores muscarínicos acoplados à G<sub>q/11</sub>/PLC- $\beta$ 1 (CASTELO BRANCO et al., 2000; THOMAS et al., 1994).

Diante do exposto, o trabalho avaliou a atividade imunomoduladora da riparina III durante a infecção aguda e crônica causada pelo vírus da Chikungunya.

# **OBJETIVOS**

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a resposta imunológica da infecção pelo vírus da Chikungunya (CHIKV) em pacientes tratados ou não com riparina III, correlacionando as fases aguda e crônica da doença com indivíduos saudáveis.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

I – Avaliar em linfócitos T CD8<sup>+</sup> a expressão dos marcadores CD69, IL-17, CD107, granzima e perforina em pacientes agudos e crônicos na infecção por CHIKV em relação à indivíduos saudáveis.

II – Avaliar o potencial imunomodulador da riparina III em linfócitos T CD8<sup>+</sup> através da expressão de marcadores CD69, IL-17, CD107, granzima e perforina em pacientes agudos e crônicos na infecção por CHIKV em relação à indivíduos saudáveis, correlacionando com grupos agudos e crônicos não tratados com riparina.

# **METODOLOGIA**

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa- CONEP (CAAE: 59833416.6.0000.5183), estando enquadrada no projeto intitulado “Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue” (Apêndice I), e todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste estudo foram esclarecidos sobre a importância do trabalho e participaram voluntariamente da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice II).

### 4.2 SELEÇÃO DE CASOS AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE

As amostras foram selecionadas de pacientes (n=5) com até 7 dias do início do aparecimento dos sinais e sintomas compatíveis com infecção por Chikungunya (CHIK A) e pacientes (n=5) com a CHIKV crônica (CHIK C), com permanência de sintomas articulares após 6 meses de infecção, provenientes do Hospital Universitário Lauro Wanderley- HU na cidade de João Pessoa- PB. Todas as amostras foram acompanhadas dos dados do paciente, tais como número e ficha de identificação, bem como dados relatados do início da doença. Além da coleta dos pacientes infectados foi realizada a coleta do controle negativo, em indivíduos que nunca tiveram contato com o CHIKV (n=6), após a coleta foi realizada a sorologia.

### 4.3 OBTENÇÃO DOS LEUCÓCITOS

#### 4.3.1 Banco de amostras

As amostras foram coletadas em tubos de heparina com 10mL de sangue e outro tubo sem anticoagulante com 2mL. Foi criado um banco de dados para o armazenamento das informações obtidas referentes às amostras. Cada amostra recebeu um código de identificação para o controle interno (ex: ARB00).

#### 4.3.2 Obtenção do soro

Os tubos sem anticoagulante da coleta permaneceram em descanso por 1 hora, sendo então centrifugados a 1500rpm, 25°C por 5 minutos. Foram abertos em fluxo estéril para transferência de 1 mL de soro para eppendorfs (código de controle interno). Seguindo para congelamento no freezer -20°C overnight, e transferido para -80°C no dia seguinte.

### **4.3.3 Obtenção de leucócitos**

Cerca de 8 mL de sangue heparinizado foi utilizado para obtenção dos leucócitos de pacientes com chikungunya e indivíduos saudáveis. Os leucócitos foram obtidos a partir da lise das hemácias com 12 mL de solução de lise, que foram colocados em tubo de Falcon de 15 mL, logo após o tubo foi vortexizado ativamente e incubado por 10 minutos protegido da luz. Em seguida, foi realizada a centrifugação a 2000 rpm, 25°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi vortexizado e completado o volume para 12 mL de solução salina. O procedimento de lavagem foi realizado até 2 vezes. Após a última lavagem foi desprezado o sobrenadante e o pellet foi resuspenso em 500µL de PBS e as células seguiram para o protocolo de marcação de citometria de fluxo.

### **4.3.4 Extração do RNA viral**

Para realização da técnica de PCR em tempo real foi extraído o RNA viral das amostras de soro através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), seguindo protocolo predeterminado pelo fabricante. A detecção do CHIKV, seguindo protocolo específico descrito por Lanciotti e colaboradores (2007) para o vírus foi realizado através da técnica de qPCR.

## **4.4 TRATAMENTO COM RIPARINA III**

Os leucócitos obtidos do sangue periférico dos pacientes com Chikungunya aguda (n=5) e crônica (n=5) foram tratados durante 18 horas com o alcalóide Riparina III (10µg/mL) gentilmente cedida pelo prof. Dr. José Maria Barbosa Filho para avaliação de mudanças fenotípicas que podem ocorrer com a imunomodulação produzida por essa droga. O tempo e a dose do tratamento foram obtidos em testes anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa.

## **4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA DAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup>**

### **4.5.1 Protocolo de marcação dos leucócitos após o tratamento com as drogas em estudo.**

Utilizando uma placa estéril de 96 poços foram adicionados em cada poço 25µL de células ( $2,5 \times 10^5$ ), foi realizado ou não o tratamento com drogas em estudo em 18h. Após os tempos de incubação, em poços que foram realizadas marcações intracelulares foi adicionado 10µL de brefeldina, essa substância age sobre o complexo de Golgi impedindo a exportação de proteínas para o meio extracelular possibilitando a

marcação de citocinas intracelulares. Em seguida foi adicionado 165µL de meio RPMI. A placa foi incubada em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por quatro horas. Em seguida foi retirada da estufa e centrifugada por 8 minutos (1300rpm, 4°C). O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas por agitação. Em sequência foram adicionados os anticorpos marcadores de superfície, conforme a titulação padronizada através do teste de padronização de reagentes. Posteriormente a adição dos anticorpos, a placa protegida da luz foi incubada por 15 minutos a 4°C. Após o término do tempo de incubação foi adicionado 150µL de PBS gelado em todos os poços e a placa foi centrifugada (8 minutos, 1300rpm, 4°C). Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado, vertendo a placa, e as células foram suspensas através de agitação. Foi adicionado 100µL de PBS e 100µL de formaldeído 4% em cada poço para fixação das marcações realizadas, o período de incubação foi de 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, centrifugação por 8 minutos (1300rpm, 4°C), desprezar sobrenadante e suspender as células.

As células foram lavadas com 150µL de PBS (centrifugar, desprezar sobrenadante e suspender as células). Realizou-se a permeabilização celular através da adição de 150µL de PB (Permeabilization Buffer), e foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. A placa foi centrifugada, o sobrenadante desprezado e as células suspensas. Em sequência, foram adicionados aos poços os anticorpos intracelulares com as concentrações pré-determinadas pelo teste de titulação. Foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada (8 minutos, 1300rpm, 4°C), sobrenadante foi desprezado e placa agitada para suspensão das células. As células foram lavadas por centrifugação com 150µL de PB. Por fim, ao desprezar o sobrenadante e agitar a placa, as células foram diluídas em 200µL de Wash B e incubadas overnight a 4°C protegidas da luz.

#### **4.5.2 Anticorpos monoclonais fluorescentes**

Os anticorpos monoclonais, com seus respectivos canais de citometria, que foram utilizados para as marcações extracelulares serão: anti-CD69 (FITC), anti-CD8 (APC), anti-CD107A (PE). Para as marcações intracelulares foram utilizados os anticorpos: anti-IL-17 (PE), anti-GRANZ-B (FITC) e anti-PERF (PE).

#### **4.5.3 Citometria de fluxo**

Os painéis de marcações celulares realizados com anticorpos monoclonais foram avaliados em citômetro de fluxo – FACScantoII (Becton & Dickinson)

imediatamente ou no máximo 24 horas após a marcação descrita. As amostras foram transferidas dos poços da placa para os tubos de citometria, agitando-se levemente de forma a suspender as células.

Durante o processo de aquisição de dados foram obtidos 50.000 eventos. A análise dos dados foi realizada pelo software Flowjo (Treestar), um software de computador específico para análise de dados de citometria.

#### 4.6 ANÁLISE ESTÁTISTICA

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism (Versão 5.01, Graphpad Software, Inc.) (SAS Institute Inc.). Para análise comparativa entre os diferentes grupos foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney, com o objetivo de detectar diferenças entre os grupos de indivíduos não infectados, e os pacientes infectados o vírus da chikungunya, foi realizado o teste Wilcoxon, no intuito de realizar análises pareadas. As diferenças estatisticamente significativas serão consideradas quando  $p \leq 0.05$ .

