

# UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



# CINTHIA NÓBREGA DE SOUSA DIAS

# CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CHIKUNGUNYA: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E INVESTIGAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DA RIPARINA III

# CINTHIA NÓBREGA DE SOUSA DIAS

# CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CHIKUNGUNYA: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E INVESTIGAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DA RIPARINA III

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacologia.

Orientadoras: Dra. Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente Dra. Josiane de Campos Cruz

#### Catalogação na publicação Seção de Catalogação e Classificação

D541c Dias, Cinthia Nobrega de Sousa.

CÉLULAS T CD8+ NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CHIKUNGUNYA: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E INVESTIGAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DA RIPARINA III / Cinthia Nobrega de Sousa Dias. - João Pessoa, 2019. 133 f. : il.

Orientação: Josiane de Campos Cruz. Coorientação: Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente. Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Ativação. 2. Célula. 3. Artralgia. 4. Inflamação. 5. Receptores Colinérgicos. I. Cruz, Josiane de Campos. II. Clemente, Tatjana Keesen de Souza Lima. III. Título.

UFPB/BC

# CINTHIA NÓBREGA DE SOUSA DIAS

# CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CHIKUNGUNYA: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E INVESTIGAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DA RIPARINA III

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como requisito final para obtenção do título de Doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacologia.

Data da aprovação 03 /11 /19

#### Banca Examinadora

Prof Dra. Tatjana Keesen de Souza Clemente (Co-Orientadora)	Prof <sup>a</sup> Dra Márcia Regina Piuvezam (Membro interno titular)
Prof <sup>a</sup> Dra. Josiane de Campos (ruz (Orientadora)	Prof <sup>a</sup> Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira (Membro externo titular)
Prof°. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos (Membro externo titular)	Prof <sup>a</sup> Dra. Hilzeth Luna Freire Pessôa (Membro externo suplente)
Prof <sup>a</sup> Dra. Marià do Socorro de França Falcão (Membro interno titular)	Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral (Membro interno suplente)

Ao meu amado esposo Jairo e aos meus filhos, Tito, Jade e Levi. **Dedico** 

#### **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pois tudo vem dEle e é para Ele, para sua própria glória. Obrigada Senhor pelo seu plano perfeito e pelas coisas maravilhosas que criou, toda ciência e vida declaram o seu poder e amor. Obrigada por ter me permitido chegar até o fim desse ciclo em minha vida.

A meu esposo Jairo que sempre esteve ao meu lado dividindo comigo todas as nossas lutas e alegrias, sem você, sem seu apoio e companheirismo eu não teria conseguido. Obrigada por ser esse esposo e pai, no sentido mais profundo e real que essas palavras representam. Obrigada pela nossa família e pela sua liderança e amor em nosso lar.

A minha mãe Suely, que sempre fez o possível pra me ajudar e me apoiar em todas as etapas da minha vida. Obrigada mamãe pela sua ajuda nesse processo do doutoramento, principalmente no nascimento dos meninos, sua ajuda foi fundamental para mim. A meu pai Pedro, que me deu o suporte necessário para que eu pudesse estudar e me formar como farmacêutica, de maneira que eu pudesse chegar até esse nível de formação.

A minha orientadora Tatjana Keesen (Tat), pelo exemplo de professora e pesquisadora. Ativa, curiosa e inteligente. Obrigada por ter confiado em mim, pelos momentos de encorajamento e pelos seus ensinamentos. O caminho foi longo, mas chegamos ao final, e isso foi possível devido ao seu apoio e compreensão nos momentos que passamos.

Aos meus colegas do LABIDIC, obrigada aos que estão hoje e aos que passaram por esse lugar tão especial. Foram momentos de muito trabalho, alegrias, risadas e companheirismo que levarei sempre comigo. Obrigada pela contribuição que cada um teve em minha vida durante esse caminho. Obrigada Vivi, pelos reagentes preparados com tanto cuidado e responsabilidade, obrigada Rô pelos momentos divididos nos experimentos de CD8<sup>+</sup>, obrigada Belzita pelas nossas idas a Bayeux, pelos momentos engraçados, pela sua paciência em me ensinar os protocolos de citometria, torço que cada vez mais você voe mais longe. As minhas amigas Bruninha e Fany por todos os momentos de aflição e alegrias compartilhados, pela amizade, companheirismo e força, do o laboratório até a vida. Obrigada Bruninha e Pedro pelo nosso companheirismo nos experimentos e por não se importarem com a hora e estarem prontos pra me ajudar sempre. Obrigada por tudo!

Gostaria de agradecer também a todos os pacientes voluntários que me ajudaram doando parte deles para realização deste estudo. Mesmo em momentos de desconforto e muitas vezes dores vocês aceitaram doar seu sangue para um melhor entendimento desta doença, ainda tão nova para nós. Sem vocês este trabalho não poderia ser realizado. Que esta pesquisa seja mais um tijolo na construção dos muros da ciência e contribua na solidificação do conhecimento sobre a Chikungunya e ajude na melhora da qualidade de vida de todos os doentes.

Obrigada a Aline pela sua contribuição na montagem dos experimentos com os receptores colinérgicos, por ter me passado as informações de maneira tão prestativa, pela doação das drogas, pelo seu apoio e explicações.

Obrigada Fátima, pela sua doçura e carinho, por ter facilitado tantas e tantas vezes nosso trabalho, que muitas vezes era tão cansativo. Obrigada pela sua confiança, conselhos, seu carinho e torcida. Você é uma pessoa muito especial para tanta gente, mas saiba que sempre serei grata a você por tanto.

Obrigada a todos os funcionários da UFPB que facilitaram meu trabalho, especialmente, Carol Mangueira, Wellington e Dona Evani.

Ao Prof. Dr. José Maria Barbosa, por ceder à Riparina III utilizada neste estudo.

Aos professores membros da banca examinadora Prof. Dr. Claudio, Prof.ª Dra. Naila, Prof.ª Dra. Socorro e Prof.ª Dra. Márcia Piuvezam, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho. Bem como, professor Dr. Lúcio e professora Dra. Márcia Rosa pelas contribuições na qualificação.

Ao programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em especial a todos os professores pela contribuição na minha formação. Assim como, meus colegas de turma e parceiros de seminários que participaram de alguma forma nesse ciclo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal da Paraíba, instituição que abriu as portas para que eu chegasse até aqui, onde conclui minha graduação, mestrado e agora doutorado.

#### **RESUMO**

DIAS, C. N.S. CÉLULAS T CD8<sup>+</sup> NA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA: AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E INVESTIGAÇÃO DO PAPEL IMUNOMODULADOR DA RIPARINA III. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

O vírus da chikungunya (CHIKV) é um alfavírus que causa doença febril acompanhada de dores articulares. A desregulação da resposta imune inflamatória pode estar relacionada ao desenvolvimento de cronicidade da doença que é acompanhada de sintomas articulares mais leves, porém recidivantes e persistentes podendo causar limitação de movimento. Nesse contexto, o entendimento do papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e os mecanismos de combate virais na infecção por CHIKV são importantes na compreensão da imunopatologia da doença. Estudos do papel acetilcolina influenciando repostas imunes têm sido conduzidos e nos últimos anos o sistema colinérgico tem sido associado a respostas imunes inflamatórias e anti-inflamatórias. Devido a gravidade dos sintomas inflamatórios na infecção CHIKV há uma urgência na busca de novas moléculas com atividades bioativas e/ou farmacológicas. Os produtos naturais constituem uma fonte de moléculas com diversas atividades biológicas. As alcamidas são descritas por diversas atividades biológicas, dentre elas a atividade anti-inflamatória. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar as características fenotípicas de linfócitos T CD8+ periféricos na infecção por CHIKV em humanos, o papel imunomodulador da Riparina III nestas células e investigar a participação de receptores colinérgicos na modulação fenotípica desses linfócitos nesta infecção. Para realização dos ensaios, leucócitos de pacientes em fase aguda e crônica da infecção e indivíduos saudáveis foram obtidos e em seguida foi realizada marcação com anticorpos extracelulares e intracelulares ex vivo e após o tratamento com as drogas em estudo in vitro para avaliação de características fenotípicas de células T CD8<sup>+</sup> e do papel imunomodulador da Riparina III pelo método de citometria de fluxo. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que: 1- Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão ativados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção pelo aumento da expressão do marcador de ativação CD69 em relação. 2- Possuem mecanismo citotóxico ativado pela expressam de moléculas citotóxicas (Granzima B e Perforina) na fase aguda em relação aos indivíduos saudáveis. 3-Expressam aumento de marcadores de morte CD95 e CD95L em ambas as fases da doença. 4-Ocorre o aumento da produção de IL17A por esses linfócitos na fase aguda e crônica da infecção e diminuição da expressão de IL10R também foram demonstradas. 5-Não houve aumento ou diminuição da expressão de PD-1 por essas células, demonstrando que esses linfócitos não estão submetidos à exaustão. 6- A Riparina III possui confiabilidade *in vitro* por não alterar a viabilidade das células em testes de atividade hemolítica e PBMC pelo método de MTT. 7- A Riparina III foi capaz de modular negativamente a produção de IL-17A principalmente em fase aguda da infecção e modulou negativamente a expressão de INF-y, evidenciando seu papel anti-inflamatório. 8- A Riparina III aumentou a expressão de IL-10R, o que permite o aumento interação da IL-10 com seu receptor, reafirmando o papel antiinflamatório dessa molécula. 9- O efeito anti-inflamatório desempenhado pela Riparina III em células T CD8<sup>+</sup> não foi relacionado à modulação em receptores colinérgicos, pela não alteração de características fenotípicas desses linfócitos frente ao tratamento com diferentes drogas (PNU, MLA, Atropina) e a Riparina III. Logo, pode-se concluir com os dados obtidos neste trabalho que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão fortemente envolvidos na resposta celular na infecção aguda por CHIKV e as características fenotípicas dessas células podem estar diretamente relacionadas com o desenvolvimento dos sintomas observados nesta infecção. Além disso, a Riparina III tem um efeito imunomodulador anti-inflamatório nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados com CHIKV na fase aguda da doença principalmente pela diminuição dos níveis de citocinas inflamatórias nesses linfócitos.

**Palavras-Chave:** Ativação, célula, artralgia, inflamação, receptores colinérgicos, produtos naturais, IL17A, IL10R.

#### **ABSTRACT**

DIAS, C. N.S. **CD8**<sup>+</sup> **T CELLS IN CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION: EVALUATION OF PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND INVESTIGATION OF RIPARIN III IMMUNOMODULATOR PAPER.** Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus that causes feverish illness accompanied by joint pain. The dysregulation of the inflammatory immune response may be related to the development of chronicity of the disease that is accompanied by milder, but relapsing and persistent joint symptoms that may cause movement limitation. In this context, the understanding of the role of CD8+ T lymphocytes and the viral combat mechanisms in CHIKV infection are important in understanding the disease immunopathology. Studies of the acetylcholine role influencing immune responses have been conducted and in recent years the cholinergic system has been associated with inflammatory and anti-inflammatory immune responses. Due to the severity of inflammatory symptoms in CHIKV infection, there is an urgency to search for new molecules with bioactive and/or pharmacological activities. Natural products are a source of molecules with various biological activities. Alkamides are described by various biological activities, including anti-inflammatory activity. Given the above, the objective of this work was to study the phenotypic characteristics of peripheral CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in CHIKV infection in humans, the immunomodulatory role of Riparin III in these cells and to investigate the participation of cholinergic receptors in the phenotypic modulation of these lymphocytes in this infection. To perform the assays, leukocytes from acute and chronic infection patients and healthy individuals were obtained, followed by labeling with ex vivo extracellular and intracellular antibodies and after treatment with drugs in an in vitro study to evaluate phenotypic characteristics of CD8<sup>+</sup> T cells and the Riparina III immunomodulatory role by the flow cytometry method. The results obtained in this work demonstrated that: 1-CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are activated in both acute and chronic phase of infection by increasing the expression of CD69 activation marker. 2- They have cytotoxic mechanism activated by the expression of cytotoxic molecules (Granzima B and Perforin) in the acute phase in relation to healthy individuals. 3- Express increase of death markers CD95 and CD95L in both stages of the disease. 4- There is an increase in IL17A production by these lymphocytes in the acute and chronic phase of infection and a decrease in IL10R expression have also been demonstrated. 5-There was no increase or decrease in PD-1 expression by these cells, demonstrating that these lymphocytes are not subjected to exhaustion. 6- Riparina III has in vitro reliability because it does not alter cell viability in hemolytic activity and PBMC tests by the MTT method. 7-Riparina III was able to negatively modulate IL-17A production mainly in the acute phase of infection and negatively modulated the expression of INF-y, evidencing its anti-inflammatory role. 8- Riparina III increased the expression of IL-10R, which allows the increased interaction of IL-10 with its receptor, reaffirming the anti-inflammatory role of this molecule. 9- The antiinflammatory effect of Riparina III on CD8 + T cells was not related to cholinergic receptor modulation, due to the non-alteration of phenotypic characteristics of these lymphocytes when treated with different drugs (PNU, MLA, Atropine) and Riparina III. Therefore, it can be concluded from the data obtained in this work that CD8 + T lymphocytes are strongly involved in the cellular response in acute CHIKV infection and the phenotypic characteristics of these cells may be directly related to the development of symptoms observed in this infection. In addition, Riparina III has an anti-inflammatory immunomodulatory effect on CD8 + T lymphocytes in CHIKV-infected patients in the acute phase of the disease mainly by decreasing inflammatory cytokine levels in these lymphocytes.

**Key words:** Activation, cell, arthralgia, inflammation, cholinergic receptors, natural products, IL17A, IL10R.

# LISTA DE TABELAS

		sintomas clíi	_			=	=
Reação er	n Cade	e sequência ia pela P	olimerase	e (q-PC	R) para	detecção	do vírus
CD8 <sup>+</sup>	e	marcação cor seus		diferente	s	fenótipos	de
CD8 <sup>+</sup> e seu	s diferen	marcação cor tes fenótipos	de expr	essão apó	s o tratar	mento com a	as diferentes
		de da Ripa					
		mográficos e					
		demográfico				_	
Tabela 8-	Dados	demográficos	s e clí	nicos do	grupo	Chikungun	ya Crônica

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<b>1-</b> Ciclos	de ii	nfecção silvestre	e (A) e urba	no (B) enve	olvidos na	transmis	são da
Chikungı	unya							20
Figura 2	- Diagran	na de t	ransmissão do vi	írus Chikungu	nya			21
Figura 3	- Exemp	los de	tropismo do ví	írus Chikungu	nya			24
Figura 4	- Respost	a imui	nológica na infec	ção por CHIK				25
Figura	5	_	Mecanismo	de	ativação	de	células	T
CD8 <sup>+</sup>								28
Figura	6	_	Sistema	colinérgico	linfocít	ico na	a reg	gulação
imunológ	gica							32
Figura 7	- Estrutur	a quín	nica da Riparina	III				39
Figura 8	- Reação	de red	ução do MTT a	formazan				47
Figura 9	- Esquem	a de tı	atamento com di	rogas e marca	ção com antid	corpos		53
Figura	10	-	Estratégia	de Análi	se de	Células	T	CD8
			•••••					56

# LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Avaliação da viabilidade de células mononucleares do sangue periférico frente a diferentes concentrações da Riparina III
<b>Gráfico 2</b> - Medida da porcentagem de células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença <i>ex vivo</i> e após o tratamento com a Riparina III
<b>Gráfico 3</b> - Expressão de CD69 em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão <i>ex vivo</i> e após o tratamentos com Riparina III
<b>Gráfico 4</b> - Expressão de CD107A em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão dessas células <i>ex vivo</i> e tratadas com Riparina III
<b>Gráfico 5</b> - Produção de Granzima B em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção <i>ex vivo</i> e após o tratamento com Riparina III
<b>Gráfico 6</b> – Produção Perforina em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção <i>ex vivo</i> e após o tratamento com Riparina III
<b>Gráfico 7</b> — Produção de IL-10 em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção <i>ex vivo</i> e após o tratamento com Riparina III
<b>Gráfico 8</b> - Expressão de IL-10R em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão <i>ex vivo</i> e após tratamento com Riparina III
<b>Gráfico 9</b> – Produção de IL-17A em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção <i>ex vivo</i> e após o tratamento com Riparina III
<b>Gráfico 10</b> – Produção de INF-γ em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção <i>ex vivo</i> e após o tratamento com Riparina III
<b>Gráfico 11</b> - Expressão de PD-1 em células T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão <i>ex vivo</i> e após o tratamento com Riparina III

infectados co	m CHIKV	em fase a	95 em células aguda e em fa ato com Ripari	se crônic	a da doença.	O gráfico d	emonstra a
infectados co	m CHIKV	em fase a	5L em células nguda e em fa nto com Ripari	se crônic	a da doença.	O gráfico d	emonstra a
pacientes inf demonstra	ectados con a expres	n CHIKV ssão <i>ex</i>	D95/CD95L e om fase agu vivo e	ıda e em após	fase crônica o tratame	da doença. nto com	O gráfico Riparina
saudáveis	após	0	em células tratamento	com	as	diferentes	drogas
saudáveis	após	О	7A em células tratamento	com	as	diferentes	drogas
saudáveis	após	О	na B em célul tratamento	com	as	diferentes	drogas
saudáveis	após	O	na em células tratamento	com	as	diferentes	drogas
saudáveis	após	O	em células tratamento	com	as	diferentes	drogas
saudáveis	após	0	em células tratamento	com	as	diferentes	drogas
saudáveis	após	O	em células tratamento	com	as	diferentes	drogas
saudáveis	após	O	em células tratamento	com	as	diferentes	drogas

### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CHIK- Chikungunya

CHIKV- Chikungunya vírus

CHIKD- Doença Chikungunya

**CHIKF-** Febre Chikungunya

**ORF-** Regiões abertas de leitura

RNA- Ácido Ribonucleico

**nSP** – Proteínas não estruturais

**pH-** Potencial Hidrogeniônico

SFV- Vírus Semliki Forest

SINV-Vírus Sindbis

ONNV- Vírus O'Nyong-Nyong

**BFV-** Vírus Barmah Forest

**RRV-** Vírus Ross River

**SGB-** Síndrome de Guillain-Barré

IL- Interleucina

PD-1- Proteína de morte celular programada

**NK-** Natural Killer

KIR- Receptor semelhante a imunoglobulina de célula assassina

HLA- Antígeno Leucocitário Humano

CDs- Células Dendríticas

**Th-** Thelper

ACh- Acetilcolina

AChR- Receptor de Acetilcolina

mAChR- Receptor muscarínico de Acetilcolina

nAChR- Receptor nicotínico de Acetilcolina

ChAT- Colina Acetil transferase

RNAm- RNAmensageiro

RTPCR- PCR em tempo real

**PLC-** Fosfolipase C

GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina

**IP3-** Inositol-1,4,5-trifosfato

CarCh- Carbacol

**OXO-** Oxotremorina

PHA- Fitohemaglutinina

CMSP- Células Mononucleares do Sangue Periférico

PNU-PNU 282987

MLA- Metilicaconitina

**RIP**- Riparina

ATROP- Atropina

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇAO	. 16
2. REVISÃO DE LITERATURA	. 19
2.1 O Vírus da Chikungunya e sua transmissão	. 19
2.2 Resposta imune na infecção por CHIKV	. 23
2.3 Receptores colinérgicos em células T	. 29
2.4 Manifestações clínicas na infecção por CHIKV	. 32
2.5 Diahnóstico e Tratamento	. 35
2.6 Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e Riparinas	. 38
3. OBJETIVOS	. 41
3.1 Objetivo Geral	. 41
3.2 Objetivos Específicos I	. 41
3.3 Objetivos Específicos II	. 41
3.3 Objetivos Específicos III	. 42
4. MATERIAIS E MÉTODOS	. 43
4.1 Obtenção da Riparina III	. 44
4.1.1 Preparação da Riparina III	. 44
4.2 Atividade citotóxica da Riparina III	. 45
4.2.1 Atividade hemolítica	. 45
4.2.2 Ensaio de citotoxicidade da Riparina III pelo método de MTT utilizando PBMC (célu mononucleares do sangue periférico)	
4.3 Seleção de amotras humanas para ensaios de citometria de fluxo	. 47
4.4 Amostras clínicas	. 48
4.5 Extração do RNA viral e Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimer (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya	
4.6 Obtenção de leucócitos para realização da citometria de fluxo	. 50
4.7 Drogas utilizadas	. 50
4.8 Anticorpos monoclonais fluorescentes	. 51
4.9 Tratamento de leucócitos de pacientes com Chikungunya aguda e crônica e indivíd saudáveis com a Riparina III	
4.10 Tratamento com agonista e antagonista de receptores colinérgicos e antagonista receptores muscarínicos em leucócitos de pacientes com Chikungunya crônica e indivíd saudáveis	luos
4.11 Protocolo de marcação com anticorpos monoclonais de leucócitos <i>ex vivo</i> e após tratamento com as drogas em estudo	
4.12 Citometria de fluxo	55

4.13 Estratégia de análise de células T CD8 <sup>+</sup> e respectivos marcadores avaliados
4.14 Análise estatística
5. RESULTADOS58
5.1 Avaliação da citoxicidade da Riparina III frente a eritrócitos humanos
5.2 Avaliação da citotoxicidade da Riparina III frente a células mononucleares do sangue periférico (CMSP)
5.3 Dados demográficos e clínicos
5.4 Avaliação do perfil fenotípico de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica <i>ex vivo</i> e após o tratamento com a Riparina III
5.5 Expressão do perfil fenotípico de ativação celular (marcador extracelular CD69) em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica <i>ex vivo</i> e após o tratamento com a Riparina III
5.6 Expressão do perfil fenotípico de mecanismos de exocitose (CD107A) de proteínas citotóxicas (Granzima B e Perforina) em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica ex vivo e após o tratamento com a Riparina III
5.7 Expressão do perfil fenotípico da citocina intracelular reguladora IL-10 e seu receptor (IL-10R) em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica ex vivo e após o tratamento com a Riparina III
5.8 Expressão do perfil fenotípico de citocinas intracelulares inflamatórias (IL-17A e INF-γ) em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica ex vivo e após o tratamento com a Riparina III
5.9 Expressão de marcadores de morte (PD-1, CD95 e CD95L) em linfócitos T CD8 <sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica <i>ex vivo</i> e após o tratamento com a Riparina III
5.10 Expressão de marcadores extracelulares e produção de citocinas intracelulares em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica e avaliação da imunomodulação de diferentes drogas que atuam em receptores de acetilcolina
6. DISCUSSÃO80
7. CONCLUSÕES
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS92
APÊNDICES114
ANEXOS

# 1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por vetores e sua disseminação são geralmente decorrentes de vários fatores como alterações ambientais decorrentes da ação do homem, crescimento desordenado da urbanização, desmatamentos e fluxo de pessoas (LIMA-CAMARA, 2016). Dentre essas doenças podem-se destacar as arboviroses, que são doenças transmitidas por artrópodes (KUCHARZ, CEBULA-BYRSKA, 2012). A arbovirose Chikungunya é uma doença viral causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV). Esse vírus pertence ao gênero alfavírus e a família Togaviridae e é transmitido por mosquito do gênero *Aedes* (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

O CHIKV foi primeiramente isolado entre 1952-1953 de pacientes febris no Planalto Makonde na Tanzânia, antigo Tanganyika (THIBERVILLE et al., 2013). Dessa região veio o nome Chikungunya, que na língua Makonde significa "aquele que se dobra" ou "tornar-se contorcido" e é usado para descrever tanto o vírus quanto à doença (BURT et al., 2012). Após o isolamento do vírus, sabe-se que o mesmo permaneceu circulante em ciclos silvestres na África, sendo a primeira re-emergência documentada com sua introdução no sudeste asiático e na Índia, no ano de 2005, instalando-se em um ciclo esporádico de transmissão urbana que permanece atualmente (MORRISON et al., 2011; HONÓRIO et al., 2015). Esses surtos documentados são associados a mutações no genoma viral do CHIKV, que facilitaram a replicação do vírus em mosquitos *Aedes albopictus* (THIBERVILLE et al., 2013).

A doença chikungunya (CHIKD) ou febre chikungunya (CHIKF) é uma condição aguda e sintomática caracterizada principalmente pela poliartralgia grave e febre alta observada na fase aguda podendo evoluir para artrite crônica, a qual pode conduzir o paciente a um quadro debilitante e de dificuldades de locomoção (KUCHARZ, CEBULA-BYRSKA, 2012). Além dos principais sintomas observados como artralgia, mialgia, febre, náuseas e dor de cabeça, o edema também é constantemente relatado (RENAULT et al., 2007; NG, HAPUARACHCHI, 2010).

Apesar de ter sido considerado um vírus enzoótico, inicialmente encontrado apenas em regiões tropicais e subtropicais da África, ilhas na Índia e no sul e sudeste da Ásia (BURT et al., 2012), o CHIKV tem aparecido novamente causando consideráveis surtos que têm se estendido pelos cinco continentes. No Brasil, a primeira transmissão autóctone foi detectada em setembro de 2014, na cidade de Oiapoque, no Amapá (HONÓRIO et al., 2015). O Brasil era um país "virgem" para o CHIKV, o que indica

que os habitantes não apresentavam memória imunológica para o mesmo, ademais, as características climáticas e ambientais do país associados à ineficácia do controle dos mosquitos do gênero *Aedes*, garantiram que o CHIKV encontrasse no Brasil um cenário de alta receptividade a sua disseminação.

A resposta imune desempenhada por um hospedeiro é determinante para o estabelecimento ou não de infecções e é resultante de interações celulares e moleculares. A fase aguda da infecção por CHIKV é acompanhada por um aumento Da citocina interferon (INF)-α, que se correlaciona com a carga viral observada (HOARAU et al., 2010; WAUQUIER et al., 2011), a qual é detectável nos primeiros dias de infecção, seguido de modulação positiva e negativa de muitas outras citocinas e quimiocinas, bem como mediadores inflamatórios (CHOW et al., 2011; PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015; DIAS et al., 2018).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> ou linfócitos citotóxicos (CTL) por seus diferentes mecanismos de ação são os principais atores no controle e defesa imune contra patógenos intracelulares, incluindo vírus e bactérias (WISSINGER, 2019). Apesar de o entendimento do papel das células T na imunopatologia da infecção por CHIKV ainda ser inicial, as células T CD8<sup>+</sup> têm sido relacionadas à infecção inicial em humanos (WAUQUIER et al., 2011; MINER et al., 2015) e estudos sobre os mecanismos das células T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV têm sido conduzidos (DIAS et al., 2018).

Pesquisas vêm demonstrando a influência da ACh sobre o sistema imunológico e interações neuroimunoendócrinas, bem como a síntese de acetilcolina e sua ação autócrina/parácrina em células do sistema imune têm sido bastante estudadas e constituem uma área da ciência em intensa investigação.

A expressão gênica de todos os cinco subtipos (M1-M5) de receptores muscarínicos da acetilcolina (mAChR) foi detectada em linhagens de células T leucêmicas humanas e em células T e B do sangue periférico humano, bem como leucócitos mononucleares, células dendríticas e macrófagos (KAWASHIMA; FUJII, 2000) e genes que expressam as subunidades α3, α5, α7, α9 e α10 dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) foram demonstrados em linfócitos T, B e macrófagos (SATO et al., 1999; KAWASHIMA et al., 2007; QIAN et al., 2011; KAWASHIMA et al., 2012; KAWASHIMA et al., 2015). Ademais, a acetilcolina e os diferentes agonistas nicotínicos foram capazes de modular diferentes funções fisiológicas e imunopatológicas (KAWASHIMA et al., 2015).

Um silenciamento da resposta inflamatória parece ser necessário para impedir o estabelecimento de uma doença crônica que pode levar ao desenvolvimento de artralgia crônica ou artrite (PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015).

Na infecção por CHIKV o tratamento é sintomático e a ingestão de líquido deve ser abundante. O paracetamol e a dipirona são as drogas prioritariamente utilizadas no tratamento dos sintomas relatados nos casos agudos da infecção. Drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) ou não hormonais (AINHs) não devem ser utilizados para o alívio dos sintomas agudos, devido ao risco de complicações renais e de sangramento aumentado desses pacientes (BRIGHTON, 1984; MOHAN et al., 2010; BRASIL, 2017). Atualmente não existem medicamentos antivirais, vacinas ou drogas preventivas na infecção por CHIKV (STAPLES; FISHER, 2014; ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015).