# **RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DADOS DOS PACIENTES AVALIADOS

Analisando os dados dos pacientes e indivíduos saudáveis envolvidos na realização deste trabalho, foi observado no grupo de enfermos apresentando a fase aguda da infecção uma média de idade de 36 anos (29-43 anos) e razão de 3:2 (Mulheres:Homens) (Quadro 1). Para os pacientes que desenvolveram o quadro crônico da doença, a idade foi em média de 31,8 anos (22-41 anos) e razão de gênero é de 4:1 (Mulheres:Homens) (Quadro 2). Já os controles apresentaram média de idade 38 anos (20-51 anos) e razão 5:1 (Mulheres:Homens) (Quadro 3). Os pacientes com quadro agudo da doença relataram a presença de sintomas como febre alta (média de 38,8°C), vômito, exantema, edema articular, artralgia, mialgia, cefaleia, exantema, e em alguns casos dor retro orbital. Os pacientes crônicos descreveram a presença de artralgia, e, dor retro orbital e exantema.

Quadro 1: Descrição dos dados do grupo Chikungunya Aguda

CÓDIGO	Idade	Gênero	Tempo de início dos sintomas (Dias)	Sinais e Sintomas
ARB 12	Não informado	M	5	Febre (39.2°C), cefaleia, vômito, exantema, mialgia e artralgia
DENG 37	36	F	1	Febre (38°C), vômito, exantema e edema articular
ARB38	Não informado	F	5	Febre (40°C); mialgia, artralgia, cefaleia, hipertrofia ganglionar
DENG 41	43	M	1	Febre (38°C), cefaleia, edema leve, exantema, dor nas costas e olhos
DENG 43	29	F	4	Febre (39° C), vômito, edema articular, náusea, prurido e exantema macular
Média	36	(3F:2M)	3,2	-

Fonte: Própria. A tabela detalha o código utilizado para identificação do paciente, a idade, o gênero, o tempo de início dos sintomas e os sintomas do grupo estudado. M representa gênero Masculino e F representa gênero Feminino.

Quadro 2: Descrição dos dados do grupo Chikungunya Crônica.

CÓDIGO	Idade	Gênero	Tempo de início dos sintomas (Meses)	Sinais e Sintomas
ARB 18	33	F	10	Edema, artralgia, dor retro orbital
ARB 19	29	F	6	Febre, edema nas extremidades, artralgia nos membros inferiores; exantema.
ARB 20	34	F	7	Artralgia, edema nas pernas, exantema
ARB 27	22	M	8	Artralgia e edema
ARB 28	41	F	10	Cefaleia, exantema, edema, prurido, dor retro orbital
Média	31.8	(4F:1M)	8.2	-

Fonte: Própria. A tabela detalha o código utilizado para identificação do paciente, a idade, o gênero, o tempo de início dos sintomas e os sintomas do grupo estudado. M representa gênero Masculino e F representa gênero Feminino.

Quadro 3: Descrição dos dados do grupo controle.

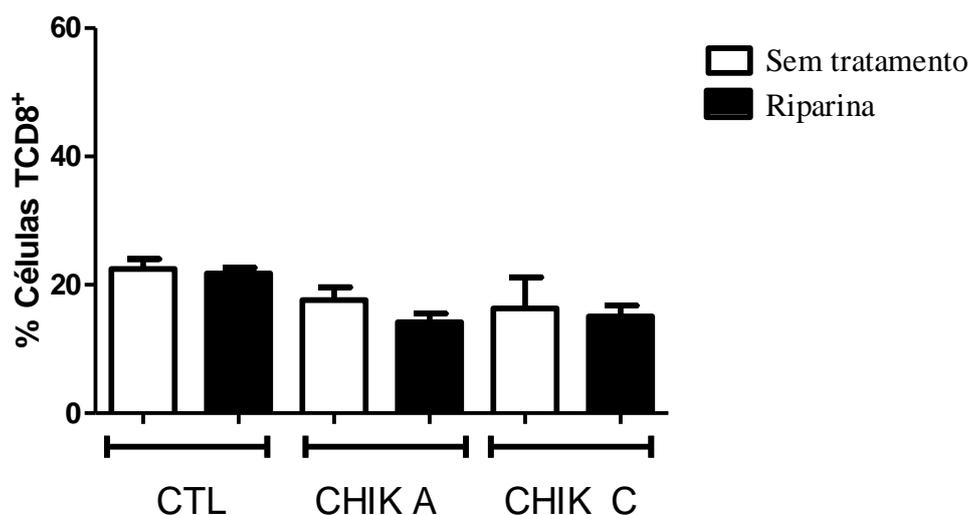
Código	Idade	Gênero	Tempo de início dos sintomas	Sinais e Sintomas
CTL 01	50	F	-	Indivíduo Saudável
CTL 02	51	F	-	Indivíduo Saudável
CTL 03	20	F	-	Indivíduo Saudável
CTL 04	51	F	-	Indivíduo Saudável
CTL 05	31	M	-	Indivíduo Saudável
CTL 06	25	F	-	Indivíduo Saudável
Média	38	(5F:1M)	-	-

Fonte: Própria. A tabela detalha o código utilizado para identificação do paciente, a idade, o gênero, o tempo de início dos sintomas e os sintomas do grupo estudado. M representa gênero Masculino e F representa gênero Feminino.

## 5.2. NÚMERO DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III

As análises por citometria de fluxo do número total das células T CD8<sup>+</sup> não indicaram nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados, sendo eles tratados ou não com riparina III (Figura 3).

Figura 3 -Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III.

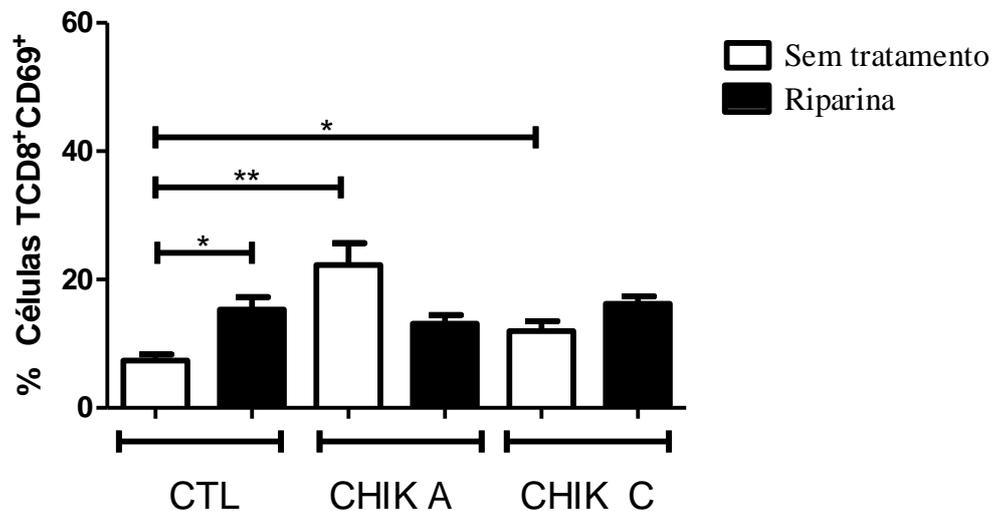


Fonte: Própria. Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> em grupo controle (CTL), CHIKV agudo (CHIK A) e CHIKV crônico (CHIK C) tratados ou não com riparina III.

## 5.3. AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> EXPRESSANDO CD69 EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III

A avaliação da expressão do marcador de ativação da célula T CD8<sup>+</sup> também foi mensurada. Dentre os grupos não tratados com riparina III, foi observada uma diferença entre o grupo controle e os grupos agudo e crônico, onde as duas populações apresentaram uma expressão elevada de CD69 em relação ao controle. Nos grupos tratados, é possível observar um aumento da expressão do marcador no grupo controle tratado em relação ao não tratado (Figura 4).

Figura 4 - Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> expressando CD69 em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III.