Diante do exposto, a investigação de novas drogas que possuam atividade bioativa, as quais produtos naturais e sintéticos bioativos, constituem uma alternativa significante no descobrimento e desenvolvimento de importantes e modernas drogas utilizadas na terapêutica (KHAN et al., 2018).

A *Aniba riparia* (Ness) é uma espécie pertencente a família Lauraceae, uma planta típica da Amazônia brasileira onde é conhecida popularmente como Louro (BARBOSA- FILHO et al., 1987; DE CARVALHO et al., 2013). A partir dos seus frutos podem ser isolados vários constituintes químicos. Dentre esses constituintes, está a classe das riparinas (riparina I-IV) ou bezoil-tiraminas (BARBOSA-FILHO, SILVA, BHATTACHARYYA, 1990), que também podem ser obtidas sinteticamente e são conhecidas por possuir diversas atividades biológicas, dentre elas, antimicrobiana (CATÃO et al., 2010), antimalárica, anti-inflamatória (DE CARVALHO et al., 2013; SILVA et al., 2015) e espasmolítica em musculo liso de íleo de cobaia, antagonizando o efeito da contração provocado pela acetilcolina (THOMAS et al., 1994; CASTELO BRANCO et al., 2000; MARQUES et al., 2005).

Os estudos desenvolvidos neste trabalho contribuíram para caracterizar os mecanismos do linfócito T CD8<sup>+</sup> e seu papel na infecção por CHIKV, assim como, demonstrar o papel bioativo da Riparina III em linfócitos T CD8<sup>+</sup> nesta infecção.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 O vírus da Chikungunya e sua transmissão

O vírus da Chikungunya é agente etiológico da febre Chikungunya ou doença Chikungunya transmitida por artrópodes principalmente do gênero *Aedes* (WEAVER, 2006). Descrito pela primeira vez em 1952, os primeiros casos de CHIKF foram tratados como infecção pelo vírus da dengue (DENV) (LUMSDEN, 1955; SILVA JR et al., 2018). CHIKV pertence ao gênero alfavírus, o qual é composto por vários sorocomplexos agrupados com base em suas propriedades antigênicas (BURT et al., 2012). O gênero é composto por 31 vírus, dos quais, sete podem causar doenças articulares em humanos, que incluem além do CHIKV, o vírus Semliki Forest (SFV), vírus O'Nyong-Nyong (ONNV) (África Central), vírus Ross River (RRV), vírus Barmah Forest (BFV) (Austrália e oceano Pacífico), vírus Sindbis (SINV) (cosmopolita) e vírus Mayaro (MAYV) (América do Sul e da Guiana Francesa) (SUHRBIER; JAFFAR-BANDJEE; GASQUE, 2012). O CHIKV pertence ao complexo antigênico do SFV (KOGA et al., 2017).

O vírus consiste em um envelope de fosfolipídio, um capsídeo com 60 a 70-nm de diâmetro e um RNA de sentido positivo de cadeia simples de aproximadamente 12 kb contendo 2 sequências abertas de leitura (ORFs- regiões abertas de leitura). A ORF no final 5'(PAL, 2015) codifica 4 proteínas não estruturais (nSP1-nSP4), que formam o complexo de replicação envolvido na síntese de RNA genômico bem como o RNA subgenômico (WICHIT et al., 2017), e o ORF no final 3' (PAL, 2015) codifica proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral, glicoproteínas do envelope E1 e E2 (SILVA et al., 2014), e dois pequenos produtos de clivagem, E3 e 6K (VU; JUNGKIND; LABEAUD 2017).

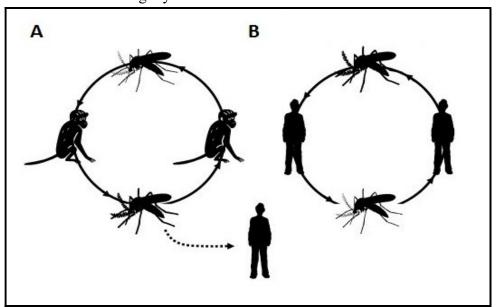
Apesar de o vírus CHIK ser um membro dos alfavírus artritogênicos, foi registrado, durante um surto recente, casos de meningoencefalite (principalmente em recém-nascidos) e doença hemorrágica (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; TANABE et al., 2018), indicando essas complicações como importantes na infecção aguda por esse vírus (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

Alguns alfavírus não são patogênicos para os seres humanos, por outro lado, outros são potencialmente infecciosos e estão associados com sintomas graves. São classificadas como alfaviroses do novo mundo e do velho mundo (RULLI et al., 2005).

Do ponto de vista clínico, os dois grupos se distinguem em aqueles associados com encefalite (vírus predominantemente do novo mundo) e aqueles associados com poliartrite e erupção cutânea (vírus predominantemente do velho mundo) (POWERS et al., 2001; GRIFFIN, 2007; WEAVER; REISEN, 2010). Ao contrário dos alfavírus encefalogênicos típicos, que infectam neurônios, CHIKV parece infectar as células do estroma do sistema nervoso central e, em particular, o revestimento de plexo coróide (SCHWARTZ, ALBERT, 2010).

Tanto o ciclo de infecção silvestre quanto o ciclo de infecção urbano têm sido descritos (NASCI, 2014; SILVA JR., 2018). No ciclo silvestre a dinâmica de transmissão desse vírus é alternada entre primatas, morcegos, roedores e outros vertebrados não identificados, esse ciclo foi inicialmente descrito no continente africano. Os animais acometidos apresentam viremia, mas nenhuma das manifestações físicas pronunciadas. Esse ciclo consiste em um ciclo zoonótico que envolve padrões semelhantes ao de outras arboviroses, no qual o vírus é transmitido por mosquito vetor do gênero *Aedes spp.* através do repasto sanguíneo e caso o mosquito realize um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro não infectado (**Figura 1**), o mesmo poderá vir a ser contaminado (KOGA, 2017).

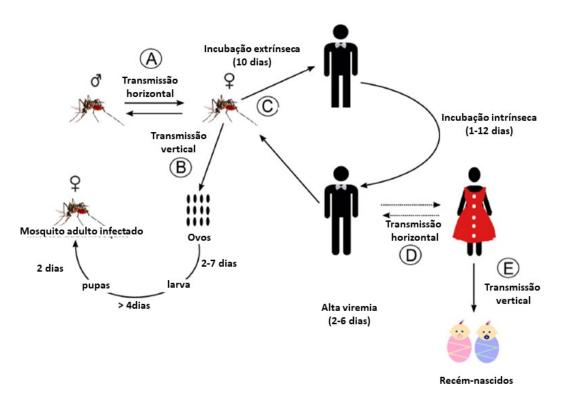
**Figura 1-** Ciclos de infecção silvestre (A) e urbano (B) envolvidos na transmissão da Chikungunya.



**Fonte:** Science in the News - Chikungunya Virus on the Move - Harvard University, 2014. (A) Ciclo de transmissão silvestre ocorre entre animais vertebrados e persiste durante períodos inter-epidêmicos. (B) Ciclo de transmissão urbano ocorre em períodos epidêmicos.

A infecção CHIKV é transmitida à população humana em ciclos urbanos pelos mosquitos *Aedes aegypti* ou *Aedes africanus* e, desde 2006, o *Aedes albopictus* tem sido responsabilizado por diversas infecções ao redor do mundo (WALDOCK et al., 2013; PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015). Esse ciclo inicia-se quando o vírus encontra situações favoráveis de proliferação em mosquitos adaptados a áreas urbanas, como o *Aedes aegypti*, que vivem em áreas domésticas ou peridomésticas. Uma vez dentro do vetor artrópode, o CHIKV se replica e alcança as glândulas salivares dos mosquitos em cerca de sete a dez dias para transmissão a um humano susceptível (LIM et al., 2018), iniciando o processo de infecção na realização do repasto sanguíneo a um indivíduo não infectado (THIBERVILLE et al., 2013) (**Figura 2**).

Figura 2 – Diagrama de transmissão do vírus Chikungunya.



**Fonte:** Adaptado de SILVA JR et al., 2018. (A) Transmissão horizontal entre vetores da CHIKV; (B) Transmissão vertical entre vetores; (C) Transmissão a humanos susceptíveis a infecção; (D) Transmissão horizontal em humanos; (E) Transmissão vertical em humanos; Linhas pontilhadas indicam vias de transmissão ainda não foram descritas.

A transmissão ocorre através da picada do mosquito fêmea infectado e após a inoculação do vírus nos capilares subcutâneos, o mesmo se replica em células

susceptíveis (macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e células mielóides semelhantes a macrófagos), além disso, foi identificado em um modelo com zebrafish que células vermelhas também podem ser infectadas com esse vírus (PALHA et al., 2013). A ligação da proteína do capsídeo E1 com receptores celulares leva a fusão da partícula viral com a membrana da célula hospedeira (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015) resultando na internalização viral por endocitose, por mecanismos dependentes e independentes de Clatrina (LEE et al., 2013; THAA et al., 2015). Em seguida, as partículas virais são envolvidas por endossomas iniciais, a partir dos quais o capsídeo viral é liberado no citosol através da formação de poros de fusão (LEE et al., 2013).

O último processo é desencadeado pelo ambiente de baixo pH (potencial hidrogeniônico) no endossoma que induz uma mudança irreversível na conformação da glicoproteína e uma dissociação dos heterodímeros E2/E1, seguidos de trimerizações E1 (WICHIT et al., 2017). A síntese do RNA viral acontece em complexos localizados próximo à membrana plasmática (THAA et al., 2015). As proteínas E1 e E2 são traduzidas no retículo endoplasmático, transportadas através do Complexo de Golgi, processadas e, finalmente, transportadas para a membrana plasmática onde ocorre a externalização do vírus (WICHIT et al., 2017). Em seguida, ocorre a migração para os órgãos alvo através da corrente sanguínea (TALARMIN et al., 2007; COUDERC et al., 2008; ROBIN et al., 2010; PALHA et al., 2013; PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015). O período de incubação silenciosa do vírus é de 2 a 7 dias e os indivíduos infectados podem apresentar viremia em até dez dias (KAM et al., 2009; SIMON et al., 2011; AZEVEDO et al., 2015). Após esse período ocorre um súbito aparecimento da doença clínica, a carga viral na circulação sanguínea aumenta rapidamente e chega a atingir altíssimas concentrações nos primeiros dias de sintomas, podendo chegar a 10<sup>10</sup> copias/mL de plasma o que é incomum nas outras arboviroses e que parece ser correlacionado com a presença e gravidade de sinais e sintomas clínicos (APPASSAKIJ et al., 2013; CHOW et al., 2011; PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015; DELISLE et al., 2015).

A transmissão horizontal do CHIKV em mosquitos *Aedes* pode ocorrer e atuar de maneira positiva no sentido de manter os ciclos de infecção (**Figura 2A**) (MAVALE et al., 2010). Interessantemente a transmissão vertical do CHIKV em *Aedes* também foi demonstrada em condições naturais e experimentais, esse tipo de transmissão foi apontada como uma possível razão para a persistência viral sob condições ambientais

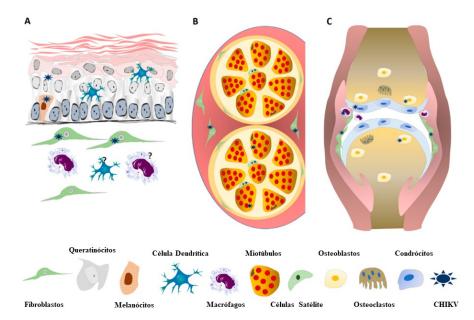
adversas (**Figura 2B**) (CHOMPOOSRI et al., 2016; JAIN et al., 2016). Uma vez dentro do artrópode, CHIKV se replica e alcança as glândulas salivares do mosquito e por volta de 10 dias ocorre à transmissão para humanos susceptíveis (**Figura 2C**) (SILVA JR al., 2018).

Em humanos, a transmissão materno-fetal também foi relatada (**Figura 2E**). A Encefalite neonatal, como consequência da transmissão vertical, foi observada, por exemplo, durante a epidemia brasileira em 2016 (BANDEIRA et al., 2016; LYRA et al., 2016). Contudo, nenhuma transmissão no leite materno foi demonstrada (PATTERSON et al., 2016). Apesar do fato de que o RNA do CHIKV ter sido detectado no sêmen masculino mesmo após 30 dias do início dos sintomas clínicos, indicando uma possível transmissão via relação sexual, a transmissão horizontal entre seres humanos ainda não foi confirmada (**Figura 2D**) (BANDEIRA et al., 2016; PATTERSON et al., 2016; SILVA JR et al., 2018).

# 2.2 Resposta imune na infecção por CHIKV

Após a inoculação do CHIKV nos capilares subcutâneos através do repasto sanguíneo do mosquito fêmea do gênero *Aedes*, ocorre invasão a células susceptíveis à infecção, como fibroblastos, células dendríticas e macrófagos da derme. Embora o hospedeiro monte uma resposta de controle viral na derme o mesmo e se replica rapidamente através da circulação sanguínea. Partículas virais são produzidas no local e são transportadas através da circulação sistêmica para órgãos linfóides secundários e em seguida se disseminam para diferentes órgãos, dentre eles, cérebro, figado, baço, músculos e articulações (**Figuras 3 e 4**) (PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015).

Figura 3. Exemplos de tropismo do vírus Chikungunya.

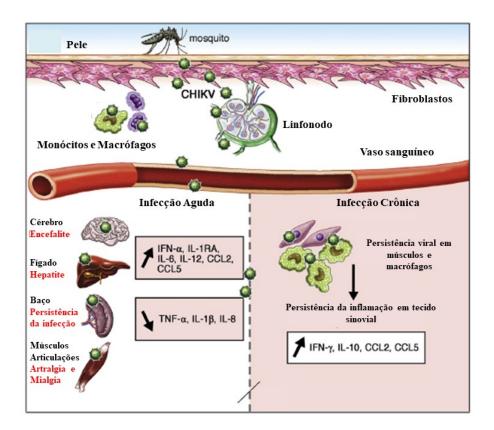


**Fonte:** Adaptado de Matusali et al., 2019. (A) O vírus Chikungunya (CHIKV) infectando células na pele; (B) No músculo esquelético; (C) Nas articulações e ossos.

Em camundongos knockout para o fator de resposta ao INF foi observado quadro de choque e febre hemorrágica (RUDD et al., 2012), dado esse que ressalta a importância dessa citocina na patologia da infecção por CHIKV. Como relatado em diversos estudos, à persistência dos sintomas na infecção por CHIKV está associada a uma resposta imune proinflamatória, na qual várias citocinas desse perfil têm sido detectadas. Além do INF-α, a alta carga viral também tem sido relacionada com IL-1RA (receptor de IL-1), IL-6, IL-12, CCL2 e CXCL10 (HOARAU et al., 2010; CHOW et al., 2011; KELVIN et al., 2011; PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015).

Citocinas do perfil denominado Th1 são essenciais para promover a ativação de células imunes, mas por outro lado também podem causar um agravamento no quadro clínico por promover lesões nos tecidos. Inusitadamente, citocinas proinflamatórias, tais como TNF- α, IL- 1β e IL-8 (**Figura 4**), foram fracamente expressas na fase aguda da infecção por CHIKV, e citocinas do perfil Th2 ditas anti-inflamatórias ou reguladoras (IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13) foram encontradas em apenas alguns pacientes infectados com CHIKV (NG et al., 2009; VENUGOPALAN; GHORPADE, CHOPRA, 2014).

Figura 4- Resposta imunológica na infecção por CHIKV



**Fonte:** Adaptado de PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015. Resposta imune observada na infecção por CHIKV. A disseminação viral ocorre nos primeiros dias de infecção por CHIKV. A fase aguda é caracterizada por as manifestações clínicas que podem ser graves e a persistência viral é observada em pacientes na fase crônica de infecção por CHIKV.

As infecções virais representam uma série de interações entre o patógeno e o sistema imune do hospedeiro acometido. As células Natural Killer (NK) são consideradas a primeira linha de defesa contra vários tipos de infecções por vírus. Essas células da imunidade inata possuem um equilíbrio de sinais ativadores e inibidores e tem a capacidade de identificar e lisar células alvo infectadas por vírus, enquanto as células normais não infectadas são poupadas (JOST; ALTFELD, 2013). A infecção por CHIKV está associada à linfopenia e neutropenia, bem como um aumento de monócitos e de uma resposta proinflamatória (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Estudos têm demonstrado a importância das células NK no controle da infecção por CHIKV e durante a infecção essas células são poupadas da profunda linfopenia observada e se apresentam em um perfil de ativação (HOARAU et al., 2010; PETITDEMANGE et al., 2011; PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015).

A infecção pelo CHIKV é capaz de modificar o repertório de receptores de ativação de células NK para CD94/NKG2C<sup>+</sup>, que geralmente é muito pouco ou não expresso nessas células em indivíduos saudáveis (PETITDEMANGE et al., 2011). Além da infecção por CHIKV a de outros vírus como o citomegalovírus, o hantavírus e o pelo HIV-1 também apresentam efeito na expressão de NKG2C (MALMBERG; BEZIAT; LJUNGGREN, 2012). Na infecção por CHIKV as células NKG2C possuem ação citotóxica mais potente que a produção de IFN-γ (PETITDEMANGE et al., 2011), enfatizando o papel proeminente dessas células no controle e destruição de células infectadas por vírus. Por outro lado, a falta de IFN-γ no microambiente poderia estar relacionada a um atraso na resolução dos sintomas persistentes devido a uma alteração ou retardo no início da resposta imune adaptativa provocado pela falta desse mediador inflamatório. As células NK também expressam receptores de células assassinas tipo imunoglobulina (KIRs). Estudos demonstram que a força de interação entre KIRs e seus ligantes HLA tem significado funcional e pode influenciar a suscetibilidade e os resultados de várias doenças infecciosas (KULKARNI; MARTIN; CARRINGTON, 2008).

Apesar de parecerem benéficas na fase aguda da infecção por CHIKV as células NK posteriormente podem estar envolvidas no desenvolvimento de mecanismos imunopatológicos pela participação da infiltração de tecidos sinoviais e manutenção de um ambiente inflamatório que poderia contribuir para o desenvolvimento de sintomas articulares inflamatórios (HOARAU et al, 2010). Em alguns estudos, o edema constantemente relatado nesta infecção é correlacionado com a ação das células NK que ativam células macrofágicas CDb11+ levando a um aumento de interleucina-6 (IL6) e outros mediadores proinflamatórios que induzem um derrame vascular gerando o edema (ROUZAIRE et al., 2012; TEO et al., 2015).

Monócitos circulantes e células dendríticas (CDs) não exibem um perfil de ativação na fase aguda da infecção por CHIKV (HOARAU et al., 2010). Porém, estudos sugerem uma modulação na expressão de um imunoreceptor em CDs, o qual é associado ao desenvolvimento de artrite reumatoide, podem atuar de maneira importante nas respostas inflamatórias durante os estágios agudos da infecção por CHIKV (LONG et al., 2013). Além disso, monócitos/macrófagos atuam como reservatório celular para persistência viral e migram para tecidos sinoviais favorecendo o processo inflamatório. Dessa maneira, essas células atuam de forma importante na patologia induzida pelo CHIKV o que poderia favorecer a manutenção dos sintomas

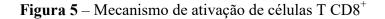
articulares apesar da curta duração da viremia. (LABADIE et al., 2010; KUMAR et al., 2012; HER et al., 2010).

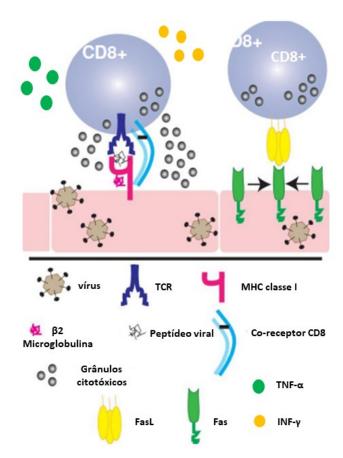
Ademais por serem as principais responsáveis pela disseminação do vírus para outros locais do corpo, como o sistema nervoso e fluido sinovial, e, portanto, podem ser as principais contribuintes no desenvolvimento de manifestações clínicas graves (**Figura 4**). Além dos monócitos/macrófagos, a presença de linfócitos e mediadores proinflamatórios específicos, como IL-6, IL-8 e MCP-1, dentro do líquido sinovial, provavelmente também estão relacionados com a cronicidade da inflamação na doença Chikungunya (SILVA; DERMODY, 2017).

Valores absolutos de contagem de células T estão diminuídos em pacientes nos primeiros dias de infecção, mas após dois (2) meses esses valores voltam à normalidade. As células T ativadas no sangue periférico durante a fase aguda da infecção expressam o marcador CD95, e diante disso, surge a hipótese que a estimulação das células T e apoptose dependente de CD95 das células T CD4<sup>+</sup> está diretamente relacionada com a linfopenia observada (HOARAU et al., 2010; WAUQUIER et al., 2011; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, et al., 2015).

Verificou-se a presença de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no infiltrado de articulações inflamadas em modelo experimental de camundongos infectados por CHIKV (MORRISON et al., 2011; TEO et al., 2013; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, et al., 2015). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos através da apresentação antigênica via MHC I (Complexo de Histocompatibilidade Maior de classe I) presente em todas as células nucleadas.

Quando as células T CD8<sup>+</sup> reconhecem o antígeno tornam-se ativadas (**Figura 5**) e agem por três principais mecanismos. O primeiro é a secreção de citocinas, prioritariamente TNF-α e IFN-γ, as quais têm mecanismos antitumorais e efeitos antimicrobianos. O segundo é a liberação de grânulos citotóxicos, que também são encontrados em células NK, esses grânulos contêm duas famílias de proteínas, Perforina e Granzimas. A Perforina forma um poro na membrana da célula alvo e esse poro permite que a Granzima entre nas células infectadas e clivem proteínas interrompendo a produção de proteínas virais e resultando na apoptose da célula infectada. O terceiro mecanismo importante desempenhado pelas células T CD8<sup>+</sup> é a destruição de células infectadas via interação de CD95-CD95L (Fas-FasL) essa interação gera uma ativação da cascata de caspases que resulta na apoptose da células alvo (WOLINT; BETTS; KOUP, 2004; WISSINGER, 2019).





**Fonte:** Adaptado de WISSINGER, 2019. Após o reconhecimento do peptídeo viral via MHC de classe I e TCR e expressão de moléculas coestimulatórias, a célula T CD8<sup>+</sup> torna-se ativada e está apta a desenvolver seus mecanismos citotóxicos de eliminação de células infectadas.

Estudos recentes relatam que a homeostase prejudicada das células T CD8<sup>+</sup> está relacionada com o risco de doença, incluindo doenças autoimunes humanas que geram fortes dores articulares. Uma resistência à regulação e comprometimento da função das células T CD8<sup>+</sup>, podem contribuir para a persistência da inflamação articular e persistência da dor (PETRELLI, WIJK, 2016).

### 2.3 Receptores colinérgicos em células T

A ACh é o principal neurotransmissor colinérgico e interage com duas classes distintas de receptores, os nicotínicos e os muscarínicos. É amplamente conhecida como um neurotransmissor em ambos os sistemas nervoso central e periférico em espécies de mamíferos.

No entanto, nos últimos anos vários estudos vêm demostrando que a ACh é sintetizada por uma variedade de células (PAVLOV; TRACEY, 2004; PAVLOV et al., 2009). Além da liberação neuronal, a acetilcolina também é produzida por diversos tipos celulares, dentre eles as células do sistema imune. A presença de ambos os receptores em linfócitos tem sido demonstrada por análises de ligante específico, análise de expressão de RNAm e análise de imunocitoquímica usando anti-soros específicos contra respectivos subtipos ou subunidades dos receptores da ACh. Ademais, em 1999 Sato e colaboradores utilizando técnicas de PCR em tempo real (RT-PCR) com linhagens celulares leucêmicas demonstraram pela primeira vez que alguns linfócitos têm o potencial de expressar simultaneamente tanto receptores nicotínicos quanto muscarínicos.

Os receptores de ACh muscarínicos (mAChR) pertencem à classe dos receptores acoplados a proteína G, são ditos receptores metabotrópicos, pois necessitam de uma cascata de sinalização intracelular ou segundos mensageiros para que seu efeito seja atingido. Quando os receptores muscarínicos são ligados a ACh ou a outro agonista, pode-se gerar respostas excitatórias ou inibitórias, a depender do subtipo do mAChR. Existem cinco (5) subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5) que agem através de segundos mensageiros e sistemas de sinalização (BONNER et al., 1987; ALEXANDER; PETERS, 1999). Os subtipos de receptores muscarínicos M1, M3 e M5 são acoplados a proteína Gq/11, a qual após a ligação ao ligante é estimulada e ativa uma via sinalização mediada pela atividade da enzima Fosfolipase C (PLC), resultando em aumento de cálcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Por outro lado os subtipos de receptores muscarínicos M2 e M4 são acoplados a Gi/o, que após sua ativação medeiam a inibição da Ciclase de Adenilil (CA), resultando na diminuição da formação de AMP cíclico (AMPc) (HULME et al., 1990).

Os receptores nicotínicos (nAChR) são proteínas integrais de membrana pertencentes a superfamília dos canais iônicos operados por ligante. Quando ativados, tornam-se abertos e permeáveis aos íons Na<sup>+</sup> e o K<sup>+</sup>, e medeiam a transmissão

excitatória inicial. Esses receptores possuem cinco subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) organizadas para formar um canal iônico (CRESPI; COLOMBO; GOTTI, 2017).

Existem diferentes subunidades proteicas que formam nAChRs, sendo dez isoformas de subunidades  $\alpha$ , quatro subunidades  $\beta$ , além das subunidades  $\delta$ ,  $\gamma$  e  $\epsilon$ . Essas várias subunidades permitem diferentes tipos de combinações que os concede diferentes propriedades. As subunidades associadas com receptores nicotínicos podem mediar várias funções fisiológicas, como por exemplo, a ativação da subunidade  $\alpha$ 7 promove um aumento da condutância celular ao Ca<sup>2+</sup> (MORALES-PEREZ; NOVIELLO; HIBBS, 2016; FUJII et al., 2017).

Além da expressão dos receptores de ACh, a expressão da colina acetiltransferase (ChAT) e a produção da acetilcolina por linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas tem sido relatado (REARDON et al., 2013; KAWASHIMA et al., 2015), sugerindo que a acetilcolina sintetizada e liberada pela célula T atua por via autócrina/ parácrina nesses receptores regulando respostas imunes.

Observou-se que *in vitro* a acetilcolina e outros agonistas dos receptores mAChR são capazes de aumentar a capacidade citotóxica dos linfócitos, aumentando os níveis dos segundos mensageiros GMP cíclico (GMPc) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e modular positivamente a síntese de DNA e proliferação (KAWASHIMA; FUJII, 2003). Maslinski em 1989 e Kawashima e Fujii em 2000 reforçam a ideia que o sistema linfocítico colinérgico é capaz de regular a função do sistema imune via AChR acoplado Fosfolipase C. O mecanismo que envolve as funções tanto os mAChR como nAChR tem sido correlacionada com o Ca<sup>2+</sup> (KAWASHIMA; FUJII, 2003). Também relatou-se que a ativação de células T, o estímulo de PKC (proteína cinase C) e PKA (proteína cinase A) aumentam a regulação da síntese de acetilcolina nessas células (FUJII et al., 2017). Em células T citotóxicas, demonstrou-se que a exposição à nicotina modula negativamente o desenvolvimento de memória celular (MASHIMO et al., 2017).

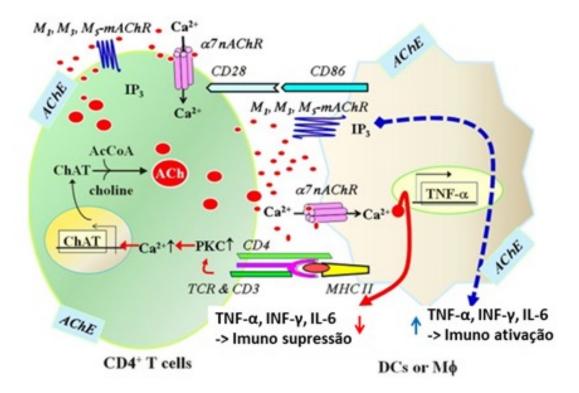
Em relação a células T CD4+ ou T helper (Th), alguns demonstraram que o nAChR está envolvido na diferenciação dessas células em seus diferentes perfis (FUJII et al., 2017). Relatou-se que a nicotina suprime a neuroinflamação por diminuição da resposta Th1 e Th17 (WU et al., 2014). Em um modelo de colite, demonstrou-se que a nicotina pode atuar de forma dúbia (LIU et al., 2014), reduzindo ou aumentando células Th17, dependendo do modelo experimental utilizado (FUJII et al., 2014). Além disso, o tratamento crônico com nicotina pode aumentar a expressão de Tbet, um fator de transcrição específico de Th1, em células T mucosas humanas (WU et al., 2014).

ACh Α estimulação com ou carbacol (CarCh), um agonista muscarínico/nicotínico não específico, aumentou a citotoxicidade dos linfócitos (STROM et al., 1972, 1973, 1974, 1981) e com nicotina houve aumento de GMPc em linfócitos no sangue humano (ILLIANO et al., 1973; HADDOCK et al, 1975; MASTURZO et al, 1985; MASLINSKI et al., 1988; TOMINAGA et al., 1992; GENARO; CREMASCHI; BORDA, 1993; KAWASHIMA; FUJII, 2000). Katz e colaboradores em 1982 mostraram que a atividade da célula NK humana poderia ser modulada com um análogo de GMPc ou com CarCh, e que o aumento induzido por CarCh na atividade citotóxica foi antagonizada pela atropina, uma substância antagonista do receptor muscarínico. Assim, o aumento de GMPc mediado pelo receptor muscarínico pode aumentar a atividade citotóxica. Ademais, o acúmulo de IP<sub>3</sub> foi observado em linfócitos estimulados com ACh, nicotina, CarCh ou oxotremorina (Oxo), um agonista muscarínico específico (TOMINAGA et al., 1992;KAWASHIMA; FUJII, 2000).

A estimulação de AChR em linfócitos levou a aumento de [Ca<sup>+2</sup>] citosólico que gerou ativação de fatores de transcrição reguladores, como *c-fos* e a modulação da função linfocitária (JAIN et al., 1992). O efeito da estimulação de receptores muscarínicos, principalmente M3 e M5 e em menor expressão M1, por Oxo (FUJJI et al., 2017) aumentou a expressão do RNAm de *c-fos* e a liberação de [Ca<sup>+2</sup>]i mediada por IP<sub>3</sub> (MASHIMO et al., 2016; FUJII et al., 2017). Esse efeito foi bloqueado pela atropina, fornecendo evidências de que a estimulação de receptores muscarínicos leva a expressão do gene *c-fos* em linfócitos T e B, o que é consistente com o dado de que a ACh liberada dos linfócitos T desencadeia a sinalização nuclear via receptores muscarínicos e leva a geração de uma reposta efetora (KAWASHIMA; FUJII, 2000; FUJII et al., 2017).

A ACh localizada em linfócitos, a presença de ChAT, e expressão de RNAm que codifica receptores de ACh fornecem evidências claras que a função dos linfócitos também é regulada por um sistema colinérgico extraneuronal (Figura 6). Diante disso, postulou-se que a função imunológica não é apenas regulada pelo sistema de citocinas, mas também está sob o controle de um sistema colinérgico linfóide independente (KAWASHIIMA; FUJII 2000). Adicionalmente, esses dados sugerem que nAChRs e mAChRs atuam de maneira oposta na regulação de respostas inflamatórias do sistema imune (Figura 6).

Figura 6- Sistema colinérgico linfocítico na regulação imunológica.



**Fonte:** Adaptado de Kawashima e cols. 2012. As células T CD4<sup>+</sup>, Células Dendríticas e Macrófagos possuem a maquinaria para síntese, ligação e degradação da acetilcolina. A ativação de células T CD4<sup>+</sup> via TCR e MHC de classe II gera cascata de sinalização de ativação que aumenta os níveis intracelulares de Ca<sup>++</sup> ativando a síntese de ChAT favorecendo a síntese e liberação de acetilcolina, a qual se liga de maneira autócrina e parácrina nessas células gerando respostas opostas a depender da natureza do receptor envolvido.

# 2.4 Manifestações clínicas na infecção por CHIKV

O CHIKV é responsável por uma doença febril acompanhada de vários sintomas (**Tabela 1**), incluindo prurido cutâneo, mialgia, artralgia, e este último podendo persistir por meses ou anos. Adicionalmente, grande parte das pessoas acometidas por essa infecção relatam dores articulares graves, muitas vezes incapacitantes (PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015; BRASIL, 2017).

Os indivíduos infectados com CHIKV são, em sua maioria, sintomáticos. Os primeiros sintomas relatados são febre e artralgia (STAPLES; POWERS; BREIMANET, 2009; AYU et al., 2010; NAKKHARA et al., 2013). A doença febril acima de 38,0 °C aparece de maneira repentina após o período de incubação do vírus (WHO, 2008; WESULA OLIVIA et al., 2015) acompanhada de artralgia, dor nas

costas, dor de cabeça e fadiga (WHO, 2008; DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012; THIBERVILLE et al., 2013). A poliartralgia, geralmente de natureza poliarticular bilateral, é o sintoma mais comum observado na CHIKD afetando principalmente as articulações periféricas como tornozelos, pulsos e falanges, bem como grandes articulações como joelhos e cotovelos (WHO, 2008). Juntamente com outros alfavírus, o CHIKV apresenta como sua característica mais relevante, a capacidade artritogênica (PAL, 2015; WESLUVA et al., 2015). Os sinais e sintomas agudos da infecção por CHIKV geralmente resolvem-se dentro de 1 a 3 semanas, mas a artralgia pode persistir meses ou mesmo anos em alguns pacientes. (CHOW et al., 2011; PETITDEMANGE et al., 2011).

Manifestações cutâneas são relatadas em cerca de 50% dos casos agudos e podem ser edemaciadas ou pruriginosas e geralmente ocorrem nas extremidades do corpo (SIMON et al., 2011; THIBERVILLE et al., 2013). Sintomas gastrointestinais, como diarreia, vômitos, náusea e dor abdominal, ocorrem em alguns casos durante a fase aguda (THIBERVILLE et al., 2013). Ademais, outros sintomas possíveis incluem eritema, astenia, derrame conjuntival, conjuntivite e linfoadenopatia cervical (STAPLES; POWERS; BREIMAN, 2009; STAPLES; FISCHER, 2014).

A fase crônica da doença é caracterizada por variações na intensidade dos sintomas, os quais são menos intensos que na fase aguda. A quantidade de pacientes que apresentam os sinais crônicos da CHIKD após três (3) meses difere de acordo com localização do surto (CHOW et al., 2011; PETITDEMANGE et al., 2015). Poliartralgia e/ou poliartrite são sintomas persistentes característicos dessa fase, afetando tanto as pequenas como as grandes articulações cronicamente. A condição geralmente é grave e leva a sérias limitações de mobilidade nas pessoas afetadas (HOARAU et al., 2010). A poliartralgia tem sido descrita como persistente, com duração de semanas a vários meses e, em alguns casos, até cinco anos, dependendo das populações avaliadas (SISSOKO et al., 2009; MANIMUNDA et al., 2010; SIMON et al., 2011). A persistência da poliartralgia causada por alguns alfavírus, como vírus Semliki Forest (SFV) e o vírus Sindbis (SINV), parece estar associado à persistência de antígenos virais e respostas imunes inflamatórias nas articulações (ATKINSON et al., 1986; HOARAU et al., 2010; LABADIE et al., 2010; SIMON et al., 2011; SILVA; DERMODY, 2017).

Em 2010, Hoarau e colaboradores descreveram a presença de macrófagos com material genético do CHIKV e proteínas virais no tecido sinovial de um paciente com

infecção crônica (HOARAU et al., 2010). Outros estudos demonstraram persistência do CHIKV em órgãos linfóides, fígado, articulações, músculos e macrófagos (LABADIE et al., 2010). A patogênese da artrite reumatoide na CHIKD ainda encontra-se em discussão. Apesar de alguns estudos sugerirem que a infecção viral pode desencadear o início desse distúrbio inflamatório crônico (STAPLES et al., 2009; SCHILTE et al., 2013).

Além das manifestações clínicas descritas acima, a infecção por CHIKV pode levar a manifestações clínicas atípicas. A síndrome de Guillain-Barré (SGB), por exemplo, tem sido associada à infecção por CHIKV (LEBRUN et al., 2009; OEHLER et al., 2015). A SGB compreende polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda de incidência global, em que cerca de dois terços dos casos ocorrem após infecções bacterianas (por exemplo, *Campylobacter jejuni*) (HEIKEMA et al., 2015) ou infecções virais (OEHLER et al., 2015), como por vírus da Dengue (SIMON et al., 2016), vírus Oeste do Nilo (LEIS; STOKIC, 2012), Influenza (CHOI; YEON, 2016), Citomegalovírus (STEGER et al., 2012), vírus da Imunodeficiência Humana (GIRGIN et al., 2014), Epstein-Bar (KIM et al., 2016) e Zika vírus (ROZÉ et al., 2017).

Em surtos mais recentes de infecção por CHIKV, alopecia total ou parcial em cabeça ou corpo foi relatada principalmente em pacientes do sexo feminino e alterações oftalmológicas foram descritas durante a fase crônica (MARTÍNEZ-PULGARÍN et al., 2016; CUNHA; TRINTA, 2017). Nos recém-nascidos, as infecções congênitas podem ser acompanhadas por diferentes sinais clínicos, como febre, falta de apetite, apneia, manifestações cutâneas, edema distal e cerebral, encefalite e hemorragia (GOPAKUMAR; RAMACHANDRAN, 2012; BANDEIRA et al., 2016; LYRA et al., 2016). Em recém-nascidos e crianças, distúrbios cardíacos, gastrointestinais e lesões cutâneas são relatados até dois dias após o início da febre (ERNOULD et al., 2008; SILVA JR et al., 2018). Complicações neurológicas foram relatadas em um surto em 2006 na Ilha de La Réunion e em um surto na Índia (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017) 18 dos 90 casos confirmados de infecção pelo CHIKV foram fatais. 15 das 18 mortes ocorreram em pessoas de 60 anos ou mais (VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017).

Os óbitos por infecção pelo CHIKV anteriormente eram considerados raros. Contudo, esse entendimento mudou desde as últimas epidemias, devido às altas taxas de mortalidade observadas (CHUSRI et al., 2011; BANDEIRA et al., 2016; BRASIL, 2019). Ademais, outras condições médicas envolvidas, como hipertensão, doenças

respiratórias e diabetes mellitus (ECONOMOPOULOU et al., 2009; SISSOKO et al., 2009; TANDALE et al., 2009) podem trazer complicações. Essas complicações podem ainda ser exacerbadas a depender da idade e do estado imunológico dos indivíduos acometidos.

**Tabela 1** – Quadro de sintomas clínicos agudos e crônicos mais prevalentes na doença Chikungunya

FASES DA INFECÇÃO	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
FASE AGUDA	Febre elevada >38°C, poliartralgia intensa, rash cutâneo, cefaleia, fadiga, edema, dor ligamentar, mialgia leve a moderada, dor retro-ocular, calafrios, conjuntivite sem secreção faringite, náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal. Pode haver linfoadenomegalias cervical, retroauricular e inguinal associadas.
FASE CRÔNICA	Acometimento articular persistente ou recidivante nas mesmas articulações atingidas durante a fase aguda, caracterizado por dor com ou sem edema. Limitação de movimento e deformidade, alguns pacientes poderão evoluir com artropatia destrutiva semelhante à artrite psoriática ou reumatoide.

**Fonte:** Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Chikungunya: manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. — Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

## 2.5 Diagnóstico e Tratamento

Os indivíduos acometidos por infecção por arbovírus podem manifestar uma gama de sinais e sintomas clínicos semelhantes (BRITO; CORDEIRO, 2016). Apesar disso, aspectos da sintomatologia podem direcionar o diagnóstico clínico sobre a etiologia viral, principalmente a poliartralgia saliente e prolongada, frequentemente acompanhada de febre elevada, a qual é tipicamente indicativa de Chikungunya. Por outro lado, manifestações hemorrágicas e mialgia são mais comumente relacionadas a infecções por DENV (LEE et al., 2012; BRASIL, 2017; SILVA JR et al., 2018).

Os testes diagnósticos baseiam-se na de detecção do vírus, componentes virais, como antígenos e ácidos nucleicos, ou na detecção de componentes da resposta imune

humana do hospedeiro ao vírus (HUNSPERGER et al., 2014; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). A detecção viral é caracterizada pelo isolamento dos vírus presentes no sangue, soro, plasma ou tecidos do paciente acometido. As amostras biológicas são inoculadas em meios de cultura seletivos, e caso haja o crescimento do vírus, o diagnóstico é considerado positivo. Apesar de altamente específico, o teste exige o uso de laboratório de segurança nível três (3), sendo essa uma exigência que limita seu uso (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015).

A detecção de RNA viral também é um método diagnóstico aplicado. As principais técnicas moleculares utilizadas são o RT-PCR (*Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction*) e o qRT-PCR (*Real Time RT-PCR*). Essas técnicas proporcionam um diagnóstico rápido e sensível, permitem detectar o ácido nucleico viral até, aproximadamente, o oitavo dia após o aparecimento dos sintomas, sendo que o período de maior viremia vai do primeiro ao quinto dia. Esse tipo de diagnóstico é definitivo, porém depende da viremia dos pacientes (PETERSEN et al., 2016; BRASIL, 2017).

A confirmação do diagnóstico também pode ser realizada pela técnica de ELISA. Esse método consiste na detecção de anticorpos IgM e IgG em soro de pacientes infectados por meio de ensaios imuno-adsorventes de captura por ligação de anticorpo. A detecção de infecção por CHIKV utilizando o método de imunoensaio permite a identificação de infecção aguda (detecção de IgM) ou de prévia infecção pelo vírus (detecção de IgG) (REDDY et al., 2012; PRAT et al., 2014; SOH et al., 2016). A IgM pode ser detectada de dois/quatro dias a três meses após o início da infecção, por outro lado a IgG pode ser detectada durante vários anos após a infecção (GRIVARD et al., 2007; PIALOUX et al., 2007; REDDY et al., 2012). No teste de ELISA a detecção de infecção por CHIKV é altamente específica e tem uma alta precisão (JOHNSON et al., 2016).

No momento, ainda não existem medicamentos antivirais para controle da replicação viral, vacinas ou drogas preventivas utilizadas na infecção por CHIKV (STAPLES; FISHER, 2014; ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; SMALLEY et al., 2016). As estratégias terapêuticas são utilizadas para controle dos sintomas, incluindo ingestão abundante de líquidos (JAIN; RAI; CHAKRAVARTI, 2008; WHHO, 2008; KAUR; CHU, 2013). Nesse contexto, o único anti-inflamatório não esteroidal (AINEs) que deve ser utilizado é a dipirona. Além da dipirona, o paracetamol

também é indicado para reduzir a febre e aliviar a artralgia (WHO, 2008; SILVA JR et al., 2018).

Na dor de intensidade leve tanto a dipirona como o paracetamol são bons analgésicos quando utilizados nas doses e intervalos corretos. Em um indivíduo adulto a dose recomendada é de 1 g a intervalos fixos de 6 horas. O paracetamol não deve ultrapassar dose diária de 4 g devido ao risco de hepatotoxicidade (JÓŹWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014; BRITO et al., 2016; BRASIL, 2017). Nos casos de dor moderada, as duas drogas devem ser prescritas conjuntamente (BRASIL, 2017). Os anti-inflamatórios não esteroidais como ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, nimesulida, ácido acetilsalicílico e associações não devem ser utilizados na fase aguda da doença devido ao risco de complicações renais e sangramento. Os corticosteroides são contraindicados na fase aguda (BRASIL, 2017).

O uso de corticoide é recomendado para a doença na fase crônica, se o paciente relatar dor moderada a intensa (BRITO et al., 2016). A medicação padrão para uso oral é a prednisona. No tratamento da dor inflamatória, a dose indicada é 0,5 mg/kg de peso/dia em dose única pela manhã. Para situações de artrite crônica medicamentos antirreumáticos modificadores como: hidroxicloroquina, sulfasalazina ou metotrexato são indicados (THIBERVILLE et al., 2013), sendo que a hidroxicloroquina é a droga de primeira escolha, devido aos seus conhecidos efeitos anti-inflamatórios no controle da artrite e da dor musculoesquelética (BEN-ZVI et al., 2012). Também há potencial ação antiviral (THIBERVILLE et al., 2013), mas principalmente por ser uma droga mais segura quando comparada ao uso de metotrexato a ser prescrita por não especialistas (BRASIL, 2017).

Algumas estratégias atuais de inibição da infecção por CHIKV foram recentemente publicadas por Subudhi e colaboradores (2018). Em suma, entre os medicamentos anti-CHIKV em avaliação, existem os que visam a adsorção e fusão viral, tradução de proteína viral e replicação do genoma, com ênfase na proteína não estrutural viral 2 (nsP2) e maturação de glicoproteínas virais (BRIGHTON, 1984; OZDEN et al., 2008; KHAN et al., 2010; WINTACHAI et al., 2012; LANI et al., 2015; WINTACHAI et al., 2015; SILVA JR et al., 2018).

#### 2.6 Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos e Riparinas

As plantas medicinais são uma rica fonte de metabólitos secundários com interessantes atividades biológicas. Há muitos anos, buscam-se novas drogas com atividade farmacológica. Os produtos naturais, incluindo os derivados de plantas, têm contribuído em grande escala na descoberta de diversas moléculas com atividades biológicas e/ou bioativas (SOARES et al., 2005). O longo caminho de pesquisa na área de produtos naturais como agentes terapêuticos evoluiu para um moderno isolamento de substâncias químicas ativas provenientes de plantas etnofarmacológicas e, na medicina moderna, essas moléculas químicas ainda são cada vez mais as fontes primárias na descoberta precoce de medicamentos (FERREIRA et al., 2011; NUNES et al., 2014).

Um grande número de espécies com grande diversidade e uso medicinal pertence à família Lauraceae, o que levou à crescente exploração de plantas dessa família tornando-a vulnerável a extinção (MARQUES, 2001).

Alcamidas naturais constituem uma classe especial de alcalóides que contém funções amidas, esses metabólitos são pouco representados na natureza (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Algumas atividades biológicas dessas alcamidas são descritas na literatura e foram atribuídas aos extratos do *Aniba riparia* e despertou o interesse na investigação de potencial farmacológico dessas amidas, as quais foram sintetizadas pela primeira vez no antigo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba (LTF-UFPB) e denominadas Riparinas ou Benzoil-Tiraminas, em referência a espécie das quais foram isoladas (BARBOSA-FILHO et al., 1980; BARBOSA-FILHO, 1997; NUNES et al., 2014).

As Riparinas podem ser isoladas ou obtidas sinteticamente. O isolamento das Riparinas tem sido feito a partir de *Aniba riparia* (Nees) Mez. O gênero *Aniba* pertencente à família das Lauraceae e essa planta possui distribuição geográfica delimitada na região da Amazônia Central e Guiana. Esse gênero contém aproximadamente 40 espécies (BARBOSA-FILHO et al.1987; DE CARVALHO et al, 2013; SILVA et al., 2015). O isolamento dessas alcamidas é feito a partir dos frutos imaturos de *A. riparia* e têm se destacado por possuírem importantes e variadas atividades biológicas, as quais se podem citar: Efeitos antinociceptivos - Riparina I (ARAUJO et al., 2009), atividade anti-inflamatória - Riparina II (DE CARVALHO et al., 2013), atividade ansiolítica (MELO et al., 2013), atividade espasmolítica associada à Riparina III (BARBOSA-FILHO et al., 1987; THOMAS et al, 1994; BARBOSA-

FILHO, 1997) e atividade antidepressiva e efeito ansiolítico em camundongos submetidos a estresse crônico associada a Riparina IV (DE CASTRO CHAVES et al., 2019). Alguns compostos análogos sintéticos derivados das Riparinas (riparinas C, D, E, F) também têm demonstrado atividades biológicas, como ação antioxidante e citotóxica (NUNES et al., 2014). A Riparina B tem sido descrita como um composto capaz de inibir a resposta inflamatória sistêmica e estresse oxidativo em camundongos (SANTIAGO et al., 2015) A Riparina A foi associada a redução da resposta inflamatória modulando migração de neutrófilos e inibindo a produção de citocinas proinflamatórias e reduzindo o estresse oxidativo (SILVA et al., 2015).

Figura 7 - Estrutura química da Riparina III

**Fonte:** Elaborado por prof. Dr. José Maria Barbosa Filho. Estrutura química estrutural da Riparina III ou N-(2,6-Dihydroxybenzoyl)-tyramine methyl ether ou (0 Methyl)-N-(2,6 dihydroxy-benzoyl)-tyramine ou N-[8'-(4'-Methoxyphenylethyl)] 2,6 dihydroxybenzoylamide. Classe química: Benzoil-tiramina. Peso Molecular: 287. Fórmula:  $C_{16}H_{17}NO_4$ .

Dentre as atividades biológicas demonstradas pelas Riparinas, a ação antiinflamatória da Riparina II em modelos animais, na qual se observou a diminuição dos níveis de TNF-α e IL-1β (DE CARVALHO et al., 2013), despertou o interesse na investigação de uma possível atividade imunomoduladora anti-inflamatória dessa classe de moléculas na resposta desempenhada pelas células imunes. A Riparina III (**Figura** 7) foi capaz de reverter a contração provocada pela acetilcolina e histamina, bem como com inibição do influxo de Ca<sup>++</sup> no compartimento intracelular e inibição da liberação dos estoques intracelulares de Ca<sup>++</sup> (THOMAS et al., 1994; CASTELO BRANCO et al., 2000; MARQUES et al., 2005), demonstrando sua ação antagônica a acetilcolina nesse modelo experimental. Considerando um teste piloto realizado no início deste estudo, no qual leucócitos foram tratados com as diferentes Riparinas (I, II, III e IV) em diferentes concentrações, demonstrou-se que a Riparina III foi a droga que melhor manteve o perfil de separação de células no gráfico de tamanho por complexidade. Além disso, após o tratamento com essa molécula o número de eventos lidos por amostra foi quantitativamente melhor para análise requerida em relação às outras Riparinas. Diante disso, bem como do possível envolvimento da Riparina III com a ação acetilcolina e da sua similaridade estrutural com a Riparina II, conhecida por possuir atividade anti-inflamatória, optou-se dar continuidade aos estudos com a Riparina III.

Frente à necessidade da elucidação dos mecanismos imunopatológicos por células T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV, até então não descritos completamente, bem como a atividade inflamatória exacerbada observada nessa infecção e o papel regulador da acetilcolina em respostas imunológicas, a hipótese que norteou este estudo foi que as células T CD8<sup>+</sup> e seus mecanismos citotóxicos estariam envolvidos na infecção por CHIKV e que a Riparina III poderia exercer efeito anti-inflamatório na doença. Além disso, a possível atuação da Riparina III agindo em receptores colinérgicos de linfócitos T CD8<sup>+</sup> provenientes de pacientes infectados com CHIKV e indivíduos saudáveis.

#### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar as características fenotípicas de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o papel imunomodulador da Riparina III e a participação de receptores colinérgicos na infecção por CHIKV em humanos.

## 3.2 Objetivos específicos I

- Caracterizar fenotipicamente ex vivo a expressão de células T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica da infecção por CHIKV e ativação dessas células pela expressão de CD69;
- Caracterizar ex vivo os mecanismos de exocitose (CD107A) de proteínas citotóxicas (Granzima B e Perforina) de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;
- Caracterizar ex vivo a produção de citocinas intracelulares inflamatórias (IL-17A e INF-γ) de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;
- Caracterizar *ex vivo* produção da citocina intracelular reguladora IL-10 e seu receptor (IL-10R) de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;
- Caracterizar *ex vivo* expressão de marcadores de morte (PD-1; CD95; CD95L) em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica de infecção.

## 3.3 Objetivos específicos II

- Avaliar citotoxicidade da Riparina III frente a eritrócitos humanos e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs);
- Avaliar modulação da Riparina III na expressão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e a ativação dessas células pela expressão de CD69 em células de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;
- Avaliar modulação da Riparina III em mecanismos de exocitose (CD107A) de proteínas citotóxicas (Granzima B e Perforina) em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;

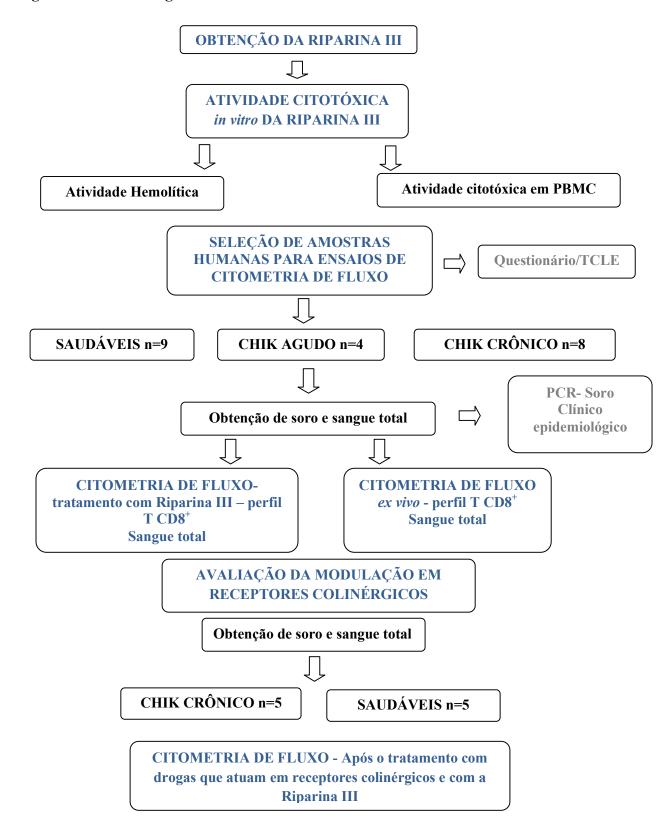
- Avaliar modulação da Riparina III na expressão de citocinas intracelulares inflamatórias (IL-17A e INF-γ), em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;
- Avaliar modulação da Riparina III na expressão da citocina intracelular reguladora IL-10 e seu receptor (IL-10R) em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;
- Avaliar modulação da Riparina III na expressão de marcadores de morte (PD-1;
   CD95; CD95L) em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica de infecção.

### 3.4 Objetivos específicos III

- Investigar a participação de receptores colinérgicos na imunomodulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, e o possível papel da Riparina III agindo nesses receptores em pacientes em fase crônica de infecção por CHIKV, na expressão de:
  - o Marcador de ativação celular CD69
  - Mecanismos de exocitose (CD107A) de proteínas citotóxicas (Granzima B e Perforina)
  - Expressão de citocinas intracelulares IL-10. IL17A e INF-γ
  - o Expressão de marcador de morte PD-1

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### Fluxograma de Metodologia



#### 4.1 Obtenção da Riparina III

A Riparina III foi gentilmente cedida pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho. E todo o processo de obtenção foi realizado por seus alunos no laboratório do mesmo.

O método de preparação da riparina III baseou-se na reação de Schotten-Baumann, método clássico de obtenção de amidas a partir de cloretos de benzoíla (gerados a partir do dispendioso e tóxico cloreto de tionila) com as correspondentes tiraminas. Nesta proposta, utilizaram-se ésteres do tipo benzoatos para obtenção da riparina III obtendo-se bons rendimentos. Logo, a obtenção da riparina III por essa proposta, consistiu em uma rota simples utilizando éster do tipo benzoato, evitando a preparação do cloreto de benzoíla a partir do cloreto de tionila, tornando-o um método mais limpo e menos oneroso.

#### 4.1.1 Preparação da Riparina III

O método de obtenção da riparina III consistiu em duas etapas: (I) preparação do éster metílico do ácido 2,6-dihidrobenzóico e (II) pela reação de Schotten-Baumann.

#### Etapa I

Ácido 2,6-dihidroxibenzóico

Éster metílico do ácido 2,6-dihidroxibenzóico

Uma solução de ácido 2,6-dihidroxibenzoico (5 g) e metanol (25 mL) e 1,5mL de ácido sulfúrico concentrado mantida sob refluxo por 16h. Em seguida, a mistura reacional foi neutralizada com bicarbonato de sódio sob refrigeração e extraídas com acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas e extraídas com solução saturada de cloreto de sódio e secas com sulfato de sódio anidro. Após filtração foi concentrada em rotaevaporador. Obteve-se um sólido de coloração rósea de massa total 1,08 g, p.f. 64,4-66,7°C com rendimento de 23%.