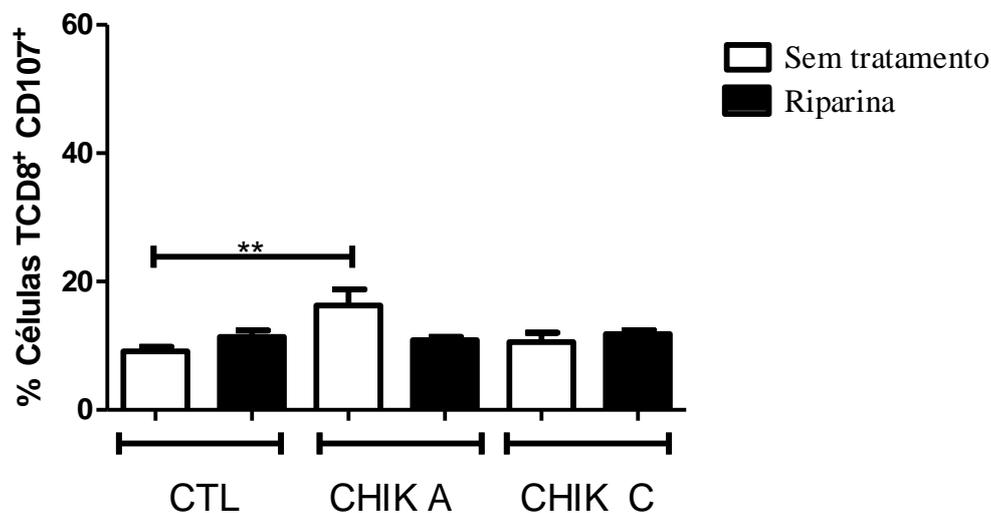


Fonte: Própria. Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> em grupos controle (CTL), agudo (CHIK A) e crônico (CHIK C) tratados ou não com riparina III.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO POR CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLE TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III

Através da análise por citometria foi possível avaliar o marcador de degranulação da célula T CD8<sup>+</sup>. Dentre os grupos estudados, a população aguda não tratada com a riparina III apresentou um aumento significativo na expressão de CD107 em relação ao grupo controle não tratado (Figura 5).

Figura 5 - Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> expressando CD107 em pacientes controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III.

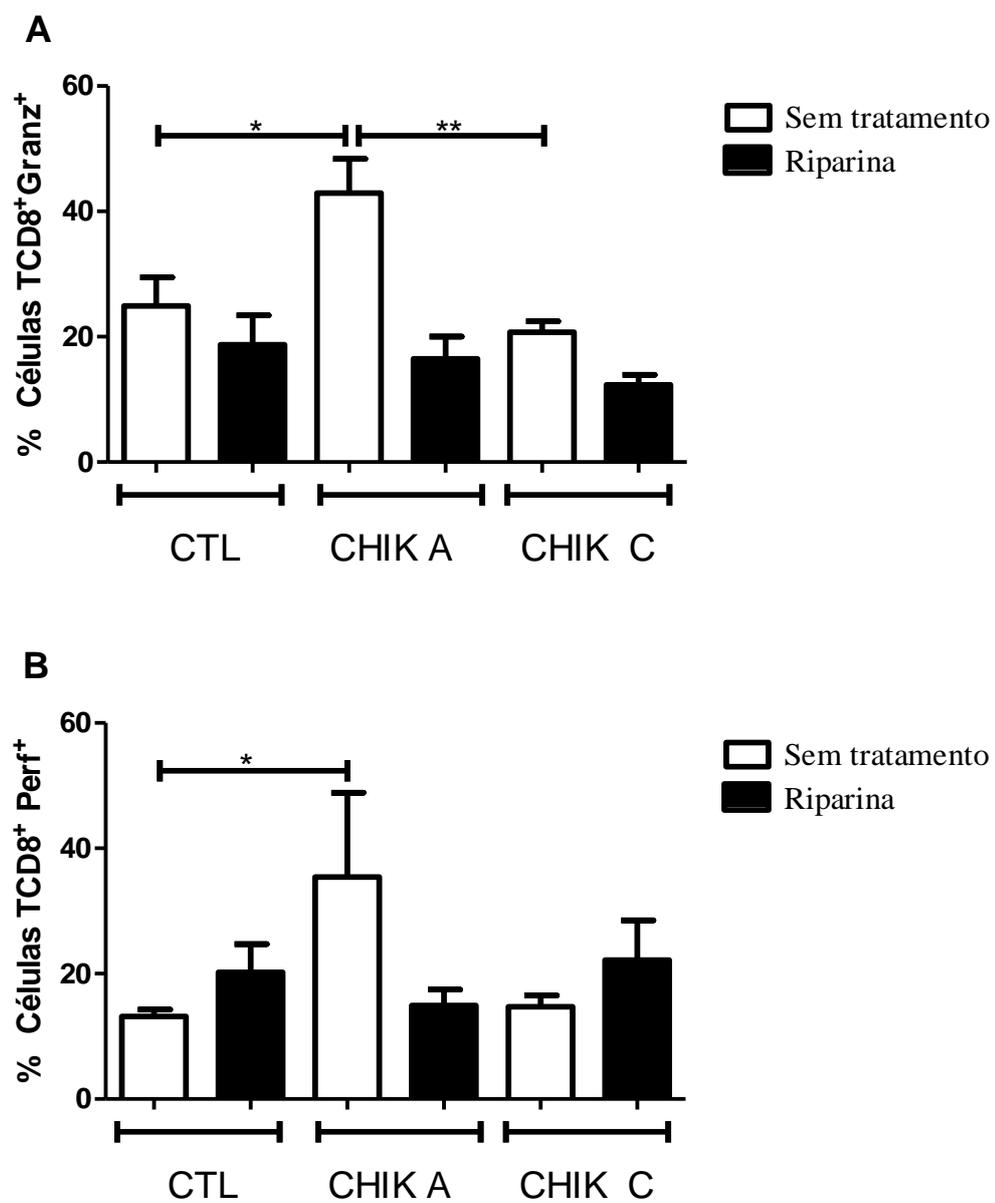


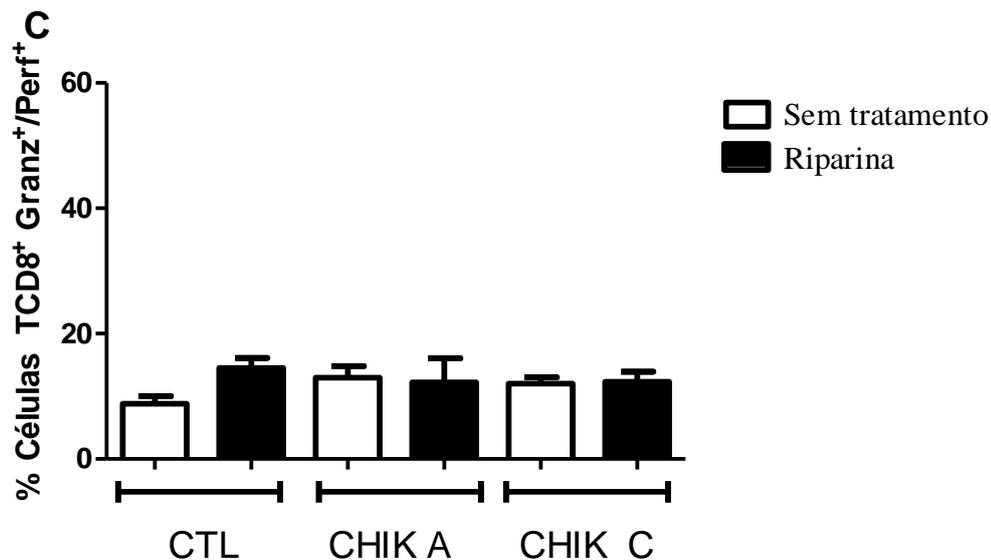
Fonte: Própria. Frequência de células T CD8<sup>+</sup> expressando CD107 dos grupos controle (CTL), CHIKV agudo (CHIK A) e CHIKV crônico (CHIK C) tratados ou não por riparina III.

##### 5.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE GRÂNULOS PELAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLES TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III.

A produção de grânulos citotóxicos pelas células T CD8<sup>+</sup> também foi avaliada em indivíduos controle, e em pacientes CHIKV agudo e crônico. Nos grupos não tratados, foi avaliado um aumento na expressão da granzima e perforina durante a fase aguda da CHIKV em relação ao controle. Em relação à coexpressão Granz<sup>+</sup>/Perf<sup>+</sup>, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos estudados (Figura 6).

Figura 6 - Porcentagem de células T CD8+ expressando granzima, perforina e granzima/perforina em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III.