#### Etapa II

Para a obtenção da RIPARINA III utilizou-se o equivalente de 1:2 mol do éster metílico do ácido 2,6-dihidroxibenzoico (0,10 g) e de *O*-metiltiramina (0,18 mL) e 10mL de diclorometano. A mistura reacional foi mantida em agitação magnética em temperatura ambiente (30°C) por 4hrs. A purificação foi realizada através de cromatografia em coluna (2,5 x 23cm) utilizando sílica flash desenvolvida em um sistema crescente de polaridade hexano: diclorometano: metanol. Obteve-se 52,8mg de um sólido amarelo com rendimento de 30%.

#### 4.2 Atividade citotóxica da Riparina III

#### 4.2.1 Atividade hemolítica

Na avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos humanos de indivíduos saudáveis coletados com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) (n=9). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 μL de tampão fosfato salino (PBS), ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida foi adicionada a Riparina III nas concentrações de 1360 μM, 680 μM, 340 μM, 170 μM, 85 μM, 43,52 μM; 21,76 μM e 10,88 μM diluídos num volume de 20 μL de PBS. Logo após, os eppendorfs foram incubados durante 1 hora a 37° C e a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 112G por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria a um comprimento de onda de 550 nm para quantificar a atividade hemolítica. A ausência 0% de hemólise (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. O experimento foi

realizado em duplicata em três ensaios independentes. O resultado foi expresso em porcentagem de hemólise. A porcentagem de hemólise em cada tratamento foi determinada segundo Lima et al., (2015) pela seguinte fórmula:

$$\mbox{Hem\'olise (\%)} = \frac{\mbox{Abs. do grupo tratado} - \mbox{Abs. do controle negativo}}{\mbox{Abs. do controle positivo} - \mbox{Abs. do controle negativo}} \; x \; \mbox{100}$$

# 4.2.2 Ensaio de citotoxicidade da Riparina III pelo método de MTT utilizando PBMC (células mononucleares do sangue periférico).

Para obtenção das células mononucleares do sague periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis utilizou-se tubos com o anticoagulante heparina. Coletou-se 4mL de sangue total de indivíduos saudáveis (n=6) e dilui-se o sangue em mesmo volume de PBS. Em um tubo Falcon estéril foi adicionado 4 mL de FICOLL Histopaque<sup>®</sup> 1077 (solução estéril de polissacarose e diatrizoato de sódio a uma densidade de 1,077 g/mL). O sangue coletado foi vertido lentamente no tubo com FICOLL. Em seguida centrifugou-se a 200G, por 40 minutos, à temperatura ambiente (25°C). Após a centrifugação coletou-se o anel de PBMC e transferiu-se para um tubo FALCON de 50 mL estéril. Com tampão fosfato salino (PBS) completou-se o volume do tubo FALCON até 45 mL para lavagem das células, sendo realizada outra centrifugação a 200G por 10 minutos a 4°C. As plaquetas foram separadas do PBMC por subsequentes lavagens. Posteriormente foi desprezado o sobrenadante, desprendido o pellet e repetiu-se a lavagem por 2 vezes nas mesmas condições. Em seguida as células foram resuspensas em 1mL em RPMI suplementado com L-glutamina e 10% de SBF (Soro Bovino Fetal). Logo após, diluiu-se as células na proporção 1:20 em corante Azul de Tripan 0,4% (190 μL de célula + 10 μL de azul de tripan) para contagem em câmera de Neubauer e determinação do número de células viáveis na suspensão celular (MACIEL et al., 2014). Após contagem, plaqueou se as PBMC em uma contagem de 2,5 x 10<sup>5</sup> células /mL e adicionou-se a Riparina III nas concentrações de 34, 85, 170, 340 µM e completou-se o volume do poço até de 200 μL com meio RPMI e incubou-se durante 16 horas em uma temperatura de 37°C 5% de CO<sub>2</sub>.

Ao final da incubação adicionou-se 10μL de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina] diluído em PBS a uma concentração final de 5 mg/mL.

Em seguida incubou-se a placa por 4h em estufa com 5% de CO2 a 37°C e após esse tempo adicionou-se 50µL SDS 10% (Docecil Sulfato de Sódio) e incubou-se novamente no período de overnight para dissolução do formazan (**Figura 8**) e por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa (Biotek modelo ELx800).

O controle negativo foi realizado com meio RPMI suplementado e meio RPMI com 0,5% de DMSO, considerado como 100% de viabilidade das PBMCs e os resultados foram expressos em % de viabilidade celular.

Br NADH NAD+

Desidrogenase mitocondrial

N-NH

N-NH

N-NH

N-NH

CH<sub>3</sub>

CH<sub>3</sub>

MTT

Formazan

Figura 8 - Reação de redução do MTT a formazan

**Fonte:** MAGALHÃES; THÁ; LEME. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Colombo, PR: Embrapa, 2018. P.3. (Comunicado técnico, 427).

### 4.3 Seleção de amostras humanas para ensaios de citometria de fluxo

Para realização deste estudo foram selecionados indivíduos diagnosticados por profissionais médicos apresentando sinais e sintomas compatíveis com infecção por Chikungunya provenientes do estado da Paraíba (PB-Brasil). Pacientes em fase aguda de infecção (n=4) foram selecionados entre 2 e 7 dias do início do aparecimento dos sinais e sintomas, os quais foram, febre alta ≥ 38°C, edema, poliartralgia e mialgia, compatíveis com essa fase da infecção.

Considerando que os pacientes com infecção crônica são caracterizados por recidivas e flutuações no aparecimento dos sintomas artrálgicos que podem persistir por meses ou anos (CHOW et al., 2011; PETITDEMANGE; WALQUIER; VIELLARD, 2015), os pacientes em fase crônica de infecção (n=8) com no mínimo 6 meses e até 12 meses após o início dos sintomas agudos e permanência dos sintomas articulares, principalmente poliartralgia e edema, foram selecionados para esse grupo. Os

indivíduos saudáveis (n=9), sem infecções prévias por Zika vírus (ZIKV), vírus da dengue (DENV) ou CHIKV, sem doenças crônicas ou uso recente e crônico de medicamentos foram selecionados e enquadrados no grupo dos controles saudáveis.

Pacientes com doenças crônicas anteriores, tabagistas, pessoas em uso crônico de álcool ou medicamentos, gestantes, lactantes e menores de 18 anos foram excluídas deste estudo. Para segunda parte do estudo, pacientes com infecção crônica (n=5) e indivíduos saudáveis (n=5) foram selecionados obedecendo aos mesmos critérios descritos acima.

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP - CAAE: 59833416.6.0000.5183) sob o título: Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue (ANEXO I). A participação nesta pesquisa foi de forma voluntária, os indivíduos envolvidos foram esclarecidos sobre o objetivo e importância do estudo e assinaram o termo de consentimento esclarecido TCLE (ANEXO II).

#### 4.4 Amostras clínicas

As amostras sanguíneas utilizadas nesse estudo foram provenientes do Hospital Materno Infantil João Marsicano – Bayeux, Unidade de Pronto Atendimento do Cristo Redentor- João Pessoa (UPA-Cristo) e do Hospital Universitário Lauro Wanderley-HU- João Pessoa-PB. Todos os indivíduos foram submetidos ao questionário da pesquisa, o qual dispõe de informações sobre os dados do paciente, tais como número e ficha de identificação, além dos sintomas e sinais relatados por parte dos pacientes (ANEXO III).

As amostras coletadas foram processadas para obtenção de soro e sangue total no Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (João pessoa – PB/Brasil) visando a tipagem viral por métodos moleculares (qRT-PCR) em colaboração com o Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Natal - RN/Brasil). As amostras foram coletadas em tubos heparinizados e sem anticoagulante. Em fluxo laminar estéril 1mL de amostras de soro (tubo sem anticoagulante) e sangue total (tubo heparinizado) foram transferidas para tubos tipo *eppendorfs* estéreis e congelados em freezer -20°C overnight, seguido do freezer -80°C no dia posterior, sendo assim mantidas até o momento de sua utilização. Todas as amostras foram associadas a fichas de identificação e 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). Em adição, amostras de sangue total periférico em tubos heparinizados foram coletadas desses pacientes para realização de análise de células T CD8<sup>+</sup> e seus fenótipos pela técnica de citometria de fluxo.

# 4.5 Extração do RNA viral e Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya

O RNA viral das amostras de soro e sangue foi extraído através do QIAmp Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, EUA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, para a realização da técnica de q-PCR. O protocolo da PCR em tempo real utilizou a sonda TaqMan® para a identificação do vírus da chikungunya, baseado no protocolo proposto por Lanciotti et al., (2007). Para tal, uma mistura de reagentes descritos na tabela 2 foi utilizada, sendo obtido um volume final de 20μl, do mix dos reagentes e RNA, por tubo. Esses tubos foram transferidos para o termociclador de qPCR e aplaca foi submetida aos parâmetros de termociclagem: (95°C por 20 minutos)-transcrição reversa; (95°C por 3 minutos)- Inativação da transcriptase reversa; (95°C por 3 minutos)- desnaturação do DNA; (60°C por 30 minutos)- Anelamento, por 40 ciclos subsequentes.

**Tabela 2**. Reagentes e sequência para realização da transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya.

Reagentes	Sequência	μl/tubo
TaqMan FAST Virus 1 Step Master Mix		2,5
Primer CHIKV 6856 F	5' TCACTCCCTGTTGGACTTGATAGA 3'	0,4
Primer CHIKV 6981 R	5' TTGACGAACAGAGTTAGGAACATACC 3'	0,4
Sonda CHIKV 6919 P	FAM 5' AGGTACGCGCTTCAAGTTCGGCG 3'	0,4
$dH_2O$		11,3
RNA		5

Fonte: GOMES, 2016.

#### 4.6 Obtenção de leucócitos para realização da citometria de fluxo

Utilizou-se cerca de 4mL de sangue heparinizado para obtenção dos leucócitos de pacientes com Chikungunya em fase aguda (n=4), em fase crônica (n=8) e indivíduos saudáveis (n=9). Em tubo Falcon de 15mL colocou-se o 2mL de sangue total junto com 12mL de solução de lise (bicarbonato de amônio e cloreto de amônio), para lisar as hemácias e obter-se leucócitos, o qual foi vortezado 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 vortezado e completado com 12 mL de PBS. O procedimento de lavagem foi realizado até 2 vezes para retirada completa de hemácias lisadas. Após a última lavagem o pellet foi resuspenso em 500µL de RPMI suplementado e as células foram submetidas ou não ao tratamento com as Riparina III seguida da realização do protocolo de marcação por citometria de fluxo e posterior leitura no equipamento FACS canto II. Na segunda parte dos experimentos, na qual os leucócitos foram tratados com as diferentes drogas que atuam sobre receptores colinérgicos, foi realizada a obtenção de sangue total de pacientes com Chikungunya em fase crônica (n=5) e indivíduos saudáveis (n=5) sendo essa amostra sanguínea submetida a igual procedimento para obtenção dos leucócitos e tratamento com as drogas como será descrito posteriormente.

## 4.7 Drogas utilizadas

A alcamida Riparina III foi gentilmente cedida pelo prof. Dr. José Barbosa Filho. Para realização dos ensaios de avaliação da imunomodulação, o qual permite avaliar as mudanças fenotípicas de expressão de determinados marcadores celulares, Riparina III (PM 287) foi pesada (20mg) e diluída em um (1) mL de dimetilsulfóxido [DMSO (CH3)2SO – Vetec, Brasil] sob agitação em Vórtex (DaiggerVortex Genie 2, A. Daigger & Co., Inc), obtendo-se assim uma solução estoque de 20 mg/ml ou 7mM. Antes de cada experimento, foram feitas soluções de trabalho de 2 mg/ml ou 0,7mM, através da diluição da solução estoque no RPMI 1640 suplementado com L-glutamina e 10% de SBF. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,5%.

Para realização dos ensaios de investigação de imunomodulação frente a receptores colinérgicos utilizou-se PNU-282987 solubilizado em dimetilsulfóxido [DMSO (CH3)2SO – Vetec, Brasil] - 5μM (Agonista nicotínico), MLA-

Metilicaconitina solubilizado em água destilada estéril - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina solubilizada em etanol - 10μM (Antagonista muscarínico), além da Riparina III - 34μM. As concentrações PNU, Atropina e MLA foram baseadas na ação destas em seus respectivos alvos. A concentração da Riparina III foi baseada em testes prévios e na ação dessa molécula na antagonização do efeito da acetilcolina descrito por Thomas et al., (1994).

### 4.8 Anticorpos monoclonais fluorescentes

Para realização dos ensaios de citometria utilizou-se o citômetro de fluxo FACS canto II. Os anticorpos monoclonais, com seus respectivos canais de fluorescência que foram utilizados para as marcações extracelulares de membrana foram: Anti-human anti-CD8 (PeCy5), anti-CD95 (FITC), anti-CD95L (PE), anti-CD107A (PE), anti-IL-10R (PE), anti-CD69 (PE). Para as marcações intracelulares foram utilizados os anticorpos: anti-IL-10 (PE), anti-INF-γ (PE), anti-IL-17A (PE), anti-GRANZIMA-B (FITC) e anti-PERFORINA (PE). Também foi utilizado controles de Isotipo IgG (FITC) e IgG (PE). Todos os anticorpos utilizados foram adquiridos das companhias BD LifeSciences (CA, USA) ou Ebioscience (San Diego, CA, USA).

# 4.9 Tratamento de leucócitos de pacientes com Chikungunya aguda e crônica e indivíduos saudáveis com a Riparina III.

Os leucócitos obtidos do sangue periférico dos pacientes com Chikungunya aguda (n=4) e crônica (n=8) e indivíduos saudáveis (n=9) foram tratados durante 16 horas com Riparina III, esse tempo de tratamento foi baseado na cinética de produção de citocinas intracelulares por células T descrita por ANTAS et al., (2004), ou foram submetidos a marcação com anticorpos *ex vivo*. Para o ensaio com leucócitos provenientes de pacientes em fase aguda, crônica e indivíduos saudáveis *ex vivo* ou tratados apenas com a Riparina III utilizou-se o painel de marcação conforme **tabela 3** abaixo:

**Tabela 3-** Painel de marcação com anticorpos monoclonais para análise de células T CD8<sup>+</sup> e seus diferentes fenótipos de expressão.

FITC	PE	PECy5
CD95	CD95L	CD8
-	CD107A	CD8
-	IL-10R	CD8
-	CD69	CD8
-	PD1	CD8
-	IL-10	CD8
INTERFERON γ	IL-17	CD8
GRANZIMA B	PERFORINA	CD8

**Fonte:** Elaboração própria. Leucócitos obtidos de pacientes em fase aguda e crônica de infecção por CHIKV e indivíduos saudáveis *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III (34μM) foram marcados de acordo com o protocolo de citometria de fluxo com os anticorpos monoclonais descritos acima. Em cada canal (FITC, PE e PECy5) o anticorpo monoclonal é excitado em um comprimento de onda específico.

# 4.10 Tratamento com agonista e antagonista de receptores colinérgicos e antagonista de receptores muscarínicos em leucócitos de pacientes com Chikungunya crônica e indivíduos saudáveis.

Os leucócitos obtidos do sangue periférico dos pacientes com CHIKD crônica (n=5) e indivíduos saudáveis (n=5) foram submetidos ao tratamento com as seguintes drogas em diferentes combinações: PNU-282987- 5µM (Agonista nicotínico), MLA-Metilicaconitina - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10µM (Antagonista muscarínico) e Riparina III - 34µM (Droga investigada). No tempo 0 tratou-se os leucócitos com os agonistas e antagonistas conforme **figura 9** e após 30 minutos, tempo suficiente para ligação dessas drogas em seus alvos, em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> foi adicionado a Riparina III durante 16 horas.

Figura 9- Esquema de tratamento com drogas e marcação com anticorpos

FITC	PE	PECy5	Nº do poço na placa
x	CD107a	CD8	1
х	CD69	CD8	2
ж	PD1	CD8	3
x	IL10	CD8	4
INF y	IL17	CD8	5
Granzima B	Perforina	CD8	6
IgG	IgG	x	7
х	x	x	8

			1	2	3	4	5	6	7	8
		FITC	x	х	х	x	INF y	Granzima B	IgG	х
Sem Tratamento	A	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	х	x
111111111111111111111111111111111111111		FITC	x	х	x	x	INF y	Granzima B	IgG	x
Riparina	В	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
		FITC	х	х	х	x	INF y	Granzima B	IgG	x
Atropina	C	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
100.000		FITC	x	х	x	x	INF y	Granzima B	IgG	x
MLA	D	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
1010101010101010101011		FITC	х	х	x	x	INF y	Granzima B	IgG	x
MLA+Riparina	E	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
101101111111111111111111111111111111111		FITC	x	x	x	x	INF y	Granzima B	IgG	x
Atropina+Riparina	F	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	х
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
		FITC	x	x	x	x	INF y	Granzima B	IgG	x
Atropina+MLA+Riparina	G	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
10.70		FITC	ж	ж	ж	х	INF y	Granzima B	IgG	x
PNU	H	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
0000000000		FITC	ж	ж	ж	х	INF y	Granzima B	IgG	x
MLA+PNU	I	PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x

**Fonte:** Elaboração própria. Configuração do esquema de tratamento dos leucócitos com as diferentes combinações de drogas utilizadas. Nas linhas horizontais de A até I realizou-se o tratamento com as drogas respectivas, sendo adicionados os agonistas e antagonistas no tempo 0min e a Riparina III no tempo 30min. As células tratadas e sem tratamento foram marcadas com os anticorpos de acordo com as combinações descritas na tabela azul e na placa. Todas as células foram marcadas com todos os anticorpos descritos.

Após esse tempo foi realizado o protocolo de marcação com citometria de fluxo. Essas manobras farmacológicas permitiram avaliar se houve mudanças fenotípicas apresentadas por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos com CHIKD crônica e indivíduos saudáveis, no que diz respeito ao bloqueio e estímulo em receptores colinérgicos nicotínicos e bloqueio em receptores muscarínicos. Para o ensaio com essas drogas foram utilizadas células provenientes de pacientes em fase crônica e indivíduos saudáveis tratados ou não e utilizou-se o painel de marcação conforme **tabela 4**.

**Tabela 4-** Painel de marcação com anticorpos monoclonais para análise de células T CD8<sup>+</sup> e seus diferentes fenótipos de expressão após o tratamento com as diferentes drogas utilizadas.

FITC	PE	PECy5
-	CD107A	CD8
-	CD69	CD8
-	PD1	CD8
-	IL-10	CD8
INTERFERON γ	IL-17	CD8
GRANZIMA B	PERFORINA	CD8

**Fonte:** Elaboração própria. Leucócitos obtidos de pacientes em fase crônica de infecção por CHIKV e indivíduos saudáveis após o tratamento com a droga teste Riparina III (34μM), PNU-282987- 5μM (Agonista nicotínico), MLA - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10μM (Antagonista muscarínico) em diferentes combinações foram marcados de acordo com o protocolo de citometria de fluxo com os anticorpos monoclonais descritos acima. Em cada canal (FITC, PE e PECy5) o anticorpo monoclonal é excitado em um comprimento de onda específico.

# 4.11 Protocolo de marcação com anticorpos monoclonais de leucócitos *ex vivo* e após o tratamento com as drogas em estudo.

Utilizando uma placa estéril de 96 poços adicionou-se em cada poço 25μL de leucócitos (2,5 x 10<sup>5</sup> células / mL) em seguida realizou-se ou não o tratamento com drogas em estudo nos diferentes tempos de tratamento já descritos. Após os tempos de incubação respectivos, para os poços que foram realizadas marcações intracelulares, foi adicionado 10μL de brefeldina (1mg/ml), 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 completou-se o volume do poço para 200 μL de RPMI suplementado com L-glutamina e 10% de SBF. A placa foi incubada

em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por quatro horas. Após esse tempo, retirou-se a placa da estufa e centrifugou-se por 8 minutos (1300 rpm, 4°C). Desprezou-se o sobrenadante e as células foram suspensas por agitação em vórtex. Em sequência foram adicionados os anticorpos marcadores de membrana (extracelulares). 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 desprezou-se o sobrenadante vertendo a placa e as células foram suspensas através de agitação. Adicionou-se 100μL de PBS e 100μL de formaldeído 4% em cada poço para fixação das marcações realizadas e o período de incubação foi de 20 minutos a temperatura ambiente.

Logo após, centrifugou-se a placa por 8 minutos (1300rpm, 4°C), desprezou-se sobrenadante e resuspendeu-se as células. Em seguida, lavaram-se as células com 150μL de PBS (centrifugou-se, desprezou-se o sobrenadante e resuspendeu-se as células). Foi adicionado um tampão de permeabilização celular através da adição de 150μL de PB (Permeabilization Buffer- solução de saponina 0,5%), para permitir a entrada dos anticorpos intracelulares nas células, e incubou-se a placa por 10 minutos a temperatura ambiente.

Em sequência, foram adicionados aos poços os anticorpos intracelulares e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, centrifugou-se (8 minutos, 1300rpm, 4°C) a mesma e o sobrenadante foi desprezado e placa agitada para suspensão das células. As células foram lavadas com 150μL de Permeabilization Buffer. Por fim, ao desprezar-se o sobrenadante e agitar a placa, as células foram diluídas em 200μL PBS e agitando-se levemente com a pipeta de forma a suspender as células transferiu-se todo conteúdo do poço para o tubo de leitura de citometria de fluxo. As células foram mantidas a 4° C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até a leitura no citômetro.

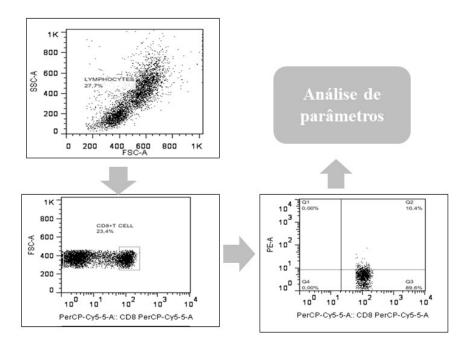
## 4.12 Citometria de fluxo

Os painéis de marcações celulares realizados com anticorpos monoclonais foram avaliados em citômetro de fluxo – FACS cantoII (Becton & Dickinson). Durante o processo de aquisição de dados foram obtidos pelo menos 50.000 eventos por amostra. A análise de todos os dados foi realizada pelo meio do Flowjo (Tree Star).

# 4.13 Estratégia de análise de células T CD8<sup>+</sup> e respectivos marcadores avaliados.

Para analise dos parâmetros avaliados fez-se uma seleção na região de linfócitos, denominada "Gate", no gráfico de tamanho x granulosidade ou tamanho x complexidade (SSC-A x FSC-A). Em seguida selecionou-se o gate de linfócitos e dentro dessa população acessou-se a subpopulação e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (**Figura 8**) e avaliou-se a expressão de todos os marcadores e citocinas intracelulares que foram investigados na análise.

**Figura 10**– Estratégia de Análise de Células T CD8<sup>+</sup>.



**Fonte:** Elaboração própria. As células foram processadas por citometria de fluxo imediatamente (sem tratamento) ou foram previamente tratadas com as drogas testes e Riparina III ( $34\mu M$ ) e analisadas por no programa de análise *flowjo*. Gráficos de pontos representativos mostram a porcentagem de linfócitos e em seguida de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e expressão de CD69 em células T CD8<sup>+</sup>.

#### 4.14 Análise estatística

Para realização da análise estatística, foi utilizado o software GraphPad Prism (Versão 5.01, Graphpad Software, Inc) (SAS Institute Inc.). Para análise comparativa entre os diferentes grupos foram utilizados o teste não paramétrico Mann-Whitney para avaliação de significância e os resultados foram expressos em teste t'student não pareado. A análise comparativa entre os dados obtidos dos experimentos envolvendo os receptores colinérgicos foram realizadas comparações entre os grupos pela análise de variância (ANOVA) One-way seguida pelo pós-teste de Tukey. Dentre os dados obtidos e avaliados apenas os valores de P < 0.05 foram considerados significativos.

#### **5. RESULTADOS**

Os itens 5.1 a 5.9 referem-se aos resultados obtidos a partir dos experimentos realizados de acordo com os objetivos específicos I, os quais visaram avaliar as características fenotípicas de expressão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV, e objetivos específicos II, que visaram avaliar a citotoxicidade da Riparina III frente a eritrócitos humanos e PBMC e a imunomodulação dessa molécula em linfócitos T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV.

#### 5.1 Avaliação da citotoxicidade da Riparina III frente a eritrócitos humanos

A citotoxicidade frente a eritrócitos humanos foi avaliada *in vitro* e o resultado está descrito na **tabela 5**. Os ensaios de atividade hemolítica demonstraram que a Riparina III não possui toxicidade frente aos eritrócitos humanos. A Riparina III nas concentrações avaliadas não alterou a viabilidade dessas células.

Tabela 5- Toxicidade da Riparina III frente a eritrócitos humanos in vitro

Soluções	Porcentagem de hemólise
Água destilada	Controle (+) 100%
Tampão Fosfato Salino (PBS)	Controle (–) 0%
Riparina III (10,88 μM)	0 %
Riparina III (21,76 μM)	0%
Riparina III (43,52 μM)	0%
Riparina III (85 μM)	0%
Riparina III (170 μM)	0%
Riparina III (340 μM)	0%
Riparina III (680 μM)	0%
Riparina III (1360 μM)	0%

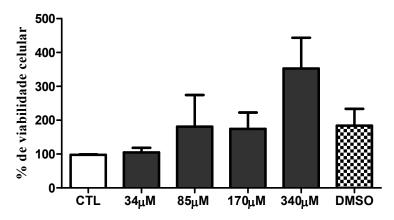
**Fonte:** Elaboração própria. Os valores representam a média da % de hemólise calculada com base em três experimentos independentes.

# 5.2 Avaliação da citotoxicidade da Riparina III frente a células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

A avaliação da citotoxicidade da Riparina III em PBMC foi realizada pelo método de MTT, o qual é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Enzimas desidrogenases mitocondriais e citoplasmáticas presentes apenas em células metabolicamente viáveis clivam o anel de tetrazólio e transformam o MTT de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan.

Conforme representado no **gráfico 1,** a citotoxicidade da Riparina III sobre as células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) foi avaliada nas concentrações de 34, 85, 170 e 340 µM. Em todas as concentrações avaliadas não demonstrou-se citotoxicidade, ou seja, não houve alteração da viabilidade das células tratadas com a Riparina III. O controle negativo apenas RPMI (CTL) e o controle 0,5% de DMSO em meio RPMI (DMSO) representam 0% de citotoxicidade e 100% de viabilidade celular. Não houve diferença significante entre os controles e os tratamentos com a Riparina III. Demonstrando sua confiabilidade *in vitro*.

**Gráfico 1**- Avaliação da viabilidade de células mononucleares do sangue periférico frente a diferentes concentrações da Riparina III.



**Fonte:** Elaboração própria. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram submetidas ao contato com a Riparina III em diferentes concentrações a 37°C 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h. A leitura em espectrofotômetro em absorbância de 540nm. Gráfico representa a média ± erro padrão da média pela análise de variância (ANOVA) One-way seguida pelo pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

## 5.3 Dados demográficos e clínicos

Nas tabelas abaixo (**Tabelas 6, 7 e 8**) estão descritos os pacientes avaliados, idade, sexo, descrição e tempo de início dos sintomas.

Tabela 6. Dados demográficos e clínicos do grupo controle (Indivíduos saudáveis)

Código	Idade	Sexo	Tempo de início dos sintomas	Sinais e Sintomas
ARB CTL 1	50	F	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 2	51	F	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 4	51	F	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 5	31	M	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 6	25	F	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 8	26	F	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 9	27	F	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 10	25	M	-	Indivíduo Saudável
ARB CTL 11	30	M	-	Indivíduo Saudável

Fonte: Elaboração Própria. A tabela demonstra a idade, o sexo, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o sexo Feminino e M o sexo Masculino.

Tabela 7. Dados demográficos e clínicos do grupo Chikungunya Aguda.

Código	Idade	Sexo	Tempo de início dos sintomas (Dias)	Sinais e Sintomas
ARB02	19 anos	M	2	Febre (> 38°C), cefaleia, dor nas costas, edema e calafrios.
ARB12	Não Informado	M	5	Febre (39.2°C), cefaleia, vômito, exantema, mialgia e artralgia.
ARB 35	27 anos	M	2	Febre (39.5°C), artralgia, cefaleia, hipertrofia ganglionar, dor retro orbital.
ARB 38	Não informado	F	5	Febre (40°C); mialgia, artralgia, cefaleia, hipertrofia ganglionar.

Fonte: Elaboração própria. A tabela demonstra a idade, o sexo, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o sexo Feminino e M o sexo Masculino.

Tabela 8. Dados demográficos e clínicos do grupo Chikungunya Crônica.

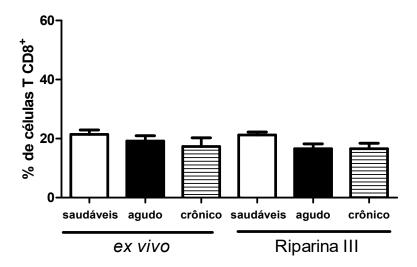
Código	Idade	Sexo	Tempo de início dos sintomas (Meses)	Sinais e Sintomas
ARB 18	33	F	10	Edema frequente e artralgia e fadiga pós- esforço.
ARB 19	27	F	6	Artralgia frequente.
ARB 20	31	F	7	Artralgia frequente.
ARB 27	21	M	8	Artralgia e edema.
ARB 37	50	F	9	Artralgia, edema, cefaleia e mialgia.
ARB 41	37	F	8	Artralgia.
ARB 42	30	F	12	Artralgia.
ARB 43	33	F	8	Artralgia

Fonte: Elaboração própria. A tabela demonstra a idade, o sexo, o tempo do início dos sintomas e os sinais e sintomas do grupo estudado. F representa o gênero Feminino e M o gênero Masculino.

# 5.4 Avaliação do perfil fenotípico de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

O primeiro parâmetro avaliado foi a porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Nenhuma alteração foi observada na expressão dessas células em indivíduos infectados com CHIKV em nenhuma das fases da doença (**Gráfico 2**), quando se comparou com indivíduos saudáveis *ex vivo*. O tratamento com a Riparina III também não foi capaz de alterar a porcentagem dessas células.

**Gráfico 2** - Medida da porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

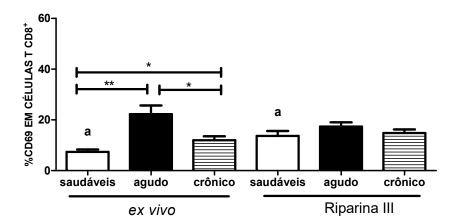


**Fonte:** DIAS, 2019. O gráfico demonstra a % das células T CD8<sup>+</sup> *ex vivo* e tratadas com  $34\mu M$  Riparina III. Células provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

# 5.5 Expressão do perfil fenotípico de ativação celular (marcador extracelular CD69) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e de pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

O marcador extracelular de ativação CD69 foi avaliado e demonstrou-se que houve um aumento da expressão desse marcador em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados com CHIKV tanto na fase aguda quanto na fase crônica em relação aos indivíduos saudáveis *ex vivo* (**Gráfico 3**). Em relação à imunomodulação provocada pela Riparina III demonstrou-se um aumento da expressão desse marcador de ativação em células dos indivíduos saudáveis tratadas em relação aos *ex vivo*.

**Gráfico 3** - Expressão de CD69 em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.

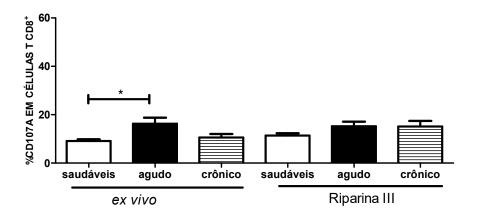


**Fonte:** DIAS, 2019. Expressão CD69 em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Letras representam diferenças significativas entre o mesmo grupo (*ex vivo* e Riparina III). Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) e (a) representa p <0,05; (\*\*) representa p <0,005.

5.6 Expressão do perfil fenotípico de mecanismos de exocitose (CD107A) de proteínas citotóxicas (Granzima B e Perforina) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

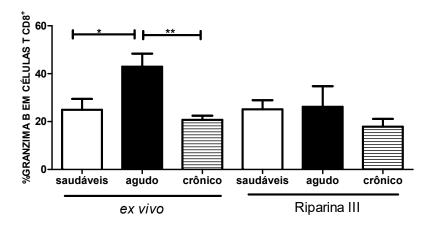
A expressão da molécula CD107a é um importante parâmetro para a avaliação da formação de sinapses citotóxicas e medeia a exocitose da Granzima B. Demonstrouse que a expressão dessa molécula foi regulada positivamente (**Gráfico 4**) em pacientes infectados com o CHIKV em fase aguda em relação a indivíduos saudáveis *ex vivo*. De maneira semelhante, observou-se que houve um aumento na expressão de Granzima B (**Gráfico 5**) em pacientes na fase aguda em relação aos indivíduos saudáveis, porém uma diminuição da expressão nas células dos pacientes na fase crônica em relação a fase aguda *ex vivo*. A expressão da proteína citotóxica Perforina foi modulada positivamente em T CD8<sup>+</sup> provenientes da fase aguda em relação aos indivíduos saudáveis *ex vivo* (**Gráfico 6**). A Riparina III não foi capaz de modular a expressão desses marcadores de mecanismos de exocitose em nenhum dos grupos avaliados.

**Gráfico 4** - Expressão de CD107A em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



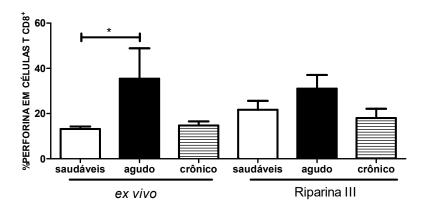
**Fonte:** DIAS, 2019. Expressão CD107A em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com  $34\mu M$  dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) representa p <0,05.

**Gráfico 5** – Produção de Granzima B em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



Fonte: DIAS, 2019. Produção de Granzima B em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34µM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) representa p <0,05. (\*\*) e representa p <0,005.

**Gráfico 6** – Produção de Perforina em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



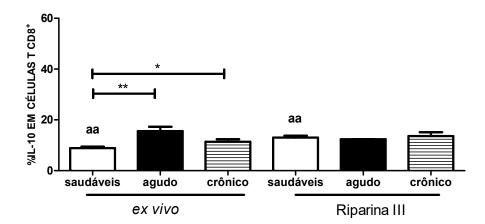
**Fonte:** DIAS, 2019. Produção de Perforina em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) representa p <0,05.

5.7 Expressão do perfil fenotípico da citocina intracelular reguladora IL-10 e seu receptor (IL-10R) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

A expressão da citocina regulatória IL-10 por células T CD8<sup>+</sup> foi aumentada em pacientes infectados com CHIKV em ambas as fases da doença em comparação com indivíduos saudáveis *ex vivo*. A Riparina III foi capaz de modular positivamente a expressão dessa citocina em células provenientes de indivíduos saudáveis (**Gráfico 7**).

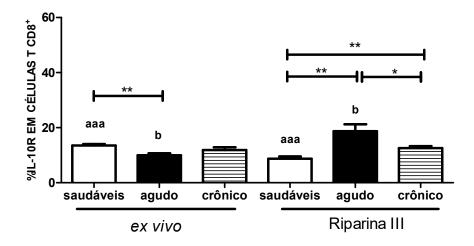
Por outro lado, em relação a IL-10R, a expressão foi menor na fase aguda da doença quando comparado com indivíduos saudáveis *ex vivo*. Em células tratadas com a Riparina III, como observado no **gráfico 8**, houve diminuição da expressão de IL-10R em células provenientes de indivíduos saudáveis e aumento em células provenientes pacientes em fase aguda em comparação aos grupos *ex vivo*.

**Gráfico 7** - Produção de IL-10 em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



**Fonte:** DIAS, 2019. Produção de IL-10 em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Letras representam diferenças significativas entre o mesmo grupo (*ex vivo* e Riparina III). Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) representa p <0,05. (\*\*) e (aa) representa p <0,005.

**Gráfico 8** - Expressão de IL-10R em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



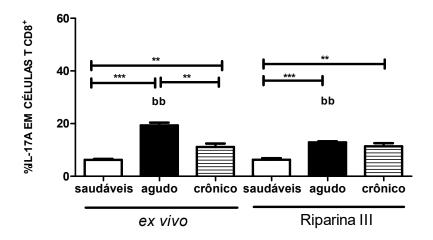
**Fonte:** DIAS, 2019. Expressão de IL-10R em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com  $34\mu\text{M}$  dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Letras representam diferenças significativas entre o mesmo grupo (*ex vivo* e Riparina III). Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) e (b) representa p <0,05. (\*\*) representa p <0,005, (aaa) representa p <0,0001.

5.8 Expressão do perfil fenotípico de citocinas intracelulares inflamatórias (IL-17A e INF-γ) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

Duas importantes citocinas inflamatórias foram avaliadas, IL-17A (**Gráfico 9**) e INF-γ (**Gráfico 10**). Os níveis de expressão de IL-17A em linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram aumentados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença em relação aos indivíduos saudáveis, porém a expressão na fase aguda foi maior que na fase crônica (**Gráfico 9**). O tratamento com a Riparina III diminuiu a expressão dos níveis de IL-17A em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes na fase aguda em relação ao grupo *ex vivo*.

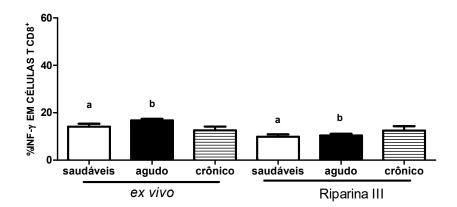
Não houve mudança de expressão de INF-γ por linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica da doença em relação aos indivíduos saudáveis. A Riparina III, por sua vez, foi capaz de modular negativamente a expressão do INF-γ (**Gráfico10**) tanto em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis quanto nas provenientes de pacientes em fase aguda da infecção em relação aos grupos *ex vivo*, demonstrando um efeito anti-inflamatório dessa droga.

**Gráfico 9** – Produção de IL-17A em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



**Fonte:** DIAS, 2019. Produção de IL-17A em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Letras representam diferenças significativas entre o mesmo grupo (*ex vivo* e Riparina III). Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*\*) e (bb) representa p <0,005. (\*\*\*) representa p <0,001.

**Gráfico 10** - Produção de INF-γ em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a produção *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



**Fonte:** DIAS, 2019. Porcentagem de expressão de INF- $\gamma$  em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34 $\mu$ M dessa droga. Letras representam diferenças significativas entre o mesmo grupo (*ex vivo* e Riparina III). Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (a/b) representa p <0,05.

# 5.9 Expressão de marcadores de morte (PD-1, CD95 e CD95L) em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

Na investigação da expressão da proteína de superfície Program Death-1 (PD-1) não foi observada diferença na expressão desse marcador em pacientes infectados com CHIKV e indivíduos saudáveis e a Riparina III também não foi capaz de modular essa expressão em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de nenhum dos grupos avaliados (**Gráfico 11**).

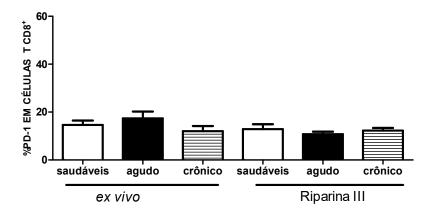
A via de indução de morte celular CD95/ CD95L também foi investigada e demonstrou-se um aumento na expressão do marcador CD95(Fas) em células provenientes de pacientes na fase crônica em relação aos indivíduos saudáveis *ex vivo*. A Riparina III foi capaz de aumentar a expressão dessa proteína nas células T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda em relação a células de indivíduos saudáveis apenas grupo tratado como observado no **gráfico 12**.

A expressão de CD95L (Fas-L) foi aumentada em ambas as fases da infecção por CHIKV em relação aos indivíduos saudáveis *ex vivo*. Nos grupos tratados, a Riparina III manteve o aumento da expressão desse marcador na fase aguda em relação

ao controle e diminui essa expressão nas células de fase crônica em relação a fase aguda (Gráfico 13).

Quando se avaliou a coexpressão de CD95/CD95L (**Gráfico 14**) nas duas fases da infecção *ex vivo* observou-se um aumento da coexpressão em relação aos indivíduos saudáveis. Quando as células foram tratadas com a Riparina III observou-se uma manutenção do aumento da coexpressão em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda em relação a indivíduos saudáveis e uma diminuição da coexpressão em células de fase crônica em relação a células de fase aguda. Além disso, o tratamento com a Riparina III foi capaz de modular positivamente essa coexpressão em células de indivíduos saudáveis em relação células de indivíduos saudáveis *ex vivo*.

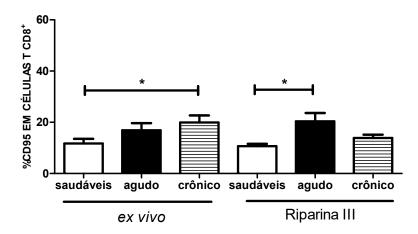
**Gráfico 11**- Expressão de PD-1 em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



**Fonte:** DIAS, 2019. Expressão de PD-1 em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com  $34\mu M$  dessa droga. Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

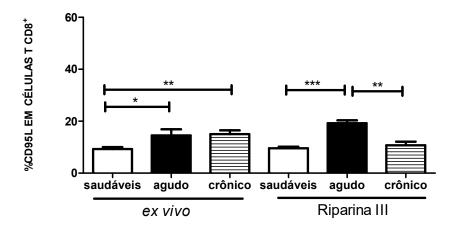
.

**Gráfico 12** - Expressão de CD95 em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



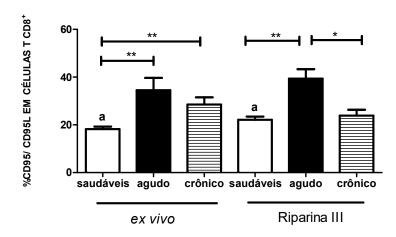
**Fonte:** DIAS, 2019. Expressão de CD95 (Fas) em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com  $34\mu M$  dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test t'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) representa p <0,05.

**Gráfico 13** - Expressão de CD95L em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



**Fonte:** DIAS, 2019. Expressão de CD95L (Fas-L) em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com  $34\mu M$  dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) representa p <0,05. (\*) e representa p <0,005 e (\*\*\*) representa p <0,0001.

**Gráfico 14** - Coexpressão de CD95/CD95L em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e em fase crônica da doença. O gráfico demonstra a expressão *ex vivo* e após o tratamento com Riparina III.



**Fonte:** DIAS, 2019. Coexpressão de CD95/CD95L (Fas/Fas-L) em T CD8<sup>+</sup> provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com  $34\mu$ M dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Letras representam diferenças significativas entre o mesmo grupo (*ex vivo* e Riparina III). Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05. (\*) e (a) representa p <0,05. (\*\*) representa p <0,005.

5.10 Expressão de marcadores extracelulares e produção de citocinas intracelulares em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica e avaliação da imunomodulação de diferentes drogas que atuam em receptores de acetilcolina.

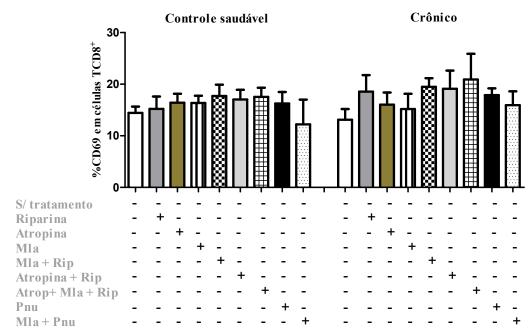
Este item refere-se aos resultados obtidos a partir dos experimentos realizados de acordo com o objetivo específico III, o qual visou à avaliação da participação de receptores colinérgicos na modulação de características fenotípicas de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV.

Além da avaliação das características fenotípicas de células T CD8<sup>+</sup> pela expressão de vários marcadores extracelulares e citocinas, buscou-se investigar a modulação de algumas características fenotípicas dessas células frente a diferentes drogas, com alvos já conhecidos, especialmente na modulação de receptores sensíveis a acetilcolina. A acetilcolina é o único ligante biológico conhecido que tem afinidade para receptores nicotínicos e muscarínicos. Seria difícil analisar efeitos de ambos os receptores na função das células T CD8<sup>+</sup> se fosse utilizado um ligante em comum. Diante disso, utilizaram-se neste ensaio, drogas com afinidades diferentes aos receptores colinérgicos para avaliação de diferenças fenotípicas, tendo em vista que receptores nicotínicos e muscarínicos possuem efeitos opostos em respostas imunes inflamatórias.

O tratamento combinado da Riparina III com as outras drogas poderia nos direcionar para um papel modulador em um ou outro receptor, tanto por um efeito sinérgico de expressão quanto por um efeito antagônico que poderia ser observado.

Em relação à expressão do marcador de ativação CD69, nenhuma das drogas testes utilizadas [PNU-282987- 5μM (Agonista nicotínico), MLA- Metilicaconitina - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10μM (Antagonista muscarínico) e Riparina III (34μM)] alterou a expressão desse marcador, como demonstrado no **gráfico 15**, não houve alteração de expressão de CD69 por células T CD8<sup>+</sup> em nenhum dos grupos avaliados.

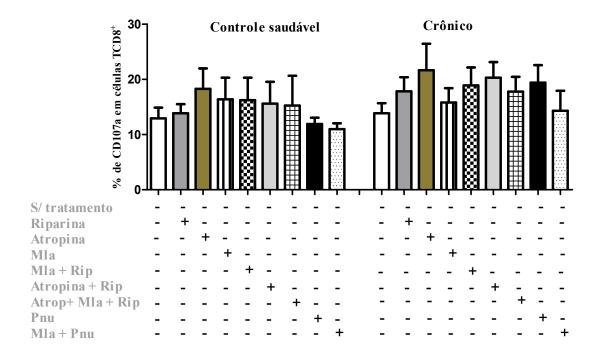
**Gráfico 15-** Expressão de CD69 em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



**Fonte:** Dias, 2019. Expressão de CD69 em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

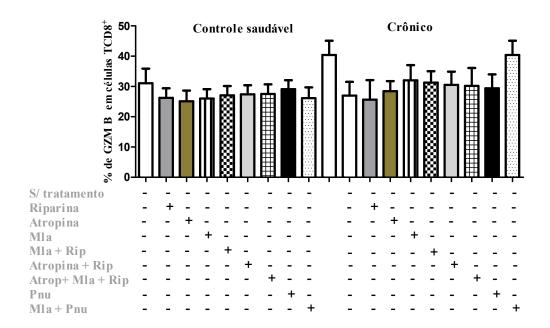
Na avaliação da expressão do marcador de exocitose (CD107a) de proteínas citotóxicas (Granzima B e Perforina) como observado nos **gráficos 16, 17 e 18,** não foi observado alteração de expressão desses marcadores em nenhum dos grupos avaliados.

**Gráfico 16-** Expressão de CD107A em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



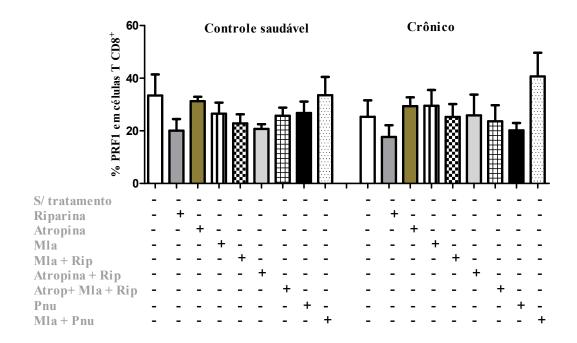
**Fonte:** Dias, 2019. Expressão de CD107A em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

**Gráfico 17-** Produção de Granzima B em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



**Fonte:** Dias, 2019. Produção de Granzima B em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

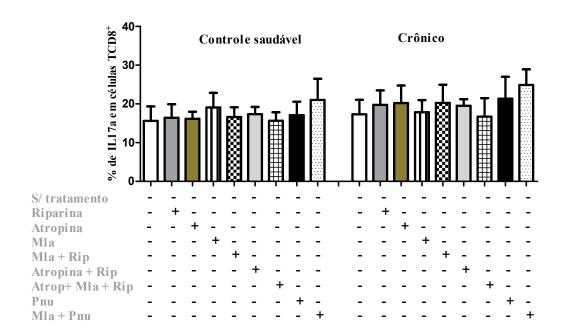
**Gráfico 18-** Produção de Perforina em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



**Fonte:** Dias, 2019. Produção de Perforina em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

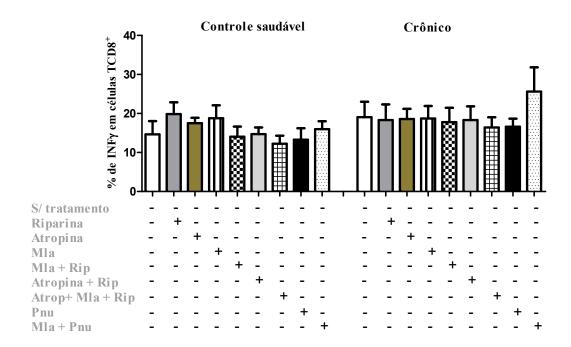
Para avalição de alteração de expressão de citocinas por modulação em receptores colinérgicos avaliou-se a expressão das citocinas inflamatórias IL-17A e INF-γ e a citocina reguladora IL-10 em células T CD8<sup>+</sup> provenientes de pacientes em fase crônica de infecção e indivíduos saudáveis. As células foram tratadas com PNU-282987- 5μM (Agonista nicotínico), MLA- Metilicaconitina - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10μM (Antagonista muscarínico) e Riparina III (34μM) em diferentes combinações. Não houve mudanças na expressão de nenhuma das citocinas avaliadas nessas células em nenhum dos grupos avaliados, como demonstrado nos **gráficos 19, 20 e 21**.

**Gráfico 19-** Produção de IL-17A em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



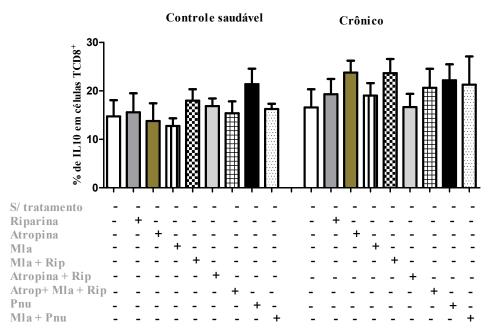
**Fonte:** Dias, 2019. Produção de IL17A em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

**Gráfico 20-** Produção de INF-γ em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



**Fonte:** Dias, 2019. Produção de INF- $\gamma$  em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média  $\pm$  erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

**Gráfico 21-** Produção de IL-10 em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.

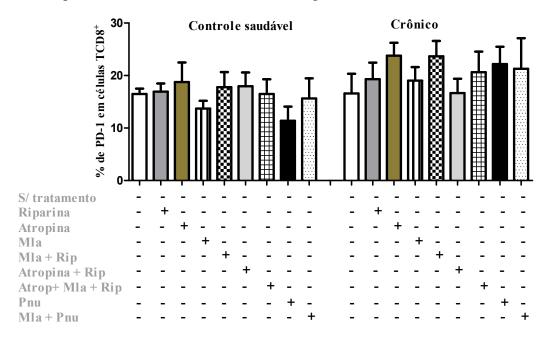


**Fonte:** Dias, 2019. Dias, 2019. Produção de IL-10 em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

.

Na avaliação da expressão do marcador de morte celular programada (PD-1), como observado no **gráfico 22**, células provenientes de pacientes em fase crônica de infecção e indivíduos saudáveis foram tratadas com PNU-282987- 5μM (Agonista nicotínico), MLA- Metilicaconitina - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10μM (Antagonista muscarínico) e Riparina III (34μM) em diferentes combinações. Entretanto, também não foi observado alteração de expressão desse marcador em nenhum dos grupos avaliados.

**Gráfico 22-** Expressão de PD-1 em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



**Fonte:** Dias, 2019. Expressão de PD-1em células T CD8<sup>+</sup> de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase crônica. Ambos os grupos foram tratados com as drogas como demonstrado no gráfico. As células do grupo sem tratamento foram submetidas às mesmas condições dos outros grupos tratados. Quando houve tratamento com mais de uma droga a primeira ou a primeira e segunda foram adicionadas e aguardou-se 30minutos para a adição da última droga e então a placa foi incubada por 16h em estufa 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Concentrações das drogas utilizadas foram: (Rip) Riparina 34μM; Atropina10 μM; (MLA) Metilicaconitina 100nM e (PNU) PNU 282987 5 μM. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey e as diferenças foram consideradas significativas quando valor de p <0,05.

## 6. DISCUSSÃO

O estudo de novas drogas e moléculas bioativas que possam se tornar ferramentas terapêuticas para tratamento de doenças, constitui uma linha da pesquisa científica decisiva e necessária para o desenvolvimento de novos medicamentos que visem uma melhor qualidade de vida para pacientes, bem como uma erradicação de doenças que podem ser fatais para seres humanos.

As doenças infecciosas constituem doenças causadas por patógenos, e em relação à CHIKD, as drogas utilizadas tratam apenas os sintomas da infeção. Nesse sentido, o estudo de novas drogas que possam ter um papel bioativo ou modulador no tratamento ou melhora dos sintomas da doença torna-se um alvo promissor. Neste trabalho buscou-se investigar a atividade imunomoduladora da Riparina III frente às células T CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados com CHIKV. Terapias específicas que envolvem a resposta imune ainda são pouco estudadas e explorar este modelo de estudo tem um forte impacto sobre a concepção de novas opções terapêuticas que visem minimizar a imunopatologia sem prejudicar o papel do sistema imune (MAGER et al., 2016).

A Riparina III, droga com propriedades biológicas já descritas, demonstrou nível de segurança aceitável tanto no teste de toxicidade frente a hemácias quanto em relação a células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Alguns estudos demonstram que a avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos (EVANS et al., 2001), especialmente para linhagem granulocítica/monocítica (CFU-GM), poderia ajudar a refinar a previsibilidade da toxicidade aguda de uma determinada substância, em relação a quanto ela pode afetar o sistema hematopoiético mielóide e estimar a toxicidade aguda *in vivo* (CERRATO et al., 2009). Logo, diante dos resultados obtidos, a Riparina III possui características que a classifica como droga segura em relação à toxicidade *in vitro*. Diante do resultado de segurança em relação à toxicidade, a avaliação da imunomodulação da Riparina III frente aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> foi realizada.

As células T CD8<sup>+</sup> ou células T CTL são os linfócitos responsáveis pela eliminação de células infectadas por vírus e essa eliminação pode ocorrer por diferentes mecanismos (ZHANG; BEVAN, 2011). As características da resposta imune à infecções virais são a expansão de linfócitos T citotóxicos CD8 específicos para antígenos (CTLs) após o encontro com células apresentadoras de antígenos nos tecidos linfóides e sua subsequente redistribuição para tecidos não linfóides para lidar com o

patógeno. Células T efetoras CD8<sup>+</sup>, uma vez ativadas, apresentam diversos mecanismos, como citotoxicidade pela produção de grânulos citotóxicos, produção de citocinas, que favorecem a eliminação do vírus e expressão de receptores de morte Fas-FasL (WISSINGER, 2019). Quando se avaliou a frequência de células T CD8<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com infecção aguda e crônica em relação a indivíduos saudáveis, não se observou diferença. A participação da frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> tem sido diverso quando se observa outras infecções virais. Na infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) uma forte resposta de CTL foi demonstrada capaz de eliminar o vírus (LECHNER et al., 2000). Em pacientes que desenvolveram a uma infecção por HCV crônica, todavia, a frequência de CTL demonstrou-se relativamente baixa (REHERMANN et al., 1996; REHERMANN et al. 1996; LECHNER et al., 2000). Por outro lado, um estudo em modelo animal com o vírus γ herpes, o número de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos foram mantidos na infecção aguda e na reativação viral (STEVENSON et al., 1998).

Além disso, os dados de manutenção da frequência de células T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV em ambas as fases demonstrados aqui, suporta o fato de que as diferenças na expressão fenotípica dos fatores avaliados se dão pelo real aumento ou diminuição de expressão e não por uma possível proliferação dessas células.

Quando se comparou a frequência desses linfócitos na infecção *ex vivo* e tratados com a Riparina III demonstrou-se que essa substância não atua promovendo proliferação ou deleção desse tipo celular.