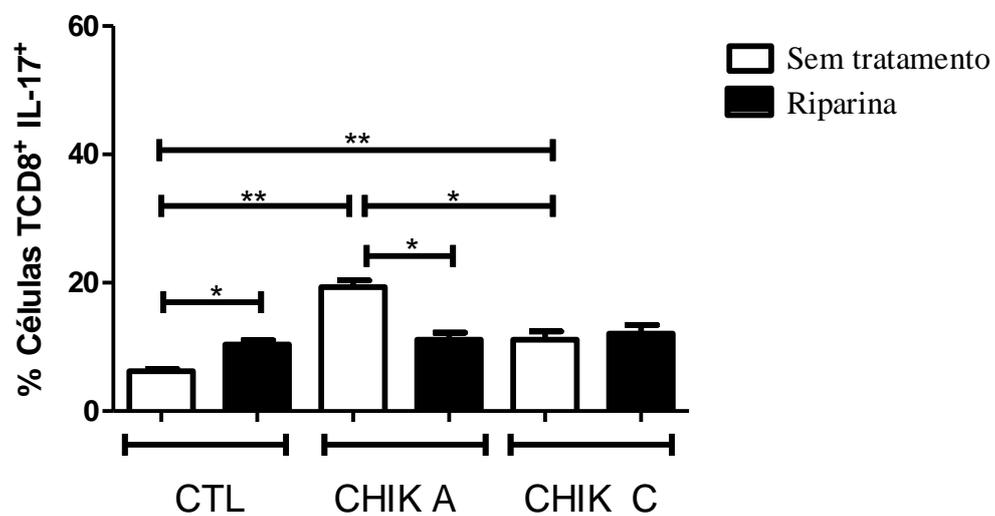


Fonte: Própria. Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> expressando Granzima (A), Perforina (B) e Granzima/Perforina (C) em grupos controle (CTL), agudo (CHIK A) e crônico (CHIK C) tratados ou não com riparina III. Barras indicam o desvio padrão médio.

#### 5.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-17 EM CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> EM PACIENTES AGUDOS, CRÔNICOS E CONTROLES EM PACIENTES TRATADOS OU NÃO COM RIPARINA III

Foi avaliada a capacidade da célula T CD8<sup>+</sup> de expressar a citocina IL-17. Entre os grupos não tratados por riparina III, os grupos agudo e crônico apresentaram um aumento da expressão de IL-17 em relação à população controle, onde a produção dessa citocina por CHIK A foi expressivamente maior que de CHIK C. Nos grupos tratados por riparina III, foi possível observar um aumento da expressão de IL-17 quando comparados o grupo controle não tratado e tratado. Em contrapartida, foi possível observar uma diminuição significativa da produção de IL-17 entre o grupo agudo tratado e não tratado com a molécula (Figura 7).

Figura 7 - Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> expressando IL-17 em grupos controle, agudo e crônico tratados ou não com riparina III



Fonte: Própria. Porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> expressando IL-17 em grupos controle, CHIKV agudo (CHIK A) e CHIKV crônico (CHIK C) tratados ou não com riparina III.

# **DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

A infecção pelo vírus da Chikungunya instaura um quadro agudo de sintomatologia intensa, como febre alta e artralgia, e que pode se desenvolver em um quadro crônico e incapacitante de artrite. Os pacientes agudos e crônicos avaliados neste estudo apresentaram sintomatologia similar às observadas na literatura (THIBERVILLE et al., 2013; MONTERO, 2015). Muitos estudos associam o sexo feminino como fator de risco para desenvolvimento da cronicidade da infecção (MCCARTHY et al., 2018). Neste estudo, mostra uma tendência com maior prevalência em mulheres com instauração da doença crônica.

As células T CD8<sup>+</sup> efetoras são importantes ferramentas do sistema imune na defesa contra infecções virais devido à sua capacidade de induzir apoptose em células infectadas por vírus, além da expressão de citocinas e outras respostas que auxiliam o *clearance* da infecção viral (BETTS et al., 2003). Estes linfócitos estão intrinsecamente relacionados com a infecção por Chikungunya e, apesar de não ser completamente elucidada sua função na doença, estas células são a primeira resposta da imunidade adaptativa nas fases iniciais da infecção (WAUQUIER et al., 2011), e contribuem para diferenciação de linfócitos T de memória (PETITDEMANGE et al., 2015). Além disso, a resposta destas células na fase aguda está relacionada à uma menor chance da instauração de um quadro crônico em infecções por outros alfavírus (POWERS; LOGUE, 2007). Durante a fase crônica, foi sugerido que apenas o linfócito T CD4<sup>+</sup> seria responsável pela inflamação em tecidos sinoviais, mesmo o T CD8<sup>+</sup> estando presente também nesses tecidos, apesar de que em menor quantidade (TEO et al., 2012; HOARAU et al., 2010). Ainda, Hoarau e colaboradores (2013) observaram que linfócitos T CD8<sup>+</sup> periféricos são os principais produtores de IFN- $\gamma$  durante a fase crônica e levantaram a hipótese da relação entre a ausência de T CD8<sup>+</sup> em tecidos sinoviais e a persistência viral durante a fase crônica.

Outro resultado analisado por Hoarau e colaboradores (2013) indica que a cronicidade da infecção por Chikungunya está associada aos peptídeos antigênicos apresentados e que induziram atividade ao T CD8<sup>+</sup>, onde todos os pacientes que se recuperaram durante a fase aguda apresentavam linfócitos ativados por peptídeos relacionados à estrutura viral E2, enquanto cerca de 59% dos pacientes que apresentavam a doença crônica apresentavam reatividade ao mesmo peptídeo, onde o restante do grupo analisado apresentava reatividade à estrutura nsP1, indicando que a

resposta do linfócito T CD8<sup>+</sup> pode apresentar modulação no desenvolvimento do quadro crônico.

Neste estudo não foi observada uma diferença estatística significativa entre os grupos tratados ou não com a riparina III. As prováveis razões de não se observar um aumento significativo de T CD8<sup>+</sup> na fase aguda em relação ao grupo controle como postulado na literatura são a linfopenia associada à doença, reduzindo o número de população à níveis controle, ou a data de coleta do sangue dos pacientes agudos, onde a mudança normalmente observada do perfil T CD8<sup>+</sup> para o perfil T CD4<sup>+</sup> já aconteceu, reduzindo significativamente a população analisada (WAUQUIER et al., 2011).

Apesar disso, foi observada uma mudança na população de células T CD8<sup>+</sup> expressando CD69, marcador expresso após estimulação desses linfócitos (LA FUENTE et al., 2012), onde os grupos agudo e crônico não tratados com riparina III apresentaram um aumento deste marcador em relação ao controle. De fato, esse resultado concorda com outros encontrados na literatura, onde é observada uma ativação maior dessas células tanto na fase aguda quanto na fase crônica (WAUQUIER et al., 2011; HOARAU et al., 2010; MINER et al., 2015). A expressão de CD69 cai drasticamente na fase crônica quando comparada à fase aguda, apesar de manter-se acima dos níveis controle, isso indica uma participação do T CD8<sup>+</sup> na fase crônica, que pode estar associada a produção de IFN- $\gamma$  observada na literatura (HOARAU et al., 2013).

O linfócito T CD8<sup>+</sup> citotóxico apresenta sua capacidade citolítica de duas maneiras: através da ligação entre os receptores do linfócito T CD8<sup>+</sup> e a célula infectada CD95/CD95L ou através da secreção de proteínas citolíticas como granzima e perforina, neste trabalho foi analisada a última atividade citada (TRAPANI; SMYTH, 2002). A liberação dessas proteínas pelo linfócito T CD8<sup>+</sup> efetor está intrinsecamente ligado com a expressão do marcador CD107, observado quando ocorre a degranulação da perforina e da granzima no micro-ambiente entre a célula infectada e o linfócito (BETTS et al., 2003). Neste estudo, foi avaliado a expressão do marcador de degranulação CD107 e das enzimas citolíticas perforina e granzima, sendo observado um aumento da expressão de todos pelos pacientes agudos não tratados com a riparina em relação ao grupo controle, sugerindo uma atividade citolítica durante a fase aguda da doença pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>. O tratamento da riparina III não gerou nenhum dado significativo, apesar de haver uma redução considerável de granzima e perforina entre os pacientes agudo tratado com a molécula e o não tratado. A grande discrepância entre níveis desses

grânulos citotóxicos apresentados por pacientes aparenta ser o motivo de não haver uma diferença significativa, talvez um número mais elevado de amostras de pacientes agudos e crônicos possa garantir resultados mais conclusivos do que os obtidos neste trabalho.