A análise da expressão de CD69, um receptor da lectina C tipo II ligado à membrana, considerado um marcador de ativação em células T devido ao seu rápido aparecimento na superfície da membrana plasmática após estimulação, além de regular a diferenciação de células T reguladoras (Treg), bem como a secreção de IFN-γ, IL-17a e IL-22 (CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017), demonstrou um aumento da ativação de células T CD8<sup>+</sup> tanto na doença aguda quanto crônica, corroborando com resultados prévios observados em humanos na fase aguda da infecção (WAUQUIER et al., 2011). Ainda pode-se observar que apesar da ativação de células T CD8<sup>+</sup> diminuir notadamente em pacientes na fase crônica da doença quando comparados com a fase aguda, a ativação ainda é maior naquela fase do que no grupo controle, demonstrando que essas células ainda permanecem ativadas e parecem estar envolvidas na resposta imune também durante a fase crônica da doença.

O gene para o marcador CD69 está localizado cromossomo 12 no cluster do gene Natural Killer (NK) em humanos (ZIEGLER et al, 1993; LOPEZ-CABRERA et al., 1993; CIBRIÁN; SÁNCHEZ-MADRID, 2017) e sítios de ligação para vários fatores transcrição induzíveis, como NF-κB estão localizados dentro do gene promotor CD69 (LOPEZ-CABRERA, et al., 1995; CASTELLANOS et al., 1997). A expressão CD69 é prontamente regulada na ativação da maioria dos leucócitos, o que o generaliza principalmente como marcador de ativação de células NK e linfócitos (GONZALEZ-AMARO et al., 2013). Em células provenientes de indivíduos infectados por CHIKV, a Riparina III não foi capaz de modular a expressão do CD69, não interferindo no mecanismo de ativação dessas células. No entanto, em células naives de indivíduos saudáveis, a Riparina III desencadeou uma resposta de ativação, pelo aumento da expressão do marcador de ativação CD69 em linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Estudos recentes vêm demonstrando que células T CD8<sup>+</sup> naives não são unicamente dependentes de sinais de TCR para sofrer proliferação e funcional diferenciação. Estas observações sugerem que a indução de funções efetoras independente de apresentação de antígeno das células T CD8<sup>+</sup> pode ocorrer em condições de abundância de citocinas, como IL-15, IL-6 e IL-7 ou aumento da sinalização do receptor de citocinas (ZENG et al., 2005; GAGNON et al., 2007; GAGNON et al., 2008). Dessa maneira, a modulação de ativação em células T CD8<sup>+</sup> naives também poderia ocorrer independente de interação antigênica e a Riparina III pode estar envolvida em um mecanismo semelhante nesses linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

Lisossomos efetores secretórios são caracterizados por um específico conjunto de marcadores proteicos de membrana e luminal, incluindo CD107. Nós demonstramos que houve um aumento na expressão de CD107A, Granzima B e Perforina respectivamente nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes na fase aguda da infecção quando comparados com os indivíduos saudáveis. Esses resultados nos permitem sugerir que as células T CD8<sup>+</sup> medeiam à atividade citolítica na fase aguda da doença.

No entanto, pacientes com doença crônica não apresentaram expressão aumentada dessas proteínas em comparação com controles saudáveis, demonstrando que esses mecanismos citotóxicos podem não ser mantidos em fases posteriores da doença. Em um modelo de infecção crônica pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) foi demonstrado que após a apresentação antigênica nos órgãos linfóides secundários, a expansão de CTL resultou na migração de grandes quantidades desses linfócitos citotóxicos para tecidos não linfóides, onde eles mantiveram um fenótipo efetor por um longo tempo. Todavia, mesmo essas células estando presentes não foram

capazes de controlar a infecção e perderam progressivamente suas capacidades antivirais, como citotoxicidade e secreção de citocinas, antes de sua eliminação física (ZHOU et al., 2004). Esse achado corrobora com os dados obtidos neste estudo, uma vez que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> na fase crônica da infecção por CHIKV não demonstraram capacidade citotóxica, mesmo estando presentes na mesma frequência observada fase aguda da infecção.

As células tratadas com a Riparina III não alteraram a expressão desses marcadores nos grupos avaliados, demonstrando que essa droga não modula o mecanismo citolitíco por exocitose nessa célula.

Inicialmente, a IL-10 foi identificada por suprimir proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e secreção de citocinas, especialmente IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5 e TNF-α, regulando respostas inatas e adaptativas, bem como suprimindo respostas proinflamatórias (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). Observamos que houve um aumento da expressão de IL-10 pelas células T CD8<sup>+</sup> provenientes de fases aguda e crônica da infecção por CHIKV, o que pode sugerir um mecanismo de compensação regulador dessas células devido ao perfil de ativação observado nessas duas fases da infecção, uma vez que a IL-10 tem sido extensamente relacionada com efeitos inibitórios diretos em várias respostas de células T (DENIZ et al., 2008; MAYNARD; WEAVER, 2008) e a produção dessa citocina durante infecções tem sido relacionada na interferência da defesa viral (BROOKS et al., 2006; EJRNAES et al., 2006; DE MARIA et al., 2007; MARIS; CHAPPELL; JACOB, 2007; LEE et al., 2009) limitando a resposta das células T CD8<sup>+</sup> (LEE et al., 2009).

Além disso, o aumento de expressão de IL-10 observado pode estar relacionado com um mecanismo de persistência viral. A persistência do antígeno e do RNA viral no tecido sinovial foi demonstrada em pacientes com artralgia crônica, e a persistência viral foi associada à expressão de interferon-α, IL-10 e CCL2 (HOARAU et al., 2010).

A citocina reguladora IL-10 possui propriedades anti-inflamatórias e desempenha uma importante função no controle das respostas imunes do hospedeiro a patógenos e é reconhecida por prevenir danos causados por uma resposta inflamatória exacerbada e manter a homeostase dos tecidos. Doenças autoimunes e imunopatologias em resposta a infecções estão geralmente associadas à desregulação da expressão da IL-10 (ZEICHNE; ARMSTRONG, 2016).

Em relação ao IL-10R, houve uma diminuição na expressão desse receptor em linfócitos T CD8<sup>+</sup> provenientes da fase aguda e a não houve mudança na expressão

desse receptor na fase crônica quando comparado com indivíduos saudáveis. O efeito imunomodulador anti-inflamatório da IL-10 inicia-se com sua ligação ao seu receptor (DING et al., 2001; ZHU et al., 2017) induzindo a ativação da via Janus cinase 1 (JAK 1) e Tirosina cinase 2 (Tyk2), levando a fosforilação de STAT-3, um transdutor de sinal e ativador de genes de transcrição, resultando na ativação de genes alvo e expressão de efetores anti-inflamatórios (MURRAY, 2005; ZHU et al., 2017).

Dessa forma, a diminuição de expressão de IL-10R na fase aguda da infecção por CHIKV como demonstrada neste estudo, na qual esses linfócitos T CD8<sup>+</sup> encontram-se ativados e com mecanismo citotóxico ativo, sugere um silenciamento do mecanismo anti-inflamatório, o qual pode promover o desenvolvimento de artralgia crônica. Ademais, apesar da IL-10 estar aumentada na fase aguda, a diminuição da expressão do seu receptor (IL-10R) pode sugerir um gatilho inflamatório na doença, o que pode acarretar uma fase crônica grave para o paciente, com sintomas inflamatórios mais exacerbados nesta fase.

O tratamento com a Riparina III não alterou a expressão de IL-10 em linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes em fase aguda e crônica da infecção por CHIKV. Essa ausência de alteração da expressão de IL-10 pela Riparina III permite a manutenção da resposta anti-inflamatória desempenhada por essas células. Em relação aos indivíduos saudáveis, a Riparina III, modulou positivamente a expressão da IL-10, o que sugere que a Riparina III pode atuar em um mecanismo anti-inflamatório independente da ativação da célula T CD8<sup>+</sup>.

O IL-10R consiste em um receptor tetramérico complexo formado por duas subunidades α (IL-10R1) de uma cadeia específica para IL-10 e duas subunidades β (IL-10R2) com afinidade compartilhada com outras citocinas da família da IL-10, como IL-22, IL-26, IL-28 e IL-29 (OFT, 2013; ZHU et al., 2017). A expressão de IL-10R em células T CD8<sup>+</sup> foi modulada positivamente pelo tratamento com a Riparina III, aumentando a expressão desse marcador em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes na fase aguda da infecção. Esse aumento da expressão de IL-10R por essas células pode favorecer um aumento da interação de IL-10/ IL-10R de maneira autócrina e também parácrina. Dessa maneira, pode-se sugerir que a Riparina III atua modulando positivamente uma via que desencadeia sinalização intracelular e expressão gênica de efetores anti-inflamatórios (ZHU et al., 2017) reafirmando o papel anti-inflamatório dessa molécula.

Esse resultado é de extrema importância no que diz respeito a um estudo mais aprofundado da Riparina III no controle de uma resposta imune inflamatória

exacerbada. Tendo em vista que, pacientes infectados com o CHIKV apresentam sérios sintomas articulares na fase aguda, que podem evoluir para quadros reumatológicos sérios na fase crônica, associados à resposta imune inflamatória (ALLA; COMBE, 2011). Esses achados devem ser mais bem explorados, no intuito de que as propriedades de modulação inflamatória dessa molécula possam ser confirmadas.

Inicialmente IL-17A foi identificada em células T citotóxicas de camundongos (CHEN; O'SHEA, 2008). Em humano tem sido associada a doenças como: esclerose múltipla, psoríase e artrite reumatoide (CHEN; O'SHEA, 2008; BARTLETT; MILLION, 2015). Sua expressão é frequentemente associada a um subconjunto específico de células T CD4<sup>+</sup>, as Th17. No entanto, vários outros subconjuntos de células também podem sintetizar e expressar IL-17, incluindo células T CD8<sup>+</sup>, também conhecidas como células Tc17. A secreção de IL-17A pelas células T CD8<sup>+</sup> tem sido descrita em várias doenças inflamatórias humanas (SRENATHAN; STEEL; TAAMS, 2016; ZEICHNER; ARMSTRONG, 2016) e tem sido um alvo relevante de muitos estudos envolvendo doenças inflamatórias, como inflamação reumática e articular (MIOSSEC, 2017). A alta expressão de citocinas da família IL-17 está relacionada à indução de uma forte resposta inflamatória associada à proteção contra invasão de patógenos (VELDHOEN, 2017). Embora, além do papel protetor, essa citocina contribua para a destruição tecidual que ocorre em doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (MIOSSEC; KOLLS, 2012; SRENATHAN; STEEL; TAAMS, 2016). Na infecção pelo CHIKV, os sintomas crônicos estão intimamente relacionados aos sintomas da artrite reumatoide e a IL-17A foi investigada como protagonista nessa ação.

Neste estudo demonstrou-se que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes na fase aguda da doença mostraram um aumento significativo da citocina IL-17A como observado em relação aos grupos controle e crônico. Pacientes em fase crônica, acometidos por sintomas artritogênicos, também apresentaram níveis elevados de IL-17A em relação ao controle. Com esses dados pode-se inferir que as células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IL-17A podem estar diretamente envolvidas nos sintomas articulares e favorecer o estabelecimento de artrite induzida por CHIKV, assim como na persistência desta condição em pacientes que são acometidos com a doença crônica.

Considerada chave no desenvolvimento de desordens inflamatórias a IL-17A tem sido caracterizada como um alvo terapêutico. Na terapêutica o Cosentyx®, que contém a substância ativa secuquinumabe, pertencente ao grupo de medicamentos

denominado inibidores da interleucina (IL) e é utilizada principalmente no tratamento da psoríase, artrite psoriática e espondilite anquilosante (BARTLETT; MILLION, 2015).

Esta pesquisa demonstrou que a Riparina III foi capaz de diminuir a expressão de IL-17A em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados com CHIKV em fase aguda da infecção, mesmo os níveis de IL-17A não se igualando ao controle, essa diminuição foi bastante significativa confirmando um efeito anti-inflamatório dessa molécula nas células T CD8<sup>+</sup> na fase aguda, o que embasa novos estudos para sua utilização no contexto imunoterapêutico, principalmente no que diz respeito ao controle dos níveis de IL-17A e, consequentemente, dos efeitos inflamatórios na infecção por CHIKV.

A produção de citocinas na circulação tem sido avaliada no plasma de pacientes com infecção por CHIKV. Em uma infecção experimental de macacos com CHIKV, foi detectada no início da infecção a produção de IFN-α, IL-6 e CCL2, seguida de IFN-γ, TNF-α, CCL3 e CCL4 (LABADIE et al., 2010). Outro estudo demonstrou que PBMCs de pacientes com infecção crônica por CHIKV expressaram INFs antivirais do tipo I e em biópsias de tecido e líquido sinovial, citocinas inflamatórias como TNF-α, IL-1β e INF-γ não foram encontradas (HOARAU et al., 2010). Além disso, níveis de INF-γ e IL-12 (NG et al., 2009; WAUQUIER et al., 2011), foram encontrados em vários pacientes avaliados, mas não foram mensurados intracelularmente em linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

A ausência de aumento da expressão de INF-γ pelas células T CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados pelo CHIKV, como se demonstrou neste trabalho, pode estar relacionada com uma menor participação da resposta por INF-γ por esses linfócitos nesta doença, uma vez que a resposta antiviral é principalmente desempenhada por INFs do tipo I, os quais são representados por INF- α e INF-β (WAUQUIER et al., 2011; PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015).

Apesar de os valores de expressão de INF-γ não se mostrarem alterados na infecção por CHIKV neste estudo, a diminuição da expressão dessa citocina, modulada pela Riparina III em células T CD8<sup>+</sup> obtidos de pacientes na fase aguda e de indivíduos saudáveis, afirma um efeito modulador anti-inflamatório dessa molécula de maneira independente da doença. Dessa forma, essa molécula pode ser um alvo promissor na imunoterapia de doenças inflamatórias.

Após a ativação de células T CD8<sup>+</sup> efetoras e eliminação do patógeno em uma infecção aguda, caso haja estimulação antigênica persistente, como em infecções

crônicas e câncer, ocorre exaustão funcional dessas células T CD8<sup>+</sup> (GRAY et al., 2005). Um componente essencial é a ação de receptores inibitórios, sendo o mais bem descrito o receptor inibitório de morte celular programada (PD-1), que é expresso em células T CD8<sup>+</sup> exaustas durante infecções crônicas e câncer (LUKENS et al., 2006; RUTIGLIANO et al., 2014; AHN et al., 2018). O PD-1 e outros receptores inibitórios interferem na sinalização através do receptor de células T e, portanto, têm consequências na função dessas células, desde a liberação de citocinas até o metabolismo (ROGERS; WILLIAMS, 2019).

Além da exaustão celular, o fato do eixo PD-1/PD-L1 também regular as respostas imunológicas inflamatórias antivirais na fase aguda tem sido discutido (SCHONRICH; RAFTERY, 2019). Apesar de a regulação positiva de PD-1 e seus ligantes PD-L1 e PD-L2 ser observada durante a infecção viral aguda e após a infecção com vírus persistentes, incluindo patógenos humanos importantes, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), HCV e vírus da hepatite B (HBV) (SCHONRICH; RAFTERY, 2019), neste trabalho a infecção por CHIKV não demonstrou alteração na expressão desse marcador em células T CD8<sup>+</sup> nem na fase aguda, nem fase crônica da infecção e o tratamento com a Riparina III também não foi capaz de modular os níveis de expressão desse marcador.

Evidências experimentais sugerem que a insuficiente sinalização através da via PD-1 promove imunopatologia durante a infecção aguda exacerbando as respostas das células T primárias (SCHONRICH; RAFTERY, 2019). Dessa forma, essa ausência do aumento de expressão de PD-1 pelas células T CD8<sup>+</sup> em pacientes infectados com CHIKV em relação a indivíduos saudáveis observada neste estudo pode favorecer a resposta celular inflamatória desempenhada por essas células, bem como os sintomas inflamatórios proeminentes observados nesta infecção, uma vez estão pouco submetidas aos sinais de regulação pelo eixo PD-1- PD-L1.

Corroborando os dados encontrados neste estudo, em um modelo infecção experimental pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), a inibição da via PD-1 na infecção aguda aumentou as funções efetoras das células TCD8<sup>+</sup>, pelo aumento da expressão de Granzima B (AHN et al., 2018). Se a infecção crônica for estabelecida, contudo, altos níveis de expressão de PD-1 podem ter consequências imunológicas desfavoráveis por promover a exaustão e supressão da resposta antiviral, podendo resultar em uma evasão imune viral (SCHONRICH; RAFTERY, 2019).

As células T CD8<sup>+</sup> possuem a capacidade de destruir as células infectadas por um mecanismo de contato que desencadeia apoptose através da ativação de caspases. A interação do CD95L ou FasL presente na superfície das células T CD8<sup>+</sup> com o seu ligante CD95 ou Fas presente em células alvo leva a destruição de células infectadas (SHRESTHA; DIAMOND, 2007; WISSINGER, 2019).

Neste estudo, observou-se o aumento da expressão de CD95L e a coexpressão de CD95/CD95L nas duas fases de infecção pelo CHIKV, demonstrando a ativação e expressão desses marcadores de morte durante as fases aguda e crônica. É descrito que células T CD8<sup>+</sup> expressam o CD95L apenas após a ativação (BOSSI; GRIFFITHS, 1999). Logo, sugere-se, com os dados obtidos neste estudo, que essas células permanecem ativadas mesmo na fase crônica da infecção. As células T CD8<sup>+</sup> são capazes de expressar ambos os marcadores Fas/ FasL e nesse mecanismo matar umas às outras, denominadas fratricidas, e eliminar células efetoras irmãs durante a fase final de uma resposta imune (SHRESTHA; DIAMOND, 2007; WISSINGER, 2019). Esse mecanismo fratricida pode estar acontecendo nessa infecção, já que a coexpressão desses marcadores está evidente nas duas fases da infecção por CHIKV. Além disso, o aumento da expressão de CD95 (Fas) foi observado apenas na fase crônica da infecção, demonstrando que essa expressão pode ser um efeito celular tardio.

Em relação à modulação da expressão do CD95 em células T CD8<sup>+</sup> tratadas com a Riparina III houve um aumento da expressão desse marcador no grupo agudo em relação ao controle, tendo em vista que esse marcador quando expresso na célula T citotóxica atua em um mecanismo fratricida, pode-se sugerir que a Riparina III pode estar colaborando para esse mecanismo em células infectadas por CHIKV em fase aguda, dessa maneira levando a diminuição do número, bem como da atividade desses linfócitos efetores, sugerindo uma atividade anti-inflamatória indireta.

Na modulação do CD95L em células T CD8<sup>+</sup> do grupo tratado, a Riparina III manteve os níveis de expressão desse marcador na fase aguda em relação aos indivíduos controle e atuou diminuindo a expressão de CD95L nas células da fase crônica em relação ao agudo, levando a expressão desse marcador a nível semelhante aos dos indivíduos saudáveis. Essa diminuição de expressão de FasL na fase crônica modulado pela Riparina III pode estar relacionado à diminuição da atividade efetora dessa célula, que só foi observada na fase crônica da doença. Em relação à modulação da coexpressão de CD95/CD95L a Riparina III manteve os níveis de coexpressão

semelhante ao perfil *ex vivo*. E aumentou a coexpressão apenas nos indivíduos saudáveis tratados em relação ao *ex vivo*.

Estudos demonstram que a ausência de células T CD8<sup>+</sup> em tecido sinovial pode contribuir para a persistência de CHIKV (HOARAU et al., 2010). Aqui demonstramos que células T CD8<sup>+</sup> apresentam papel importante na infecção por CHIKV e nossos resultados sugerem que essas células têm função inflamatória na circulação sistêmica, principalmente na fase aguda da infecção, e que a Riparina III é uma molécula que é capaz de modular fenotipicamente essas células de maneira anti-inflamatória.

A ACh é amplamente conhecida como um neurotransmissor em ambos os sistemas nervoso central e periférico em espécies de mamíferos. Porém, nos últimos anos, a via colinérgica não neuronal tem sido estudada (FUJII et al., 2017). Tanto receptores muscarínicos quanto nicotínicos da ACh foram identificados em linfócitos isolados do timo, linfonodo, baço e sangue periférico, e sua estimulação por agonistas muscarínicos e nicotínicos provoca uma variedade de efeitos funcionais e bioquímicos (KAWASHIMA; FUJII, 2000; FUJII et al., 2017). O estudo do comportamento da célula T CD8<sup>+</sup> na CHIKV e sua imunomodulação frente agonista nicotínico PNU282987, antagonista nicotínico MLA, antagonista muscarínico Atropina, bem como a Riparina III em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes infectados com CHIKV em fase crônica e indivíduos saudáveis estudado neste trabalho, visou investigar o possível envolvimento desses receptores em mudanças fenotípicas que poderiam ser desempenhadas por essas células frente aos tratamentos com essas drogas.

Diante dos experimentos de citometria de fluxo realizados demonstrou-se neste estudo que nenhuma das drogas utilizadas foi capaz de modular mudanças na expressão fenotípica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> nem em indivíduos saudáveis e nem em pacientes com infecção crônica em comparação ao grupo sem o tratamento com as drogas. Zimring e colaboradores em 2005 ao analisarem camundongos knockout para os mAChR (M1-M5) demonstraram um defeito na diferenciação inicial de linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos na ausência do receptor M1. Mais tarde, esse mesmo grupo não observou defeito na expansão de células T CD8<sup>+</sup> em camundongos knockout para os mAChRs M1 e M5, infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica ou vírus da estomatite vesicular. Isso sugere que os mAChRs M1 e M5 não estão envolvidos na imunidade antiviral (VEZYS et al., 2007; KAWASHIMA et al., 2012; FUJII et al., 2017). Esse dado levanos a inferir que a modulação anti-inflamatória demonstrada pela Riparina III não está

relacionada com o envolvimento dos receptores colinérgicos, ou ainda esses receptores nesses linfócitos T CD8<sup>+</sup> não estariam envolvidos na resposta antiviral.

Além disso, estudos demonstram que células T CD4<sup>+</sup> não estimuladas expressam RNAm para Colina Acetiltransferase (ChAT) enquanto células T CD8<sup>+</sup> não estimuladas não expressam o RNAm ChAT. A expressão de RNAm foi aumentada nas células T CD4<sup>+</sup> na presença de fitohemaglutinina (PHA), que ativa as células T através das vias mediadas pelo receptor de células T (TCR/CD3), mas não houve expressão em células T CD8<sup>+</sup> igualmente estimuladas (FUJII et al., 2003), demonstrando a deficiência da ChAT e síntese da acetilcolina por esses linfócitos mesmo quando ativados.

Apesar do papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e da Riparina III não ter sido correlacionada com ação em receptores colinérgicos neste estudo, nossos dados fornecem pela primeira vez novas informações sobre o funcionamento e competência das células T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV e sugerem que a modulação do perfil de expressão nas células T CD8<sup>+</sup> difere entre as fases da doença. Ademais, a Riparina III demonstrou um notável papel imunomodulador anti-inflamatório nesses linfócitos, o que a torna uma molécula promissora como alvo para investigações futuras e possível atuação como droga imunomoduladora na CHIKD.

## 7. CONCLUSÕES

Os dados demonstrados neste trabalho nos permitem concluir que a infecção pelo CHIKV gera uma forte resposta imune celular desempenhada pela ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> por mecanismo de ativação, expressão dos receptores de morte e papel citolítico na fase aguda da doença, demonstrando o papel destas células no combate a infecção e participação no desenvolvimento dos sintomas descritos nessa fase.

Conclui-se também que esses linfócitos produzem tanto na fase aguda quanto crônica da doença altos níveis de IL-17A, citocina chave encontrada na artrite, e pode ter um papel importante no desenvolvimento de sintomas articulares na fase aguda e na manutenção desses sintomas na fase crônica da infecção por CHIKV.

A Riparina III tem papel imunomodulador anti-inflamatório na expressão de citocinas e indiretamente na expressão de marcadores de morte envolvendo linfócitos T CD8<sup>+</sup> na infecção por CHIKV. Essa molécula modulou negativamente os níveis de IL-17A na fase aguda da infecção. Além isso, a Riparina III aumentou os níveis de expressão de IL-10R, o que permite o aumento interação da IL-10 com seu receptor, afirmando o papel anti-inflamatório dessa molécula. Resultados de modulação de IL-10 e IL-10R precisam ser mais profundamente estudados. Ademais, essa molécula também foi capaz de modular negativamente os níveis de expressão de INF-γ de maneira independente da doença.

Logo, a Riparina III, uma droga isolada da *Aniba riparia*, demonstra um efeito imunomodulador anti-inflamatório nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em pacientes infectados com CHIKV na fase aguda da doença.

Também se pode concluir que a modulação anti-inflamatória evidenciada pela Riparina III não está relacionada com o envolvimento dos receptores colinérgicos, ou ainda esses receptores não estariam envolvidos na resposta antiviral.

## REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral research**, v. 121, p. 59-68, 2015.
- AHN, E.; ARAKI, K.; HASHIMOTO, M..; LI, W.; RILEY, J. L.; CHEUNG, J.; Sharpe, A. H.; Freeman, G. J.; Bryan A. Irving, B. A.;AHMED, R. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the United States of America.** v.115, p. 4749-4754, 2018.
- ALLA, S. A. O.; COMBE, B. Arthritis after infection with Chikungunya virus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 25, n. 3, p. 337-346, 2011.
- ALEXANDER, S. P. H.; PETERS, J. A. Tips on receptor and ion channel nomenclature (10th ed.). **Trends in Pharmacology Sciences**. v. 20, p. 6–8, 1999.
- ANTAS, P.R.Z.; SALES, J.S.; PEREIRA, K.C.; OLIVEIRA, E.B.; CUNHA, K.S.; SARN, E. N SAMPAIO, E. P. Patterns of intracellular cytokines in CD4 and CD8 T cells from patients with mycobacterial infections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V.37, p. 1119-1129, 2004.
- APPASSAKIJ, H.; KHUNTIKIJ, P.; KEMAPUNMANUS, M.; WUTTHANARUNGSAN, R.; SILPAPOJAKUL, K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? **Transfusion.** v. 53, n. 10pt2, p. 2567–2574, 2013.
- ARAÚJO, F. L. O.; MELO, C. T. V.; ROCHA, N. F. M.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P. AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F.S. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. v. 380, p. 337–344, 2009.
- ATKINSON, T.; BARRETT, A.D.; MACKENZIE, A.; DIMMOCK, N.J. Persistence of virulent Semliki forest virus in mouse brain following co-inoculation with defective interfering particles. **Journal General Virology**. 67 (Pt 6), 1189–1194, 1986.
- AYU, S. M.; LAI, L. R.; CHAN, Y. F.; HATIM, A.; HAIRI, N. N.; AYOB, A.; SAM, I. C. Seroprevalence survey of Chikungunya virus in Bagan Panchor, Malaysia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.83, (6), p.1245–1248, 2010.
- AZEVEDO, R. S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P.F. Chikungunya risk for Brazil. **Revista de Saude Publica**.v. 49, p.58, 2015.
- BANDEIRA, A.C.; CAMPOS, G.S.; SARDI, S.I.; ROCHA, V.F.; ROCHA, G.C. Neonatal encephalitis due to Chikungunya vertical transmission: first report in Brazil. **IDCases.** v. 5, p. 57–59, 2016.

BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; DE CSBC BARBOSA, R., GIESBRECHT, A. M., & YOUNG, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of Aniba riparia. **Phytochemistry.** v. 26, n. 9, p. 2615-2617, 1987.

BARBOSA-FILHO, J.M. Quimiodiversidade e potencialidade farmacológica da flora paraibana. Caderno de Farmácia. v.13, p. 85–102, 1997.

BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of severall new phenylethylamides of substituited benzoic acids. **Quimímica Nova**, v. 13, p. 332-334, 1990.

BARTLETT, H.; MILLION, R.. Targeting the IL-17–TH17 pathway. **Nature Reviews.** v. 14, 2015.

BERRIDGE, M. J. Calcium oscillation. The **Journal of Biological Chemistry**. v.265, p. 9583–9586, 1990.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol trisphosphates and cell signaling. **Nature** v.341, p.197–205, 1989.

BONNER, T. I.; BUCKLEY, N. J.; YOUNG, A. C.; BRANN, M. R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. **Science** v.237, p.527–532, 1987.

BOSSI, G.; GRIFFITHS G. M. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. **Nature Medicine.** v. 5, p.90, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Chikungunya: manejo clínico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 65p. 2017.