Apesar de característico do linfócito Th17, já é documentado que uma gama de células imune são capazes de produzir IL-17, dentre elas se encontra o linfócito T CD8<sup>+</sup> (SRENATHAN et al., 2016). Essa citocina pró-inflamatória já foi documentada em uma sorte de doenças inflamatórias, incluindo a fase aguda da Chikungunya (WAUQUIER et al., 2011; KIM; JORDAN, 2012). Ainda, a citocina IL-17 foi detectada em várias patologias autoimunes artritogênicas, como a artrite psoriática e artrite reumatoide, sendo interessante avaliar a atuação da mesma em casos crônicos da infecção por Chikungunya (OMIDIAN et al., 2018). Nos grupos não tratados, foi possível identificar um aumento significativo na expressão de IL-17 por pacientes agudos e crônicos, sendo a expressão dos pacientes agudos significativamente maior que a crônica, indicando que essa citocina possa estar relacionada aos sintomas de inflamação nas articulações apresentados na fase aguda e também relacionado à instauração da cronicidade dessas inflamações artritogênicas. De fato, o aumento de IL-17 na fase aguda corrobora com os estudos presentes na literatura (WAUQUIER et al., 2011). Com relação ao grupo tratado com a riparina III, foi observada uma redução significativa entre o grupo agudo tratado e o não tratado, indicando um efeito anti-inflamatório da molécula que pode influenciar diretamente nos quadros de artrite e até modular a cronicidade destes quadros. Também foi observado um aumento na produção de IL-17 com os grupos controle tratados por riparina III em relação aos não tratados, indicando uma possível atividade pró-inflamatória em pacientes saudáveis.

Em anos recentes, a síntese de acetilcolina (ACh) e sua função extraneuronal vem sido bastante estudada (KAWASHIMA, 2000; KAWASHIMA; FUJII, 2004), este neurotransmissor pode ser produzido por células do sistema imune como células T, células dendríticas e macrófagos, esta capacidade sintética foi comprovada pela presença da colina aciltransferase (ChAT), enzima responsável pela produção de ACh nessas células (FUJII et al., 1995; KAWASHIMA; FUJII, 2004; WESSLER; KIRKPATRICK, 2009), essas descobertas sugerem que os linfócitos T, principalmente o CD4<sup>+</sup>, são os principais responsáveis pela concentração de acetilcolina no sangue e em tecidos linfoides (FUJIMOTO et al., 2001; RINNER; KAWASHIMA; SCHAUENSTEIN, 1998). Ainda, grande parte dos tipos celulares imunes, incluindo células T, apresentam todos os subtipos de receptores muscarínicos (M<sub>1</sub>- M<sub>5</sub>) e alguns

receptores nicotínicos, indicando uma possível atividade imunoreguladora da ACh por ativação autócrina e/ou parácrina destes receptores (SATO et al., 1999; WESSLER; KIRKPATRICK, 2009).

Os receptores nicotínicos apresentam uma grande variedade de subtipos, e ainda é necessária a elucidação de todos os receptores presentes em células imunes, apesar disso, já foram detectados receptores  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  e  $\alpha 10$  em células T e B (KAWASHIMA et al., 2015). No caso dos receptores muscarínicos, os subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  estão acoplados a proteína  $G_{q/11}$ , mediando a atividade da fosfolipase C- $\beta 1$  e subsequente aumento na concentração de  $Ca^{2+}$ , enquanto os subtipos  $M_2$  e  $M_4$  estão acoplados a  $G_{i/o}$ , que quando estimulado inibe adenilil ciclase e uma consequente diminuição de AMPc (KAWASHIMA et al., 2012). Similar aos subtipos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$ , a ativação de linfócitos T do complexo TCR/CD3 através da apresentação de antígenos nos MHCs presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs) também estão associadas ao aumento da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , que ocorre através da fosforilação da proteína fosfolipase C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) que se encontra acoplada à este complexo (LEWIS, 2001), também foi demonstrado que a via de ativação do complexo TCR/CD3 aumenta a expressão tanto de colina acetiltransferase como da acetilcolinesterase, esta última responsável pela depleção de acetilcolina no sistema (FUJII et al., 2017). Estes fatos sugerem que a ativação destes receptores muscarínicos podem provocar uma resposta imunoreguladora positiva nessas células.

De fato, a atividade imunoregulatória da ACh foi demonstrada por Zimring e colaboradores (2005), onde a ausência de acetilcolina inibia a diferenciação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> *naïve* em linfócitos citolíticos, e os murinos que não apresentavam o receptor  $M_1$  possuíam deficiência nessa diferenciação. Outro estudo realizado por Mashimo e colaboradores (2016) demonstrou que a ativação de receptores  $M_3$  e/ou  $M_5$  estimulavam o influxo de  $Ca^{2+}$  extracelular através da ativação de canais de cálcio por IP<sub>3</sub>, reduzindo a expressão de IL-2. Ainda, foi documentado que murinos deficientes em  $M_1$  e  $M_5$  apresentaram expressão reduzida de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-6, sugerindo que um ou ambos subtipos de receptores contribuem para a regulação de citocinas pró-inflamatórias (FUJII et al., 2017).

Uma possível explicação para o aumento na produção de IL-17 e na expressão de CD69 pelo grupo controle é a baixa expressão do canal nicotínico  $\alpha 7$ , que acredita ser um importante regulador de atividade anti-inflamatória, responsável por uma redução da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF em macrófagos (WANG et al., 2002;

ROSAS-BALLINA et al., 2009; NIZRI et al., 2006). As citocinas reduzidas pela via de acetilcolina no receptor  $\alpha 7$  observada nos estudos acima são similares com as observadas no tratamento de riparina A na inflamação aguda por Silva e colaboradores (2005), esse trabalho sugere que a molécula tem atividade inibidora na produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em macrófagos.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> também demonstraram expressar o receptor nicotínico  $\alpha 7$  e foi sugerido que esse receptor possua atividade anti-inflamatória (KAWASHIMA et al., 2015). Baseado nisso, é possível levantar uma nova hipótese para a atividade da riparina: um efeito agonista no receptor nicotínico  $\alpha 7$  das células imunes ou modulador positivo da síntese de acetilcolina. A correlação desse fato com a expressão mais elevada de CD69 e IL-17 pelo grupo controle ao mesmo tempo que existe uma redução da expressão desses marcadores por pacientes agudos pode ser explicada por Nizri e colaboradores (2006), onde foi demonstrado que células T ativadas expressam cerca de oito vezes mais o receptor  $\alpha 7$ . Fato similar foi observado por Qian e colaboradores (2011), onde células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de murinos expressaram receptores  $\alpha 7$  apenas após estimulação antigênica, e a modulação anti-inflamatória promovida por esse receptor nicotínico diminuiu significativamente a expressão de IL-17. Dessa forma, a atividade anti-inflamatória promovida pela acetilcolina no receptor  $\alpha 7$  é potencializada em casos de inflamação aguda, enquanto em casos controle é possível que exista um maior contato da acetilcolina com receptores muscarínicos pró-inflamatórios, promovendo ativação desses linfócitos e secreção de citocinas.

De fato, a diferenciação para linfócitos citotóxicos já foi correlacionada com o receptor muscarínico M<sub>1</sub>, onde murinos com deficiência nesse receptor apresentavam dificuldades de ativação desses linfócitos (ZIMRING et al., 2005). Acoplado a esses resultados, já foi observado um efeito modulatório positivo na síntese de acetilcolina e de acetilcolinesterase (AChE) quando é apresentado um antígeno a um linfócito naíve (FUJII et al., 2017), e a inibição da AChE e consequente maior disponibilidade de acetilcolina extracelular pode estar relacionada à um efeito anti-inflamatório (NIZRI et al., 2006; BOROVIKOVA et al., 2000), divergindo ainda mais da ideia de que o efeito anti-inflamatório da riparina possa ser realizado através da atividade antagonista de receptores muscarínicos, como inicialmente suspeitado.

Nos grupos agudos não tratados, foi possível observar um aumento significativo na expressão de CD69, IL-17, CD107, granzima e perforina, indicando um quadro inflamatório bastante importante, marcado pela grande ativação de linfócitos T

CD8<sup>+</sup> e sua atividade citolítica para destruição de células infectadas com o vírus e também um expressivo aumento na produção da citocina pró-inflamatória IL-17, concordando com resultados encontrados na literatura que indica um papel importante do T CD8<sup>+</sup> na infecção por Chikungunya (WAUQUIER et al., 2011). Em pacientes crônicos, foi observado um aumento na expressão de CD69 e IL-17 em relação aos indivíduos saudáveis, sugerindo participação desse linfócito na patologia da fase crônica da doença. De fato, a citocina IL-17 já foi identificada em outros casos de artrites crônicas e outras doenças autoimunes, aumentando a possibilidade da participação desse linfócito na instauração da artrite (OMIDIAN et al., 2018).

Apesar de não contemplado por esse estudo, uma das atividades relacionadas às riparinas são a inibição da migração de leucócitos dessas moléculas em sítios de inflamação e a expressão reduzida de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (CARVALHO et al., 2013; SILVA et al., 2015). Essa modulação migratória de leucócitos pode ser interessante se observada na infecção por Chikungunya, uma vez que a persistência viral em tecidos sinoviais e artralgia associada pode estar relacionada com a migração de macrófagos infectados para estes sítios (PETITDEMANGE et al., 2015). Outro fator interessante é a inibição de IL-1 $\beta$ , uma citocina que já foi relacionada na literatura com casos graves de Chikungunya (NG et al., 2009), sendo válido avaliar a expressão desse marcador durante uma infecção por CHIKV.

O estudo das atividades colinérgicas em células imunes ainda está pouco elucidado e, devido à sua grande complexibilidade e efeitos imunomodulatórios antagônicos, como por exemplo efeitos pró-inflamatórios em alguns receptores muscarínicos enquanto imunológico do indivíduo (FUJII et al., 2017). Nesse estudo, foi possível observar a dualidade da ação da riparina III, onde em indivíduos saudáveis aumentou a expressão de CD69 e IL-17 ao mesmo tempo que em pacientes agudos foi verificada uma diminuição significativa da expressão de IL-17 e uma tendência em diminuição da expressão de CD69, CD107, granzima e perforina. Em pacientes crônicos não foi observado nenhuma atividade significativa da riparina III, visto que o vírus só se mantém presente em zonas imunoprivilegiadas com pouca ou nenhuma infiltração desse subtipo de linfócito nestes tecidos (HOARAU et al., 2010), também pode se supor que existe uma mudança no perfil de expressão de citocinas, como já observado na literatura (MCCARTHY et al., 2018). Porém, é necessária a elucidação sobre a real atividade modulatória da riparina III na via colinérgica de células imunes para que se possa tirar vantagem destas vias para a produção de fármacos ou outras atividades biotecnológicas.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho indicam uma forte ação anti-viral promovida por linfócitos T CD8<sup>+</sup> através da expressão de citocinas pró-inflamatórias e produção de grânulos citolíticos para destruição de células infectadas, sugerindo um papel de extrema importância no controle da viremia na fase aguda da doença. Também foi observada a presença de linfócitos ativados e uma expressão aumentada de IL-17 em fase crônica, citocina bem documentada em doenças autoimunes como artrite reumatoide, isso sugere uma participação dessas células na patologia associada ao quadro crônico. Em pacientes tratados com riparina III, os resultados sugerem uma dualidade na modulação onde em indivíduos saudáveis apresentaram um aumento na expressão de CD69 e IL-17 indicando uma atividade pró-inflamatória, ao mesmo tempo que em pacientes agudos foi verificado uma diminuição significativa do IL-17 e uma tendência de diminuição do CD69 e de outros marcadores analisados indicando uma atividade anti-inflamatória, essas observações sugerem que sua atividade dependa da característica imunológica do indivíduo e que também seja regulada pela expressão de receptores muscarínicos e nicotínicos durante uma patologia. Dessa forma, esse estudo demonstra o papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> na fase aguda da infecção por chikungunya, sugerindo uma possível participação dessas células na patologia crônica. Ainda, elucidada um pouco sobre a atividade imunomodulatória da riparina III, sugerindo novas possíveis vias de ação desta molécula e contribuindo para o conhecimento acerca da atividade de acetilcolina em linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

Como perspectivas do trabalho, seria interessante a avaliação da imunomodulação da atividade da riparina III em macrófagos de pacientes infectados com a CHIKF, visto que sua migração para tecidos sinoviais são os principais suspeitos da patologia da artralgia observada na infecção, e que algumas riparinas já descrevem atividades de redução de migração de leucócitos, sugerindo que talvez essa molécula possa modular esse deslocamento e até impedir o desenvolvimento de um quadro crônico.

## **REFERÊNCIAS**

## 8 REFERÊNCIAS

- BANDEIRA, Antonio Carlos et al. Prolonged shedding of Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **Idcases**, v. 6, p.100-103, 2016a.
- BANDEIRA, Antonio Carlos et al. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: First report in Brazil. **Idcases**, [s.l.], v. 5, p.57-59, 2016b.
- BETTS, Michael R. et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. **Journal Of Immunological Methods**, v. 281, n. 1-2, p.65-78, 2003.
- BORGHERINI, G. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 11, p.1401-1407, 2007.
- BOROVIKOVA, Lyudmila V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p.458-462, 2000.
- BURT, Felicity J et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p.107-117, 2017.
- CAMPOS, Gúbio et al. Congenital Chikungunya Virus Infection after an Outbreak in Salvador, Bahia, Brazil. **American Journal Of Perinatology Reports**, v. 06, n. 03, p.299-300, 2016.
- CARVALHO, Alyne Mara Rodrigues de et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-biological Interactions**, v. 205, n. 3, p.165-172, 2013.
- CARVALHO, Alyne Mara Rodrigues de et al. Antinociceptive activity of Riparin II from *Aniba riparia*: Further elucidation of the possible mechanisms. **Chemico-biological Interactions**, v. 287, p.49-56, 2018.
- CARVALHO, Fabiana Rabe et al. Simultaneous circulation of arboviruses and other congenital infections in pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 192, p.49-54, 2019.
- CASTELO BRANCO, U. J. V.; Thomas, G.; Araújo, C.C.; Barbosa- Filho, J. M. Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides constituents of *Aniba riparia* (Ness) Mez (Lauraceae), **Acta Farm. Bonaer.** v. 19, p. 197–202, 2000.
- CDC. Chikungunya Virus – Geographic Distribution, 2019a. Disponível em <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>. Acessado em 02/04/19.
- CDC. Chikungunya Virus - Clinical Evaluation & Disease. 2019b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/hc/clinicalevaluation.html>> . Acessado em 02/04/19.
- CHOMPOOSRI, Jakkrawarn et al. Vertical transmission of Indian Ocean Lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, 2016.

- CIBRIÁN, Danay; SÁNCHEZ-MADRID, Francisco. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European Journal Of Immunology**, v. 47, n. 6, p.946-953, 2017.
- EDINGTON, Fernando; VARJÃO, Douglas; MELO, Paulo. Incidence of articular pain and arthritis after chikungunya fever in the Americas: A systematic review of the literature and meta-analysis. **Joint Bone Spine**, v. 85, n. 6, p.669-678, 2018.
- FOX, Julie M.; DIAMOND, Michael S.. Immune-Mediated Protection and Pathogenesis of Chikungunya Virus. **The Journal Of Immunology**, v. 197, n. 11, p.4210-4218, 2016.
- FUJIMOTO, K. et al. Decreased acetylcholine content and choline acetyltransferase mRNA expression in circulating mononuclear leukocytes and lymphoid organs of the spontaneously hypertensive rat. **Life Sciences**, v. 69, n. 14, p.1629-1638, 2001.
- FUJII, Takeshi et al. Expression of Choline Acetyltransferase mRNA and Protein in T-Lymphocytes. **Proceedings Of The Japan Academy. Ser. B: Physical and Biological Sciences**, v. 71, n. 7, p.231-235, 1995.
- FUJII, Takeshi et al. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. **Frontiers In Immunology**, v. 8, p.1-2, 2017.
- GOPAKUMAR, Hariharan; RAMACHANDRAN, Sivji. Congenital chikungunya. **Journal Of Clinical Neonatology**, v. 1, n. 3, p.155-156, 2012.
- GRANDADAM, Marc et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p.910-913, 2011.
- HIGUERA, Adriana; RAMÍREZ, Juan David. Molecular epidemiology of dengue, yellow fever, Zika and Chikungunya arboviruses: An update. **Acta Tropica**, v. 190, p.99-111, 2019.
- HOARAU, J. J. et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal Of Immunology**, v. 184, n. 10, p.5914-5927, 2010.
- HOARAU, Jean-jacques et al. Identical Strength of the T Cell Responses against E2, nsP1 and Capsid CHIKV Proteins in Recovered and Chronic Patients after the Epidemics of 2005-2006 in La Reunion Island. **Plos One**, v. 8, n. 12, 2013.
- JENKINS, Misty R; GRIFFITHS, Gillian M. The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic T cells. **Current Opinion In Immunology**, v. 22, n. 3, p.308-313, 2010.
- JOHNSON, Barbara W.; RUSSELL, Brandy J.; GOODMAN, Christin H.. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **Journal Of Infectious Diseases**, v. 214, n. 5, p.471-474, 2016.
- KAWASHIMA, K. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 1, p.29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. **Frontiers in Bioscience**. v. 9, p. 2063-2085, 2004.