BRIGHTON, S.W. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. **South African Medical Journal**. v.66 (6), p. 217–218, 1984.

BRITO, C. A.; CORDEIRO, M. T. One year after the Zika virus outbreak in Brazil: from hypotheses to evidence. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 49, n. 5, p. 537-543, 2016.

BROOKS, D.G., TRIFILO, M. J.; EDELMANN, K. H.; TEYTON, L.; MCGAVERN, D. B.; OLDSTONE, M. B. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. **Nature Medicine.** v.12, p.1301–1309, 2006.

BEN-ZVI, I.; <u>KIVITY</u>, S.; <u>LANGEVITZ</u>, P.; <u>SHOENFELD</u>, <u>Y</u>. Hydroxychloroquine: From Malaria to Autoimmunity. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology.** v. 42, p. 145-153, 2012.

BURT, F. J.; ROLPH, M. S.; RULLI, N. E.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M. T. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012.

- CASTELLANOS, M. C.; MUNOZ, C.; MONTOYA, M. C.; LARA-PEZZI, E.; LOPEZ- CABRERA, M.; Landazuri, M. O. Expression of the leukocyte early activation antigen CD69 is regulated by the transcription factor AP-1. **The Journal Immunology.** v.159, p.5463–5473, 1997.
- CASTELO-BRANCO, U. V.; CASTELO-BRANCO, U. J. V.; THOMAS, G.; DE ARAÚJO, C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M. Preliminary Pharmacological Studies on three Benzoyl Amides, constituents of Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae). **ACTA FARMACEUTICA BONAERENSE**. v. 19, n. 3, p. 197-202, 2000.
- CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, M. A. R.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Evaluation of the antimicrobial activity and biological effect by riparins about elimination the resistance of drugs in samples of Staphylococcus aureus. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** v. 42, p. 9-14, 2010.
- CERRATO, L.; VALERI, A.; BUEREN, J. A.; ALBELLA, B. In vitro sensitivity of granulo-monocytic progenitors as a new toxicological cell system and endpoint in the ACuteTox Project. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.238, p.111–119, 2009.
- COUPER K.N.; BLOUNT, D.G, RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of Immunology**. V. 180(9), p. 5771-5777, 2008.
- CHEN, Z.; O'SHEA, J. J. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. Cytokine. V.41, I. 2, p. 71-78, 2008.
- CHOI, H.G.; YEON, G.M. Guillain-Barré syndrome caused by influenza virus. **Pediatric Infection Vaccine**. v.23, n.3, p. 236–239, 2016.
- CHOMPOOSRI, J.; THAVARA, U.; TAWATSIN, A.; BOONSERM, R.; PHUMEE, A.; SANGKITPORN, S.; SIRIYASATIEN, P. Vertical transmission of Indian ocean lineage of chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Parasites & Vectors**. v.9, p.227, 2016.
- CHOW, A.; HER, Z.; ONG, E. K.; CHEN, J. M.; DIMATATAC, F.; KWEK, D. J., BARKHAM, T.; YANG H, RÉNIA, L.; LEO, Y.S.; NG, L. F. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149-157, 2011.
- CHUSRI, S.; SIRIPAITOON, P.; HIRUNPAT, S.; SILPAPOJAKUL, K. Case reports of neuro- Chikungunya in southern Thailand. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.85, n.2, p.386–389, 2011.
- CIBRIÁN, D.; SÁNCHEZ-MADRID, F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. **European journal of immunology**, v. 47, n. 6, p. 946-953, 2017.
- COUDERC, T.; CHRÉTIEN, F.; SCHILTE, C.; DISSON, O.; BRIGITTE, M.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; TOURET, Y.; BARAU, G.; CAYET N.;

SCHUFFENECKER, I.; DESPRÈS, P.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; MICHAULT, A.; ALBERT, M.L.; LECUIT, M. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29, 2008.

CRESPI, A.; COLOMBO, S. F.; GOTTI, C. Proteins and chemical chaperones involved in neuronal nicotinic receptor expression and function: an update. **British Journal of Pharmacology**, v.175, n.11, p.1869-1879, 2017.

CUNHA, R.V.D., TRINTA, K.S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.112, n.8, p.523–531, 2017.

DE CARVALHO, A. M. R.; ROCHA, N. F. M.; VASCONCELOS, L. F.; RIOS, E. R. V.; DIAS, M. L.; SILVA, M. I. G.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C. DE SOUSA, F. C. F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methil-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-biological interactions**, v. 205, n. 3, p. 165-172, 2013.

DE CASTRO CHAVES, MALLMANN, A. S. V.; OLIVEIRA, N. F.; OLIVEIRA, I. C. M.; CAPIBARIBE, V. C. C.; DA SILVA, D. M. A.; LOPES, I. S.; VALENTIM, J. T.; DE CARVALHO, A. M. R.; MACÊDO, D. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; BARBOSA FILHO, J. M.; DE SOUSA, F. C. F. Reversal effect of Riparin IV in depression and anxiety caused by corticosterone chronic administration in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 180, p. 44-51, 2019.

DELISLE, E.; ROUSSEAU, C.; BROCHE, B.; LEPARC-GOFFART, I.; L'AMBERT, G.; COCHET, A.; PRAT, C.; FOULONGNE, V.; FERRÉ, J. B.; CATELINOIS, O.; FLUSIN, O.; TCHERNONOG, E.; MOUSSION, I. E.; WIEGANDT, A.; SEPTFONS A.; MENDY, A.; M B MOYANO, M.B.;LAPORTE, L.;, J MAUREL, J.; JOURDAIN, F.; J REYNES, J.; PATY, M. C. GOLLIOT, F. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. **Euro Surveillance**, v. 20, n. 17, p. 21108, 2015.

DE MARIA, A.; M. FOGLI, S.; MAZZA, M.; BASSO, A.; PICCIOTTO, P.; COSTA, S.; CONGIA, M.C.; MINGARI; L. MORETTA L. Increased natural cytotoxicity receptor expression and relevant IL-10 production in NK cells from chronically infected viremic HCV patients. **European Journal of Immunology.** v.37, p.445–455, 2007.

DENIZ, G.; ERTEN, G.; KÜCÜKSEZE,R U. C.; KOCACIK, D.; KARAGIANNIDIS, C.; AKTAS, E.; AKDIS, C. A.; AKDIS, M. Regulatory NK cells suppress antigenspecific T cell responses. **Journal of Immunology**. v.180, p. 850–857, 2008.

DIAS, C. N. S.; GOIS, B. M.; LIMA, V. S.; GUERRA- GOMES, I. C.; ARAÚJO, J. M. G.; GOMES, J. A. S.; ARAÚJO, D. A. M.; MEDEIROS, I. A.; AZEVEDO, F. L. A. A.; VERAS, R. C.; JANEBRO, D. I.; AMARAL, I. P. G.; KEESEN, T. S. L. Human CD8 T-cell activation in acute and chronic chikungunya Infection. **Immunology**. v.155(4), p.499-504, 2018.

DING, Y.; QIN, L.; ZAMARIN, D.; KOTENKO, S. V.; PESTKA, S.; MOORE, K. W.; BROMBERG, J. S. Differential IL-10R1 expression plays a critical role in IL-10-

- mediated immune regulation. **Journal of Immunology.** v.167, n.12, p.6884-6892, 2001.
- DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; NORET, M.; BRUN, S.; LE GRAND, R.; GRAS, G.; ROQUES, P. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 3, p. e1446, 2012.
- ECONOMOPOULOU, A.; DOMINGUEZ, M.; HELYNCK, B.; SISSOKO, D.; WICHMANN, O.; QUENEL, P.; GERMONNEAU, P.; QUATRESOUS, I. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortalityand risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection.** v.137, n.4, p.534–541, 2009.
- EJRNAES, M.; FILIPPI, C.M.; MARTINIC, M. M.; LING, E.M.; TOGHER, L.M.; CROTTY, S.; VON HERRATH, M.G. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. **The Journal of Experimental Medicine.** v. 203, p. 2461–2472, 2006.
- ERNOULD, S.; WALTERS, H.; ALESSANDRI, J. L.; LLANAS, B.; JAFFAR, M. C.; ROBIN, S.; <u>ATTALI, T.</u>; <u>RAMFUL, D.</u>; COMBES, J. C. Chikungunya in paediatrics: epidemic of 2005-2006 in Saint-Denis, Reunion Island. **Archives de Pediatrie: organe official de la Societe française de pediatrie.** v.15, n.3, p. 253–262, 2008.
- EVANS, S. M.; CASARTELLI, A.; HERREROS, E.; MINNICK,D. T.; DAY, C.; GEORGE, E.; WESTMORELAND, C. Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute *in vivo* toxic potential. **Toxicology in Vitro**.v.15, p. 579–584, 2001.
- FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of Casearia sylvestris: A medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.83, p. 1373–1384, 2011.
- FUJII, T.; WATANABE, Y.; FUJIMOTO, K.; KAWASHIMA, K.; Expression of acetylcholine in lymphocytes and modulatation of an independent lymphocytic cholinergic activity by immunological stimulation. **Biogenic Amines.** V. 17, n. 4-6, p. 373-386, 2003.
- FUJII, T.; HORIGUCHI, K.; SUNAGA, H.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H.; KASAHARA, T.; TSUJU, S.; KAWASHIMA, K. SLURP-1, an endogenous α7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, is expressed in CD205+ dendritic cells in human tonsils and potentiates lymphocytic cholinergic activity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 267, n. 1–2, p. 43–49, 15 fev. 2014.
- FUJII, T.; MASHIMO, M.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H.; ONO, S.; HORIGUCHI, K.,; KAWASHIMA, K. Expression and Function of the Cholinergic System in Immune Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1085, 6 set. 2017.

- GAGNON, J.; RAMANATHAN, S.; LEBLANC, C.; ILANGUMARAN, S. Regulation of IL-21 signaling by suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) in CD8\_ T lymphocytes. **Cellular Signalling.** v.19, p.806–816, 2007.
- GAGNON, J.; RAMANATHAN, S.; LEBLANC, C.; CLOUTIER, A.; MCDONALD, P. P.; ILANGUMARAN, S. IL-6, in synergy with IL-7 or IL-15, stimulates TCR-independent proliferation and functional differentiation of CD8+ T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 7958-7968, 2008.
- GENARO, A. M.; CREMASCHI, G. A.; BORDA, E. S. Muscarinic cholinergic receptors on murine lymphocyte subpopulations. **Immunopharmacology.** v.26, p.21–29, 1993.
- GÉRARDIN, P.; BARAU, G.; MICHAULT, A.; BINTNER, M.; RANDRIANAIVO, H.; CHOKER, G.; Lenglet, Y.; Touret, Y.; Bouveret, A.; Grivard, P.; Le Roux, K.; Blanc, S.; Schuffenecker, I.; Couderc, T.; Arenzana-Seisdedos, F.; Lecuit, M.; Robillard P.Y. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. **PLoS medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, 2008.
- GIRGIN, N.K.; İŞÇIMEN, R.; YILMAZ, E.; KAHVECI, Ş.; KUTLAY, O. Guillain-Barré syndrome and human immunodeficiency virus. Turkish **Journal of the Anaesthesiology Reanimation.** v.42, n. 2, p. 100–102, 2014.
- GONZALEZ-AMARO, R.; CORTES, J. R.; SANCHEZ-MADRID, F. MARTIN, P. Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases? **Trends in Molecular Medicine.** v.19, p. 625–632, 2013
- GOPAKUMAR, H., RAMACHANDRAN, S. Congenital chikungunya. **Journal of the Clinical Neonatology.** v. 1, n.3, p.155–156, 2012.
- GOMES, Isabel Cristina Guerra et al. Caracterização molecular dos sorotipos da dengue e correlação dos índices pluviométricos e dos casos de dengue na Paraíba, no período de 2007-2015. 2016.
- GRAY, P.M.; ARIMILLI, S.; PALMER, E. M.; PARKS, G. D.; ALEXANDER-MILLER, M. A. Altered function in CD8+ T cells following paramyxovirus infection of the respiratory tract. **Journal of Virology**. v.79, n.6, p. 3339–49, 2005.
- GRIFFIN in *Fields Virology* 5<sup>th</sup> edn (eds Knipe, D. M. &Howley, P. M.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1023-1066, 2007.
- GRIVARD, P.; LE ROUX, K.; LAURENT, P.; FIANU, A.; PERRAU, J.; GIGAN, J.; HOARAU, G.; GRONDIN, N.; STAIKOWSKY.; FAVIER, F. MICHAULT A. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. **Pathologie-Biologie (Paris).** v.55, n.10, p.490–494, 2007.
- HADDOCK, A. M.; PATEL, K. R.; ALSTON, W. C.; KERR, J. W. Response of lymphocyte guanyl cyclase to propranolol, noradrenaline, thymoxamine, and

- acetylcholine in extrinsic bronchial asthma. **British Medical Journal.** v.2, p.357–359, 1975.
- HEIKEMA, A. P.; ISLAM, Z.; HORST-KREFT, D.; HUIZINGA, R.; JACOBS, B. C.; WAGENAAR, J. A. POLY, F.; GUERRY, P.; VAN BELKUM, A.; PARKER, C. T.; ENDTZ, H. P. Campylobacter jejuni capsular genotypes are related to Guillain-Barré syndrome. Clinical Microbiology and Infection. v.21, n.9, p. 852 e1-9, 2015.
- HER, Z.; MALLERET, B.; CHAN, M.; ONG, E. K.; WONG, S. C.; KWEK, D. J.; TOLOU, H.; LIN, R. T.; TAMBYAH, P.A.; RÉNIA, L.; NG, L. F. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immuneresponse. The **Journal of Immunology.** v.184, p.5903-13, 2010.
- HOARAU, J. J.; BANDJEE, M. C. J.; TROTOT, P. K.; DAS, T.;LI-PAT-YUEN, G.; DASSA, B.; DENIZOT, M.; GUICHARD, E.; RIBERA, A.; HENNI, T.; TALLET, F.; MOITON, M. P.; GAUZÈRE, B. A.; BRUNIQUET, S.; JAFFAR-BANDJEE, Z.; MORBIDELLI, P.; MARTIGNY, G.; JOLIVET, M.; GAY, F.; GRANDADAM, M.; TOLOU, H.; VIEILLARD, V.; DEBRÉ, P.; AUTRAN, B.; GASQUE, P. 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.
- HONÓRIO, Nildimar Alves et al. Chikungunya: an arbovirus infection in the process of establishment and expansion in Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 31, n. 5, p. 906-908, 2015.
- HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M.; BUCKLEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. **Annual Review Pharmacology and Toxicology.** v.30, p. 633–673, 1990.
- HUNSPERGER, E. A.; YOKSAN, S.; BUCHY, P.; NGUYEN, V. C.; SEKARAN, S. D.; ENRIA, D. A.; GUZMAN, M. G. Evaluation of commercially available diagnostic tests for the detection of dengue virus NS1 antigen and anti-dengue virus IgM antibody. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3171, 2014.
- ILLIANO, G.; TELL, G. P. E.; SIEGEL, M. I.,; CUATRECASAS, P. Guanosine 39:59-cyclic monophosphate and the action of insulin and acetylcholine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.70, p.2443–2447, 1973.
- JAIN, J.; KUSHWAH, R. B. S.; SINGH, S. S.; SHARMA, A.; ADAK, T.; SINGH, O. P.; BHATNAGAR, R. K.; SUBBARAO, S. K.; SUNIL, S. Evidence for natural vertical transmission of chikungunya viruses in field populations of Aedes Aegypti in Delhi and Haryana states in India-a preliminary report. **Acta Tropica.** v. 162, p. 46–55, 2016.
- JAIN, J.; MCCAFFREY, P. G.; VALGE-ARCHER, V. E.; RAO, A. Nuclear factor of activated T cells contains Fos and Jun. **Nature**. v.356, p. 801–804, 1992.
- JAIN, M.; RAI, S.; CHAKRAVARTI, A. Chikungunya: a review. **Tropical Doctor**. v.38, n.2, p.70–72, 2008.

JOHNSON, B.W.; RUSSELL, B.J.; GOODMAN, C.H. Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. The **Journal of Infectious Diseases.** v.214 (suppl 5), p.S471–S474, 2016.

JOST, S.; ALTFELD, M. Control of human viral infections by natural killer cells. **Annual review of immunology**, v. 31:163-94, 2013.

JÓŹWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J. Z. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica**. v. 71, n. 1, p. 11-23, 2014.

KAM, Y.W.; ONG, E.K.; RÉNIA, L.; TONG, J.C.; NG, L.F. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. **Microbes and Infection**. v.11, n.14-15, p. 1186–1196, 2009.

KATZ, P.; ZAYTOUN, A. M.; FAUCHI, A. S. Mechanism of human cell-mediated cytotoxicity. I. Modulation of natural killer cell activity by cyclic nucleotides. The **Journal of Immunology.** v, 129, p. 287–296, 1982.

KAUR, P.; CHU, J.J. Chikungunya virus: an update on antiviral development and challenges. **Drug Discovery Today**. v.18, n.19-20, p. 969–983, 2013.

KAWASHIMA K; FUJII T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 86, Issue 1, p.29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function. **Life sciences**, v. 91, n. 21, p. 1027-1032, 2012.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H.; HORIGUCHI, K. Non-neuronal cholinergic system in regulation of immune function with a focus on α7 nAChRs. **International immunopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 127-134, 2015.

KAWASHIMA, K.; YOSHIKAWA, K.; FUJII, Y. X.; MORIWAKI, Y.; MISAWA, H. Expression and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells. **Life sciences**, v. 80, n. 24, p. 2314-2319, 2007.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life sciences**, v. 74, n. 6, p. 675-696, 2003.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. **Life sciences**, v. 72, n. 18, p. 2101-2109, 2003.

KELVIN, A. A.; BANNER, D.; SILVI, G.; MORO, M. L.; SPATARO, N.; GAIBANI, P.; CAVRINI, F.; PIERRO, A.; ROSSINI, G.; CAMERON, M.J.; BERMEJO-MARTIN, J.F.; PAQUETTE S.G.; XU, L.; DANESH, A.; FAROOQUI, A.; BORGHETTO, I.; KELVIN, D.J.; SAMBRI, V.; RUBINO S. Inflammatory cytokine expression is associated with chikungunya virus resolution and symptom severity. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 8, p. e1279, 2011.

- KHAN, H.; JAWAD, M.; KAMAL, M. A.; BALDI, A.; XIAO, J.; NABAVI, S. M.; DAGLIA, M. Evidence and prospective of plant derived flavonoids as antiplatelet agents: Strong candidates to be drugs of future. **Food and chemical toxicology**, v. 119, p. 355-367, 2018.
- KHAN, M.; SANTHOSH, S.R.; TIWARI, M.; LAKSHMANA-RAO P.V.; PARIDA, M. Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. **Journal of Medical Virology**. v.82, n.5, p.817–824, 2010.
- KIM, S. Y.; CHOE, K. W.; PARK, S.; YOON, D.; OCK, C. Y.; HONG, S. W.; HEO, J. Y. Mild form of Guillain-Barré syndrome in a patient with primary Epstein-Barr virus infection. Korean. **Journal of Internal Medicine.** v.31, n.6, p.1191–1193, 2016.
- KOGA, Rosemary de Carvalho Rocha. ASPECTOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS DE INDIVÍDUOS COM SINAIS E SINTOMAS DE FEBRE CHIKUNGUNYA. 2017. 63 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Ciências Ambientais e Saúde) Pontificia Universidade Católica de Goiás, Goiânia GO
- KUCHARZ, E.J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. European journal of internal medicine. v. 23, n. 4, p. 325-329, 2012.
- KULKARNI, S.; MARTIN, M.P.; CARRINGTON, M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. **Seminars in Immunology.** v.20, p. 343-52, 2008.
- KUMAR, S.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GIRY, C.; DE KERILLIS, L. C.; MERITS, A.; GASQUE, P.; HOARAU, J. J. Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection. **Virology Journal.** v.9, n.1, p. 313, 2012.
- LABADIE, K.; LARCHER, T.; JOUBERT, C.; MANNIOUI, A.; DELACHE, B.; BROCHARD, P.; GUIGAND, L.; DUBREIL, L.; LEBON, P.; VERRIER, B.; DE LAMBALLERIE, X.; SUHRBIER, A.; CHEREL, Y.; LE GRAND, R.; ROQUES, P. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 3, p. 894, 2010.
- LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; PANELLA, A. J.; VELEZ, J. O.; LAMBERT, A. J.; CAMPBELL, G. L. Chikungunya virus in US travelers returning from India. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 5, p. 764, 2007.
- LANI, R.; HASSANDARVISH, P.; CHIAM, C. W.;, MOGHADDAM, E.; CHU, J. J. H.; RAUSALU, K.; MERITS, A.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D.; ABU BAKAR, S.; ZANDI, K. Antiviral activity of Silymarin against Chikungunya virus. **Scientific Report**. v.5, p.11421, 2015.
- LEBRUN, G.; CHADDA, K.; REBOUX, A.H.; MARTINET, O.; GAÜZÈRE, B.A. Guillain-Barré syndrome after chikungunya infection. **Emerging infectious diseases**. v.15, n.3, p. 495–496, 2009.

- LECHNER, F.; WONG, D. K. H.; DUNBAR, R. P.; CHAPMAN, R.; CHUNG, R. T.; DOHRENWEND, P.; ROBBINS, G.; PHILLIPS, R.; KLENERMAN, P.; WALKER, B. D., Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus.. **Journal of Experimental Medicine**. v.191, p.1499–1512, 2000.
- LEE, R. C.; HAPUARACHCHI, H. C.; CHEN, K. C.; HUSSAIN, K. M.; CHEN, H.; LOW, S. L.; NG, L. C;, LIN, R.; NG, M.M; CHU, J. J. H. Mosquito cellular factors and functions in mediating the infectious entry of chikungunya virus. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 2, p. e2050, 2013.
- LEE, S. H.; KIM, K. S.; FODIL-CORNU, N.; VIDAL, S. M.; BIRON, C. A. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 10, p. 2235-2251, 2009.
- LEE, V. J.; CHOW, A.; ZHENG, X.; CARRASCO, L. R.; COOK, A. R.; LYE, D. C.; NG, L.C.; LEO, Y. S. Simplclinical and laboratory predictors of Chikungunya versus dengue infections in adults. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v.6, n.9, p. e1786, 2012.
- LEIS, A.A.; STOKIC, D.S. Neuromuscular manifestations of west Nile virus infection. **Frontiers of Neurology**. v.3, p. 37, 2012.
- LIM, E.X.Y.; LEE, W.S.; MADZOKERE, E.T.; HERRERO, L.J. Mosquitoes as suitablevectors for alphaviruses. Viruses. v.10, n2, 2018.
- LIMA-CAMARA, T. N. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de saude publica.** v. 50, 2016.
- LIU, Z.; HAN, B.; LI, P.; WANG, Z.; FAN, Q. Activation of  $\alpha$ 7nAChR by Nicotine Reduced the Th17 Response in CD4  $^+$  T Lymphocytes. **Immunological Investigations.** v. 43, n. 7, p. 667–674, 2014.
- LONG, K. M.; WHITMORE, A. C.; FERRIS, M. T.; SEMPOWSKI, G. D.; MCGEE, C.; TROLLINGER, B.; GUNN, B.; HEISE, M. T. Dendritic cell immunoreceptor regulates Chikungunya virus pathogenesis in mice. **Journal of Virology.** v.87, n.10, p.5697-5706, 2013.
- LOPEZ-CABRERA, M.; MUNOZ, E.; BLAZQUEZ, M. V.; URSA, M. A.; SANTIS, A. G.; SANCHEZ-MADRID, F. Transcriptional regulation of the gene encoding the human C-type lectin leukocyte receptor AIM/CD69 and functional characterization of its tumor necrosis factor-alpha-responsive elements. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 270, p. 21545–21551, 1995.
- LOPEZ-CABRERA, M.; SANTIS, A. G.; FERNANDEZ-RUIZ, E.; BLACHER, R.; ESCH, F.; SANCHEZ-MATEOS, P.; SANCHEZ-MADRID, F. Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. **The Journal of Experimental Medicine.** v.178, p.537–547, 1993.

- LUKENS, M. V.; CLAASSEN, E. A.; DE GRAAFF, P. M.; VAN DIJK, M. E.; HOOGERHOUT, P.; TOEBES, M.; SCHUMACHER, T.N.; VAN DER MOST, R. G.; KIMPEN, J. L.; VAN BLEEK, G. M. Characterization of the CD8+ T cell responses directed against respiratory syncytial virus during primary and secondary infection in C57BL/6 mice. **Virology**. v.352, n.1, p.157–68, 2006.
- LIMA, J. M.; SARMENTO, R. R.; SOUZA, J. R.; SANTOS, F. B.; SAMPAIO, A. P.; PADILHA, R.; ALVES, L. C.; PORTO, I. J.; BONAN, R. F.; OLIVEIRA, J. E.; MEDEIROS, E.; BONAN, P. R. F.; CASTELLANO, L. R. . Evaluation of Hemagglutination Activity of Chitosan Nanoparticles Using Human Erythrocytes. **Biomed Research International**. v. 2015, p. 1-6, 2015.
- LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II.General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33-57, 1955.
- LYRA, P. P. R.; CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, I. D.; SARDI, S. I.; DE MOURA COSTA, L. F.; SANTOS, F. R.; RIBEIRO, C. A. R.; JARDIM, A. M. B.; SANTIAGO, A. C. T.; DE OLIVEIRA, P. M. R.; MOREIRA, L. M. O. Congenital chikungunya virus infection after an outbreak in Salvador, Bahia, Brazil. **American Journal of Perinatology Reports.** v.6, n.3, p.e299–e300, 2016.
- MACIEL, B. L. L.; VALVERDE, J. G.; RODRIGUES-NETO, J. F.; FREIRE-NETO, F.; KEESEN, T. S. L.; JERONIMO, S. M. B. Dual Immune modulatory effect of vitamin a in human visceral leishmaniasis. **Plos One.** v. 9, p. e107564, 2014..
- MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E.L.; LEME, D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. Colombo, PR: Embrapa. P.3. Comunicado técnico, 427, 2018.
- MAGER, L. F.; WASMER, M. H.; RAU, T. T.; KREBS, P. Cytokine-induced modulation of colorectal cancer. **Frontiers in oncology.** v. 6, p. 96, 2016.
- MALMBERG, K. J.; BEZIAT, V.; LJUNGGREN, H.G. Spotlight on NKG2C and the human NK-cell response to CMV infection. **European Journal of Immunology.** v.42, p. 3141-5, 2012.
- MANIMUNDA, S. P.; VIJAYACHARI, P.; UPPOOR, R.; SUGUNAN, A. P.; SINGH, S. S.; RAI, S. K.; SUDEEP A. B.; MURUGANANDAM, N.;, CHAITANYA, I. K.; GURUPRASAD, D. R. 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 and Medicine and Hygiene.** v.104, n.6, p. 392–399, 2010.
- MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic options and challenges for dengue and chikungunya viruses. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- MARIS, C.H.; CHAPPELL, C.P.; JACOB, J. Interleukin-10 plays an early role in generating virus-specific T cell anergy. **BMC Immunology**. v8, n.8, 2007.

MARQUES, A. D. S.; ZHENG, C.; LIN, C. T.; TAKAHATA, Y.; BARBOSA-FILHO, M.; GUTIERREZ, S. J. C. Electronic and structural effects in muscular relaxants: Riparin I and Riparin III. **Journal of molecular structure**, v. 753, n. 1, p. 13-21, 2005.

MARQUES, C.A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. Floresta Ambiente, v.8, p.195–206, 2001.

MARTÍNEZ-PULGARÍN, D.F.; CHOWDHURY, F.R.; VILLAMIL-GOMEZ, W.E.; RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; BLOHM, G.M.; PANIZ-MONDOLFI, A.E. Ophthalmologic aspects of chikungunya infection. **Travel Medicine Infectious Disease** v.14, n.5, p. 451–457, 2016.

MASHIMO, M.; YURIE, Y.; KAWASHIMA, K.; FUJI, T. CRAC channels are required for [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations and c-fos gene expression after muscarinic acetylcholine receptor activation in leukemic T cells. **Life Science.** v.161, p. 45e50, 2016.

MASHIMO, M.; IWASAKI, Y.; INOUE, S.; SAITO, S.; KAWASHIMA, K; FUJII, T. Acetylcholine released from T cells regulates intracellular Ca2 +, IL-2 secretion and T cell proliferation through nicotinic acetylcholine receptor. **Life Sciences**, v. 172, p. 13–18, 1 mar. 2017.