KAWASHIMA, Koichiro et al. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. **Life Sciences**, v. 91, n. 21-22, p.1027-1032, 2012.

KAWASHIMA, Koichiro et al. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on  $\alpha 7$  nAChRs. **International Immunopharmacology**, v. 29, n. 1, p.127-134, 2015.

LAFUENTE, Hortensia de; CIBRIÁN, Danay; SÁNCHEZ-MADRID, Francisco. Immunoregulatory molecules are master regulators of inflammation during the immune response. **Febs Letters**, v. 586, n. 18, p.2897-2905, 2012.

LANCIOTTI, Robert S. et al. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 764, 2007.

LEWIS, Richard S. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. **Annual Review Of Immunology**, v. 19, n. 1, p.497-521, 2001.

LEWIS, R.s.. Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 5, p.925-929, 2003.

LIM, Elisa et al. Mosquitoes as Suitable Vectors for Alphaviruses. **Viruses**, v. 10, n. 2, p.84-101, 2018.

LOWIN, Bente et al. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. **Nature**, v. 370, n. 6491, p.650-652, 1994.

LUBBERTS, Erik et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 2, p.650-659, 2004.

LWANDE, O. W. et al. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, n. 1, 2015.

MANIMUNDA, Sathya Prakash et al. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 104, n. 6, p.392-399, 2010.

MARTINEZ, Jose Dario; LAGARZA, Jesus Alberto Cardenas-de; CUELLAR-BARBOZA, Adrian. Going Viral 2019. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 1, p.95-105, 2019.

MASHIMO, Masato et al. CRAC channels are required for  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and c-fos gene expression after muscarinic acetylcholine receptor activation in leukemic T cells. **Life Sciences**, v. 161, p.45-50, 2016.

MAVALE, Mangala et al. Venereal Transmission of Chikungunya Virus by *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 83, n. 6, p.1242-1244, 2010.

MCCARTHY, Mary K.; DAVENPORT, Bennett J. J.; MORRISON, Thomas E.. Chronic Chikungunya Virus Disease. **Current Topics In Microbiology And Immunology**, 2018.

MINER, Jonathan J. et al. Brief Report: Chikungunya Viral Arthritis in the United States. **Arthritis & Rheumatology**, v. 67, n. 5, p.1214-1220, 2015.

MONTERO, Antonio. Chikungunya fever – A new global threat. **Medicina Clínica (english Edition)**, v. 145, n. 3, p.118-123, 2015.

NG, Lisa F. P. et al. IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES as Biomarkers of Chikungunya Severity. **Plos One**, v. 4, n. 1, p.4261-4269, 2009.

NUNES, Geandra Batista Lima et al. PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae). **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 4, p.447-458, 2013.

OLIVEIRA, I. C. M. O. Efeitos centrais da riparina I de aniba riparia (NEES) MEZ (LAURACEAE) em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos. 2012. 121 f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – UFC**

OMAN, Trent J; DONK, Wilfred A van Der. Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. **Nature Chemical Biology**, v. 6, n. 1, p.9-18, 2010.

OMIDIAN, Zahra et al. IL-17 and limits of success. **Cellular Immunology**, 2018.

PETITDEMANGE, Caroline; WAUQUIER, Nadia; VIEILLARD, Vincent. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, v. 135, n. 4, p.846-855, 2015.

PETITDEMANGE, Caroline et al. Unconventional Repertoire Profile Is Imprinted during Acute Chikungunya Infection for Natural Killer Cells Polarization toward Cytotoxicity. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 9, p.1-2, 2011.

PETRELLI, Alessandra; VAN WIJK, Femke. CD8+ T cells in human autoimmune arthritis: the unusual suspects. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 7, p.421-428, 2016.

POWERS, A. M.; LOGUE, C. H.. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal Of General Virology**, v. 88, n. 9, p.2363-2377, 2007.

QIAN, J et al. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. **Genes & Immunity**, v. 12, n. 3, p.222-230, 2011.

REZZA, G et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **The Lancet**, v. 370, n. 9602, p.1840-1846, 2007.

RINNER, Ingo; KAWASHIMA, Koichiro; SCHAUENSTEIN, Konrad. Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. **Journal Of Neuroimmunology**, v. 81, n. 1-2, p.31-37, 1998.

ROSAS-BALLINA, Mauricio et al. The Selective  $\alpha 7$  Agonist GTS-21 Attenuates Cytokine Production in Human Whole Blood and Human Monocytes Activated by Ligands for TLR2, TLR3, TLR4, TLR9, and RAGE. **Molecular Medicine**, v. 15, n. 7-8, p.195-202, 2009.

SANTIAGO, Renata Fortes et al. Riparin B, a Synthetic Compound Analogue of Riparin, Inhibits the Systemic Inflammatory Response and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, v. 38, n. 6, p.2203-2215, 2015.

SATO, Kazuo Z. et al. Diversity of mRNA expression for muscarinic acetylcholine receptor subtypes and neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in human mononuclear leukocytes and leukemic cell lines. **Neuroscience Letters**, v. 266, n. 1, p.17-20, 1999.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Boletim epidemiológico**, v.50, n. 5, 2019

SILVA, Renan O. et al. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. **Chemico-biological Interactions**, v. 229, p.55-63, 2015.

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S.. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p.737-749, 2017.

SILVA, José V.j. et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta Tropica**, v. 188, p.213-224, 2018a.

SILVA, Nayara Messias da et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública\*. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, 2018b.

SMITH, Scott a. et al. Isolation and Characterization of Broad and Ultrapotent Human Monoclonal Antibodies with Therapeutic Activity against Chikungunya Virus. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 1, p.86-95, 2015.

SOLIGNAT, Maxime et al. Replication cycle of Chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n.2, p. 183-197, 2009.

SOURISSEAU, Marion et al. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. **Plos Pathogens**, v. 3, n. 6, 2007.

SOUSA, F.c.f et al. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, v. 78, n. 1, p.27-33, 2004.

- SRENATHAN, Ushani; STEEL, Kathryn; TAAMS, Leonie S.. IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. **Immunology Letters**, v. 178, p.20-26, 2016.
- TANABE, Ithallo S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, v. 8, 2018.
- TEO, T.-h. et al. A Pathogenic Role for CD4+ T Cells during Chikungunya Virus Infection in Mice. **The Journal Of Immunology**, v. 190, n. 1, p.259-269, 2012.
- THIBERVILLE, Simon-djamel et al. Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**, v. 99, n. 3, p.345-370, 2013.
- THOMAS, George et al. Studies on the Mechanism of Spasmolytic Activity of (O-Methyl)-N-(2,6-dihydroxybenzoyl)tyramine, a Constituent of *Aniba riparia* (Nees) Mez. (Lauraceae), in Rat Uterus, Rabbit Aorta and Guinea-pig Alveolar Leucocytes. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, v. 46, n. 2, p.103-107, 1994.
- TRAMBAS, Christina M.; GRIFFITHS, Gillian M.. Delivering the kiss of death. **Nature Immunology**, v. 4, n. 5, p.399-403, 2003.
- TRAPANI, Joseph A.; SMYTH, Mark J.. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p.735-747, 2002.
- VENUGOPALAN, Anuradha; GHORPADE, Ravi P.; CHOPRA, Arvind. Cytokines in Acute Chikungunya. **Plos One**, v. 9, n. 10, 2014.
- VU, David M.; JUNGKIND, Donald; LABEAUD, Angelle Desiree. Chikungunya Virus. **Clinics In Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p.371-382, 2017.
- WANG, Hong et al. Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p.384-388, 2002.
- WAUQUIER, Nadia et al. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. **The Journal Of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p.115-123, 2010.
- WEAVER, Scott C et al. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. **Expert Review Of Vaccines**, v. 11, n. 9, p.1087-1101, 2012.
- WESSLER, I; KIRKPATRICK, C J. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British Journal Of Pharmacology**, v. 154, n. 8, p.1558-1571, 2009.
- ZIMRING, James C. et al. Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. **Journal Of Neuroimmunology**, v. 164, n. 1-2, p.66-75, 2005.

# **APÊNDICE**

## 9 APÊNDICES

### Apêndice I – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue

**Pesquisador:** Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

**Versão:** 4

**CAAE:** 59833416.6.0000.5183

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

**Patrocinador Principal:** National Institutes of Health (NIH)

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.117.372

##### Apresentação do Projeto:

###### INTRODUÇÃO

Os vírus que causam a Dengue, a Zika e a Chikungunya pertencem ao grupo dos arbovírus, vírus transmitidos por artrópodes, da ordem díptera. São vírus que permanecem na natureza em ciclos complexos envolvendo um ou mais vertebrados-reservatórios, que podem ser humanos ou animais domésticos, e insetos vetores que infectam-se após o repasto sanguíneo do vertebrado virêmico, transmitindo o vírus a outros vertebrados (após período de incubação extrínseca necessária). Dentro desse grupo temos vírus classificados em diferentes grupos (Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae). Os vírus da Dengue (DENV) e da Zika (ZIKV) estão incluídos na família Flaviviridae que é composta por três gêneros: O gênero Flavivirus (no qual estão agrupados os quatro sorotipos dos Vírus Dengue (DENV 1-4), o Zika Vírus, Vírus da Febre Amarela, Vírus do Oeste do Nilo e da Encefalite Japonesa), o gênero Pestivirus no qual inclui-se os vírus da diarreia bovina e da peste suína clássica, e o gênero Hepacivirus, no qual

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
Bairro: Ásia Norte Cid.: 70.750-521  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3315-5878 e-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.117.372

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepository Letter.pdf	17/01/2017 19:31:04	Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao de compromisso TatjanaKeesen.pdf	17/01/2017 19:30:49	Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta TatjanaKeesen.pdf	17/01/2017 19:29:50	Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Letter TatjanaKeesen.pdf	17/01/2017 19:29:35	Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Colaboracion letter.pdf	17/01/2017 19:29:03	Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta Colaboracao.pdf	17/01/2017 19:28:49	Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente	Aceito
Outros	CARTA RESPOSTA AO CEP HULW Tatjana_Keesen.pdf	03/12/2016 16:53:29	Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anuencia arboviroses.doc	30/08/2016 16:20:38	Tatjana Keesen de Souza Lima	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

BRASILIA, 14 de Junho de 2017

Assinado por:  
**Jorge Alves de Almeida Venancio**  
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
Bairro: Asa Norte Cid.: 70.750-521  
UF: DF Município: BRASILIA  
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: consp@saude.gov.br

## Apêndice II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto: Avaliação da resposta imune humana inata e adaptativa nas arboviroses: Correlação entre mecanismos celulares e prognóstico na infecção pelos vírus Zika, Chikungunya e dengue**

**Pesquisadora:** Tatjana Keesen de Souza Lima

**I. Esclarecimentos**

Estamos convidando você para participar como voluntário de uma pesquisa sobre a Zika, Chikungunya e Dengue, que são doenças causadas por um microorganismo (micróbio) transmitido para o ser humano através da picada do mosquito, que se chama *Aedes aegypti*. Nosso objetivo com essa pesquisa é avaliar porque existem pessoas que ficam mais doentes que as outras quando estão com essas doenças e comparar a diferença entre elas; por exemplo, algumas podem ter hemorragia (sangramento intenso) no caso da dengue, dores articulares mais fortes na Chikungunya e manchas avermelhadas parecida com alergia no caso da zika. Outras pessoas apresentam a doença apenas com sintomas leves como febre, dores musculares, dor de cabeça, entre outros, que podem confundir o diagnóstico, por serem muito parecidas. Para isto, vamos realizar um estudo do seu sistema de defesa (imunológico), no qual serão analisadas as células que são capazes de defender o organismo contra o microorganismo que causa a Zika, a Chikungunya e a dengue. Iremos observar um grupo determinado de células que regulam o sistema de defesa humano e se a presença dessas células está relacionada a capacidade da pessoa desenvolver formas mais graves da doença.

Caso aceite participar do estudo você fará uma consulta médica e deverá permitir a realização da coleta do seu sangue. Além disto, você deverá autorizar o nosso acesso a sua ficha médica, para que possamos coletar informações sobre o estado atual da sua doença e os resultados dos exames realizados. Você também deverá responder um questionário a respeito da sua saúde. Quando você estiver respondendo esse questionário se alguma pergunta lhe causar constrangimento você poderá deixar de respondê-la.

Vamos a seguir, explicar a você para que utilizaremos o material coletado e os riscos e desconforto que poderão existir.

Coleta de sangue - Serão coletados, por uma pessoa devidamente treinada, aproximadamente 10 mL do seu sangue; utilizando material estéril e descartável. Os riscos e desconfortos que você correrá nessa coleta são mínimos e poderão ser desmaio, sangramentos, manchas arroxeadas ou infecção no local da coleta. Entretanto iremos minimizar estes riscos com cuidados na realização deste procedimento, que são a limpeza no local da

coleta através da utilização de álcool e pressionando a região do braço onde foi feita a coleta com algodão por alguns minutos, após a retirada da agulha. Com o sangue coletado iremos realizar um exame das células do seu sangue (hemograma), para determinar se você tem anemia. Destas células do sangue iremos realizar o estudo determinando características específicas importantes da doença, para estudar seu sistema de defesa (sistema imunológico), como também faremos uma análise para confirmar se você tem Zika, Chikungunya ou dengue.

Com a sua autorização, uma parte do material coletado será enviada para outro país (Inglaterra), onde os pesquisadores de lá farão estudos de substâncias no sangue que podem influenciar na resposta do seu sistema de defesa (imunológico). Todos os procedimentos estarão de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS 441/11, Art. 1º, itens 2.II e 6; Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8º).

O material biológico utilizado neste trabalho (sangue periférico) será utilizado somente para pesquisa e em seguida devidamente descartado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa é que você será informado do resultado do teste para as doenças estudadas (Zika, Chikungunya e Dengue), que iremos realizar com a amostra do sangue coletado.

Você também irá contribuir com a busca pela melhoria dos estudos na pesquisa dessas doenças com informações que poderão beneficiar o tratamento da doença e/ou da cura.

Garantimos que todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Caso você tenha interesse nos resultados da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Apesar de existir o risco de vazamento de dados presentes nos prontuários dos pacientes para fora da equipe de pesquisa, os dados dos prontuários e questionários aplicados serão guardados em local seguro, conhecido apenas pela equipe brasileira envolvida na pesquisa, como biorepositório, que é um tipo de armazenamento das suas amostras somente no tempo de execução deste projeto. Haverá também envio do seu sangue para um centro estrangeiro de pesquisa na Inglaterra, para estudos mais detalhados, no intuito de conhecer mais sobre essas doenças. Apesar do risco de uso de seu material para outra finalidade, já que seu sangue irá para outro centro de pesquisa, garantimos que seus dados e suas amostras serão utilizados apenas para este estudo e, em seguida, descartados.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, e se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste documento e toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a Drª Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, no Centro de Biotecnologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária- João Pessoa - PB - Brasil - CEP: 58051-900 Fone: (83) 3216-7371.

Dúvidas a respeito de questões éticas desta pesquisa poderão ser esclarecidas junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFPB do hospital universitário Lauro Wanderley (CEP/HULW)- Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 4º andar. Campus I-Cidade Universitária-Bairro: Castelo Branco- CEP:58059-900-João Pessoa-PB- FAX (083) 32167522- CNPJ:24098477/007-05- Telefone: (083) 32167964- E-mail:comitedeetica@hulw.ufpb.br.

**Consentimento Livre e Esclarecido**

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e benefícios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo **“Avaliação da resposta imune humana inata e adaptativa nas arboviroses: Correlação entre mecanismos celulares e prognóstico na infecção pelos vírus Zika, Chikungunya e dengue”** autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

**Participante da pesquisa:** (assinatura ou impressão datiloscópica):

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Voluntário:**

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Pesquisador**