MASLINSKI, W.; KULLBERG, M.; NORDSTROM, O.; BARTFAI, T. Muscarinic receptors and receptor-mediated actions on rat lymphocytes. **The Journal of Immunololy.** v.17, p.265–274, 1988.

MAŚLIŃSKI, W. Cholinergic receptors of lymphocytes. **Brain, behavior, and immunity**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 1989.

MASTURZO, P.; SALMONA, M.; NORDSTROM, O.; CONSOLO, S.; LADINSKY, H. Intact human lymphocytes membranes respond to muscarinic receptor stimulation by oxotremorine with marked changes in microviscosity and an increase in cyclic GMP. **FEBS Letters** v.192, p.194–198, 1985.

MATUSALI, G.; COLAVITA, F.; BORDI, L.; LALLE, E.; IPPOLITO, G.; CAPOBIANCHI, M. R.; CASTILLETTI, C. Tropism of the Chikungunya Virus. **Viruses.** v.11, p. 175, 2019.

MAVALE, M.; PARASHAR, D.; SUDEEP, A.; GOKHALE, M.; GHODKE, Y.; GEEVARGHESE, G.; ARANKALLE, V.; MISHRA, A. C. 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.

MAYNARD, C.L.; WEAVER, C. T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. **Immunological Reviews**. v. 226, p. 219–233, 2008.

MELO, C. T. V.; CARVALHO, A. M. R.; MOURA, B.A.; TEIXEIRA, C. P. L.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; FONTELESA, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.;

- SOUSA, F. C. F. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. V. 27 (2013) 104–112, 2013.
- MINER J.J.; AW YEANG, H. X; FOX JM, TAFFNER S, MALKOVA ON, OH ST et al. Brief report: chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**. V. 67, p. 1214–20, 2015.
- MIOSSEC P. IL-17, now an important target for treatment in arthritis! **Joint Bone Spine**. v.84, p.247, 2017.
- MIOSSEC, P.; JAY K. Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation. **Nature reviews Drug discovery**. v. 11, n. 10, p. 763, 2012.
- MOHAN, A.; KIRAN, D. H. N.; MANOHAR, I. C.; KUMAR, D. P. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. **Indian journal of dermatology**, v. 55, n. 1, p. 54, 2010.
- MORALES-PEREZ, C. L.; NOVIELLO, C. M.; HIBBS, R. E. X-ray structure of the human α4β2 nicotinic receptor. **Nature**, v. 538, n. 7625, p. 411–415, 2016.
- MORRISON, T. E.; OKO, L.; MONTGOMERY, S. A.; WHITMORE, A. C.; LOTSTEIN, A. R.; GUNN, B. M.; ELMORE, S. A.; HEISE, M. T. A mouse model of chikungunya virus—induced musculoskeletal inflammatory disease: Evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. **The American journal of pathology**. v. 178, n. 1, p. 32-40, 2011.
- Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. Bol Epidemiol [Internet]. 2019 set [data da citação]; 50(n.esp.):1-154. Disponível em: http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos
- MURRAY P. J. The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.102, n.24, p.8686-8691, 2005.
- NAKKHARA, P.; CHONGSUVIVATWONG, V.; THAMMAPALO, S. Risk factors for symptomatic and asymptomatic chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. v.107, n.12, p. 789–796, 2013.
- NASCI, R. S. Movement of chikungunya virus into the Western hemisphere. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 8, p. 1394, 2014.
- NG, L. F.; CHOW, A.; SUN, Y. J.; KWEK, D. J.; LIM, P. L.; DIMATATAC, F.; NG, L.C.; OOI, E.E.; CHOO, K.H.; HER, Z.; KOURILSKY, P.; LEO, Y.S. KOURILSKY, P. IL-1β, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PloSone**, v. 4, n. 1, p. e4261, 2009.

- NG, L. C.; HAPUARACHCHI, H. C. Tracing the path of Chikungunya virus—evolution and adaptation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 876-885, 2010.
- NUNES, G. B.; POLICARPO, P. R.; COSTA, L. M.; DA SILVA, T.; MILITÃO, G. C.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J.; ISLAM, M.T.; DE FREITAS, R. M. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparinderived compounds. **Molecules**. v. 19, n. 4, p. 4595-4607, 2014.
- OEHLER, E.; FOURNIER, E.; LEPARC-GOFFART, I.; LARRE, P.; CUBIZOLLE, S.; SOOKHAREEA, C.; LASTERE, S.; GHAWCHE, F. Increase in cases of Guillain-Barré syndrome during a Chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014 to 2015. **Euro Surveillance**. v.20, n.48, p.30079, 2015.
- OFT, M. No immunosurveillance in human IL-10R deficiency. **Blood**. v.122, p.3702–3703, 2013.
- OZDEN, S.; LUCAS-HOURANI, M.; CECCALDI, P. E.; BASAK, A.; VALENTINE, M.; BENJANNET, S.; HAMELIN, J.; JACOB, Y.; MAMCHAOUI, K.; MOULY, V.; DESPRÈS, P.; GESSAIN, A.; BUTLER-BROWNE, G.; CHRÉTIEN, M.; TANGY, F.; VIDALAIN, P.O.; SEIDAH, N. G. Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. **The Journal of Biological Chemistry.** v.283, n.32, p. 21899–908, 2008.
- PAL, P. Molecular Characterization of a Novel, Highly Protective Combination Monoclonal Antibody Therapy against Chikungunya Virus. Washington University in St. Louis, 2015.
- PALHA, N.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; BRIOLAT, V.; LUTFALLA, G.; SOURISSEAU, M.; ELLETT, F.; WANG, C. H.; GRAHAM J. L.; HERBOMEL, P.; OLIVIER SCHWARTZ, O.; LEVRAUD, J.P. Real-time whole-body visualization of Chikungunya Virus infection and host interferon response in zebrafish. **PLoS pathogens.** v. 9, n. 9, p. e1003619, 2013.
- PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: emerging arboviruses in the new world. **The Western Journal Emergency Medicine**. v.17, n.6, p. 671–679, 2016.
- PAVLOV, V. A.; PARRISH, W. R.; ROSAS-BALLINA, M.; OCHANI, M.; PUERTA, M.; OCHANI, K.; CHAVAN, S.; AL-ABED, Y. TRACEY, K. J. Brain acetylcholinesterase activity controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, n. 1, p. 41-45, 2009.
- PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, n. 18, p. 2322-2331, 2004.

- PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS, A. M.; HONEIN, M. A. Zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552-1563, 2016.
- PETITDEMANGE, C.; BECQUART, P.; WAUQUIER, N.; BÉZIAT, V.; DEBRÉ, P.; LEROY, E. M., VIEILLARD, V. Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. **PLoS Pathogens.** v.7, n.9, p. e1002268, 2011.
- PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 135, n. 4, p. 846-855, 2015.
- PETRELLI, A.; VAN WIJK, F. CD8+ T cells in human autoimmune arthritis: the unusual suspects. **Nature Reviews Rheumatology.** v. 12, n. 7, p. 421-428, 2016.
- PIALOUX, G.; GAÜZÈRE, B.A.; JAURÉGUIBERRY, S.; STROBEL, M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **The Lancet Infectious. Disease**. v.7, n.5, p. 319–327, 2007.
- POWERS, A. M.; BRAULT, A. C.; SHIRAKO, Y.; STRAUSS, E. G.; KANG, W.; STRAUSS, J. H.; WEAVER, S. C. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of Virology**, v. 75, n. 21, p. 10118-10131, 2001.
- PRAT, C. M.; FLUSIN, O.; PANELLA, A.; TENEBRAY, B.; LANCIOTTI, R..; LEPARC-GOFFART, I. Evaluation of commercially available serologic diagnostic tests for chikungunya virus. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 12, p. 2129, 2014.
- QIAN, J.; GALITOVSKIY, V.; CHERNYAVSKY, A. I.; MARCHENKO, S.; GRANDO, S. A. Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naive CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages. **Genes and immunity**, v. 12, n. 3, p. 222-230, 2011.
- RAMPAL; SHARDA, M.; MEENA, H. Neurological complications in Chikungunya fever. **The Journal of the Association of Physicians of India**. v.55, p.765–7691, 2007.
- REARDON, C.; DUNCAN, G. S.; BRÜSTLE, A.; BRENNER, D.; TUSCHE, M. W.; OLOFSSON, P. S.; ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K.J.; MAK, T. W. Lymphocyte-derived ACh regulates local innate but not adaptive immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v. 110, n. 13, p. 5269, 2013.
- REDDY, V.; RAVI, V.; DESAI, A.; PARIDA, M.; POWERS, A. M.; JOHNSON, B. W. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. **Journal of medical virology**. v. 84, n. 11, p. 1771-1778, 2012.
- RENAULT, P.; SOLET, J. L.; SISSOKO, D.; BALLEYDIER, E.; LARRIEU, S.; FILLEUL, L.; LASSALLE, C.; THIRIA, J.; RACHOU, E.; DE VALK, H.; ILEF, D.; LEDRANS, M.; QUATRESOUS, I.; QUENEL, P.; PIERRE, V. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. **The American journal of tropical medicine and hygiene**. v. 77, n. 4, p. 727-731, 2007.

- REHERMANN, B., CHANG, K., MCHUTCHINSON, J., KOKKA, R., HOUGHTON, M., RICE, C. AND CHISARI, F. Differential CTL responsiveness to hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. **Journal of Virology**. V.70, p.7092–7102, 1996.
- REHERMANN, B., CHANG, K., MCHUTCHINSON, J., KOKKA, R., HOUGHTON, M. AND CHISARI, F. Quantitative analysis of the peripheral blood CTL response in patients with chronic HCV infection. **Journal of Clinical Investigation**. V. 98, p. 1432–1440, 1996.
- ROBIN, S.; RAMFUL, D.; ZETTOR, J.; BENHAMOU, L.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; RIVIÈRE, J. P.; MARICHY, J.; EZZEDINE, K.; ALESSANDRI, J. L. Severe bullous skin lesions associated with Chikungunya virus infection in small infants. **European journal of pediatrics**. v. 169, n. 1, p. 67, 2010.
- ROGERS MC; WILLIAMS J V. Reining in the CD8+ T cell: Respiratory virus infection and PD-1-mediated T-cell impairment. **Plos pathogens**. V. 15, n.1, p. e1007387, 2019.
- ROUZAIRE, P.; LUCI, C.; BLASCO, E.; BIENVENU, J.; WALZER, T.; NICOLAS, J. F.; HENNINO, A. Natural killer cells and T cells induce different types of skin reactions during recall responses to haptens. **European journal of immunology**, v. 42, n. 1, p. 80-88, 2012.
- ROZÉ, B.; NAJIOULLAH, F.; FERGÉ, J. L.; DORLÉANS, F.; APETSE, K.; BARNAY, J. L.; DAUDENS-VAYSSE E.; BROUSTE, Y.; CÉSAIRE, R.; FAGOUR, L.; VALENTINO, R.; LEDRANS, M.; MEHDAOUI, H.; ABEL, S.; LEPARC-GOFFART, I.; SIGNATE, A.; CABIÉ, A. GUILLAIN-BARRÉ SYNDROME ZIKA WORKING GROUP OF MARTINIQUE. Guillain-Barré syndrome associated with zika virus infection in Martinique in 2016: a prospective study. Clinical Infectious. Disease. v.65, n.9, p. 1462–1468, 2017.
- RUDD, P. A.; WILSON, J.; GARDNER, J.; LARCHER, T.; BABARIT, C.; LE, T. T.; ANRAKU, I.; KUMAGAI, Y.; LOO, Y. M.; GALE, M. JR.; AKIRA, S.; KHROMYKH, A.A.; SUHRBIER, A. Interferon response factors 3 and 7 protect against Chikungunya virus hemorrhagic fever and shock. **Journal of virology**. v. 86, n. 18, p. 9888-9898, 2012.
- RULLI, N. E.; SUHRBIER, A.; HUESTON, L.; HEISE, M. T.; TUPANCESKA, D.; ZAID, A.; WILMES A.; GILMORE, K.; LIDBURY, B.A.; MAMAHALINGAM, S. Ross River virus: molecular and cellular aspects of disease pathogenesis. **Pharmacology&therapeutics**. v. 107, n. 3, p. 329-342, 2005.
- RUTIGLIANO, J. A.; SHARMA, S.; MORRIS, M. Y.; OGUIN, T. H.; MCCLAREN, J. L.; DOHERTY, P. C.; THOMAS, P. G. Highly pathological influenza A virus infection is associated with augmented expression of PD-1 by functionally compromised virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells. **Journal of Virology**. v.88, n.3, p.1636–51, 2014.
- SANTIAGO, R. F.; DE BRITO, T. V.; DIAS, J. M.; DIAS, G. J.; DA CRUZ, J. S.; BATISTA, J. A.; SILVA, R.O.; SOUZA, M. H.; DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R.;

- GUTIERREZ, S. J.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V.; DOS REIS BARBOSA, A. L. 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, K. Z.; FUJII, T.; WATANABE, Y.; YAMADA, S.; ANDO, T.; KAZUKO, F.; KAWASHIMA, K. 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.
- SCHILTE, C.; STAIKOVSKY, F.; COUDERC, T.; MADEC, Y.; CARPENTIER, F.; KASSAB, S.; MATTHEW L.; A.; LECUI, M.; MICHAULT, A. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Neglected. Tropical Diseases.** v.7, n.3, p.e2137, 2013.
- SCHONRICH G.; RAFTERY M.J. The PD-1/PD-L1 Axis and Virus Infections: A Delicate Balance. **Frontiers in cellular and infection microbiology.** V. 13, n.9, p. 207, 2019.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491-500, 2010.
- SHRESTHA B.; DIAMOND M.S. Fas ligand interactions contribute to CD8+ T-cell-mediated control of West Nile virus infection in the central nervous system. **Journal of virology**. v.81, n. 21, p. 11749-57, 2007.
- SILVA J.V.J, JR.; LUDWIG-BEGALL, L. F.; OLIVEIRA-FILHO, E. F.; OLIVEIRA, R.A.S.; DURÃES-CARVALHO, R.; LOPES, T.R.R.; SILVA, D.E.A; GIL, L.H.V.G.. A scoping review of Chikungunya virus infection: Epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. **Acta tropica**. v.188, p. 213-224, 2018.
- SILVA, L. A.; KHOMANDIAK, S.; ASHBROOK, A. W.; WELLER, R.; HEISE, M. T.; MORRISON, T. E.; DERMODY, T. S. A single-amino-acid polymorphism in Chikungunya virus E2 glycoprotein influences glycosaminoglycan utilization. **Journal of virology**. v. 88, n. 5, p. 2385-2397, 2014.
- SILVA, L.A., DERMODY, T.S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**. v.127, n.3, p. 737–749, 2017.
- SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R.; SILVA, I. S.; SILVA, V. G.; BRITO, C. F.; TEIXEIRA, A. É.; NUNES, G.B.; CAMARA, C.A.; FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S.J.; RIBEIRO, R.A. SOUZA, M.H.; BARBOSA, A.L.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J.V. 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.

- SIMON, F.; JAVELLE, E.; OLIVER, M.; LEPARC-GOFFART, I.; MARIMOUTOU, C. Chikungunya virus infection. **Current Infection Disease.** v. 13, p. 218–228, 2011.
- SIMON, O.; BILLOT, S.; GUYON, D.; DAURES, M.; DESCLOUX, E.; GOURINAT, A. C.; MOLKO, N.; DUPONT-ROUZEYROL, M. Early Guillain-Barré syndrome associated with acute dengue fever. **Journal of Clinical Virology**. v.77, p29–31, 2016.
- SISSOKO, D.; MALVY, D.; EZZEDINE, K.; RENAULT, P.; MOSCETTI, F.; LEDRANS, M.; PIERRE, V. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Neglected. Tropical Diseases.** v.3, n.3, p. e389, 2009.
- SMALLEY, C.; ERASMUS, J. H.; CHESSON, C. B.; BEASLEY, D. W. Status of research and development of vaccines for chikungunya. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2976-2981, 2016.
- SOARES, A.M., TICLI, F.K.; MARCUSSI,S.; LOURENÇO, M.V.; JANUÁRIO, A. H.; SAMPAIO, S.V.; J.R. GIGLIO, J.R.; LOMONTE, B.; PEREIRA, P.S. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. **Current Medicinal Chemistry**. v.12, p. 2625–2641, 2005.
- SOH, L. T.; SQUIRES, R. C.; TAN, L. K.; POK, K. Y.; YANG, H.; LIEW, C.; SHAH, A. S.; AASKOV, J.; ABUBAKAR, S.; HASABE, F.; NG, L. C.; KONINGS, F. External quality assessment of dengue and chikungunya diagnostics in the Asia Pacific region, 2015. **Western Pacific surveillance and response journal: WPSAR**, v. 7, n. 2, p. 26, 2016.
- SPECIAL EDITION ON INFECTIOUS DISEASE. Chikungunya Virus on the Move. Harvard university 31 dezembro, 2014. Acesso em Agosto/ 2019-http://sitn.hms.harvard.edu/flash/special-edition-on-infectious disease/2014/chikungunya-virus-on-the-move.
- SRENATHAN, U.; STEEL, K.; TAAMS, L. S. IL-17<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells: differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. **Immunology letters**. v. 178, p. 20-26, 2016.
- STAPLES, J. E.; FISCHER, M. Chikungunya virus in the Americas—what a vector borne pathogen can do. **The New England Journal of Medicine.** v. 2014, n. 371, p. 887-889, 2014.
- STAPLES, J.E., BREIMAN, R.F., POWERS, A.M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. Clinical Infectious Diseases. v49, n.6, p. 942–948, 2009.
- STEGER, C.M., ANTRETTER, H., HÖFER, D. Guillain-Barré syndrome due to CMV reactivation after cardiac transplantation. **Case Reports in Cardiology**. v. 2012, p.506290, 2012.
- STEVENSON, P. G.; BELZ, G. T.; ALTMAN, J. D.; DOHERTY, P. C. Virus-specific CD81 T cell numbers are maintained during  $\gamma$ -herpesvirus reactivation in CD4+

- deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America. V. 95, p. 15565–15570, 1998
- STROM, T. B., CARPENTER, C. B., GAROVOY, M. R., AUSTEN, K. F., MERRILL, J. P.; KALNER, M. The modulating influence of cyclic nucleotides upon lymphocytemediated cytotoxicity. **The Journal of Experimental Medicine.** v.138, p. 381–399, 1973.
- STROM, T. B., DEISSEROTH, A., MORGANROTH, J., CARPENTER, C. B., & MERRILL, J. P. Alteration of the cytotoxic action of sensitized lymphocytes by cholinergic agents and activators of adenylate cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.69, p.2995–2999, 1972.
- STROM, T. B., LANE, M. A.; GEORGE, K. The parallel, time-dependent, bimodal change in lymphocyte cholinergic binding activity and cholinergic influence upon lymphocyte-mediated cytotoxicity after lymphocyte activation. **The Journal of Immunology.** v.127, p. 705–710, 1981.
- STROM, T. B.; SYTKOWSKI, A. J.; CARPENTER, C. B.; MERRILL, J. P. Cholinergic augmentation of lymphocyte-mediated cytotoxicity: a study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 71, p. 1330–1333, 1974.
- SUBUDHI, B.B.; CHATTOPADHYAY, S.; MISHRA, P.; KUMAR, A. Current strategies for inhibition of chikungunya infection. **Viruses** v.10, n.5, 2018.
- SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses-overview. **Nature Reviews Rheumatology**. v. 8, n. 7, p. 420-429, 2012.
- TALARMIN, F.; STAÏKOWSKY, F.; SCHOENLAUB, P.; RISBOURG, A.; NICOLAS, X.; ZAGNOLI, A.; BOYER, P. Skin and mucosal manifestations of chikungunya virus infection in adults in Reunion Island. **Medecine Tropicale: revue du Corps de sante colonial**, v. 67, n. 2, p. 167-173, 2007.
- TANDALE, B. V.; SATHE, P. S.; ARANKALLE, V. A.; WADIA, R. S.; KULKARNI, R.; SHAH, S. V.; MISHRA, A. C. Systemic involvements and fatalities during Chikungunya epidemic in India, 2006. **Journal of Clinical Virology**. v.46, n.2, p. 145–149, 2009.
- TANABE, E. L. L.; SANTOS, E. C.; MARTINS, W.V.; ARAÚJO, I. M. T.C.; CAVALCANTE, M.C.A. LIMA, A.R.V.; CÂMARA, N. O. S.; ANDERSON, L.A.; YUNUSOV, D.; BASSI, E. J. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. V. 8:345, p.1-15, 2018.
- TEO, T. H.; HER, Z.; TAN, J. J.; LUM, F. M.; LEE, W. W.; CHAN, Y. H.; RÉNIA, L. Caribbean and La Reunion Chikungunya virus isolates differ in their capacity to induce pro-inflammatory Th1 and NK cell responses and acute joint pathology. **Journal of Virology**, p. 909-15, 2015.

- THAA, B.; BIASIOTTO, R.; ENG, K., NEUVONEN, M., GÖTTE, B.; RHEINEMANN, L.; MUTSO M.; UTT, A.; VARGHESE, F.; BALISTRERI, G.; MERITS, A. AHOLA, T.; MCINERNEY, G. M. Differential phosphatidylinositol-3-kinase-Akt-mTOR activation by Semliki forest and chikungunya viruses is dependent on nsP3 and connected to replication complex internalization. **Journal of virology**, v. 89, n. 22, p. 11420-11437, 2015.
- THIBERVILLE, S. D.; MOYEN, N.; DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; NOUGAIREDE, A.; GOULD, E. A.; ROQUES, P.; DE LAMBALLERIE, X. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral research**, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.
- THOMAS, G.; BRANCO, U. C.; FILHO, J. B.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. 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.
- TOMINAGA, K.; HATO, F.; KINOSHITA, Y.; TOMINAGA, M.; YAMADA, M. Enhancement of DNA synthesis in rat thymocytes by stimulatingtheir muscarinic acetylcholine receptors. Cellular and Molecular Biology. v.38, p. 815–822, 1992.
- VELDHOEN, M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. **Nature** immunology, v. 18, n. 6, p. 612, 2017.
- VENUGOPALAN, A.; GHORPADE, R. P.; CHOPRA, A. Cytokines in acute chikungunya. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e111305, 2014.
- VEZYS, V.; MASOPUST, D.; DESMARETS, M.; WESS, J.; ZIMRING, J.C. Analysis of CD8b T cell mediated anti-viral responses in mice with targeted deletions of the M1or M5 muscarinic cholinergic receptors. **Life Science**. v.80, p.2330-2333, 2007.
- VU, D. M.; JUNGKIND, D.; LABEAUD, A. D. Chikungunya Virus. Clinics in Laboratory Medicine, v. 37, n. 2, p. 371-382, 2017
- WALDOCK, J.; CHANDRA, N. L.; LELIEVELD, J.; PROESTOS, Y.; MICHAEL, E.; CHRISTOPHIDES, G.; PARHAM, P. E. The role of environmental variables on Aedes albopictus biology and chikungunya epidemiology. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 5, p. 224-241, 2013.
- WAUQUIER, N.; BECQUART, P.; NKOGHE, D.; PADILLA, C.; NDJOYI-MBIGUINO, A.; LEROY, E. M. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115-123, 2011.
- WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. In: Quasispecies: Concept and Implications for Virology. p. 285-314, 2006.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WESULA OLIVIA, L.; OBANDA, V.; BUCHT, G.; MOSOMTAI, G.; OTIENO, V.; AHLM, C.; EVANDER, M. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. **Infection ecology & epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 29853, 2015.

WICHIT, S.; HAMEL, R., BERNARD, E.; TALIGNANI, L.; DIOP, F.; FERRARIS, P. THOMAS, F. Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3145, 2017.

WINTACHAI, P.; THUAUD, F.; BASMADJIAN, C.; ROYTRAKUL, S.; UBOL, S.; DÉSAUBRY, L.; SMITH, D. R. Assessment of flavaglines as potential chikungunya virus entry inhibitors. **Microbiology and Immunology**. v.59, n.3, p. 129–141, 2015.

WINTACHAI, P.; WIKAN, N.; KUADKITKAN, A.; JAIMIPUK, T.; UBOL, S.; PULMANAUSAHAKUL, R..; PAEMANEE, A. Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. **Journal of Medical Virology**. v.84, n.11, p. 1757–1770, 2012.

WISSINGER, E. British Society for Immunology. (Acesso em 15 de Agosto de 2019) Imperial College London, UK. Public Information. Publication, 2019. https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/cells/cd8-tcells

WOLINT, P.; BETTS, M. R.; KOUP, R. A.; OXENIUS, A. Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells. **The Journal of Experimental Medicine.** v.199, p. 925–36, 2004.

World Health Organization, Regional Office for South-East Asia. (2008). Guidelines on clinical management of chikungunya fever (Acesso em agosto 2019). WHO Regional Office for South-East Asia. https://apps.who.int/iris/handle/10665/205178

WU, W.; BLEECKER, E.; MOORE, W.; BUSSE, W. W.; CASTRO, M.; CHUNG, K. F.; CURRAN-EVERETT, D. Unsupervised phenotyping of Severe Asthma Research Program participants using expanded lung data. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 133, n. 5, p. 1280–1288, 2014.

ZEICHNER, J.A.; ARMSTRONG A. The role of IL-17 in the pathogenesis and treatment of psoriasis. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**. V. 9(6 Suppl 1):S3, 2016.

ZENG, R.; SPOLSKI, R.; FINKELSTEIN, S. E.; OH, S.; KOVANEN, P.E.; HINRICHS, C. S.; PISE-MASISON, C. A.; RADONOVICH, M. F.; BRADY, J. N.; RESTIFO, N. P.; BERZOFSKY, J. A.; LEONARD, W. J. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8\_ T cell expansion and function. **The Journal of Experimental Medicine.** v.201, p. 139–148, 2005.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8<sup>+</sup> T cells: foot soldiers of the immune system. **Immunity**.v. 35, n. 2, p. 161-168, 2011.

ZHOU, S.; OU, R.; HUANG, L.; GRAEME E. PRICE, G. E.; MOSKOPHIDIS, D. Differential Tissue-Specific Regulation of Antiviral CD8<sup>+</sup> T-Cell Immune Responses during Chronic Viral Infection. **Journal of Virology.** p. 3578–3600, 2004

ZHU, L.; SHI, T.; ZHONG, C.; WANG, Y.; CHANG, M.; LIU, X. IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Research.** v.10, p. 65, 2017.

ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F.; HJERRILD, K. A.; ARMITAGE, R. J.; GRABSTEIN, K. H.; HENNEN, K. B.; ALDERSON, M. R. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. **European Journal of Immunology**. v.23, p.1643–1648, 1993.

ZIMRING, J. C.; KAPP, L. M.; YAMADA, M.; WESS, J.; KAPP, J. A. Regulation of CD8+ cytolytic T lymphocyte differentiation by a cholinergic pathway. **Journal of Neuroimmunology**. v.164, p. 66e75, 2005.

.

**Apêndice I** – Artigo publicado em tema relacionado a tese- QUALIS A1 – Área da Farmácia.





#### IMMUNOLOGY ORIGINAL ARTICLE

## Human CD8 T-cell activation in acute and chronic chikungunya infection

Cinthia Nóbrega de Sousa Dias,1 Bruna Macêdo Gois,1 Viviane Silva Lima,1 Isabel Cristina Guerra-Gomes,1 Josélio Maria Galvão Araújo,2 Juliana de Assis Silva Gomes,3 Demétrius Antônio Machado Araújo,4 Isac Almeida Medeiros,5 Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo,5 Robson Cavalcanti Veras,5 Daniele Idalino Janebro, 1 Ian Porto Gurgel do Amaral<sup>6</sup> and Tatjana Souza Lima Keesen1,6

<sup>1</sup>Immunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology of Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil, 2Molecular Biology of Cancer and Infectious Diseases Laboratory of Post-Graduation Programme on Parasite Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil, 3Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>4</sup>Department of Biotechnology, Federal University of Paraiba, João Pessoa, Brazil, 5 Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraiba, João Pessoa, Brazil and <sup>6</sup>Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraiba, João Pessoa, Brazil

doi:10.1111/imm.12992 Received 23 May 2018; revised 11 July 2018; accepted 6 August 2018. Correspondence: Tatjana Keesen de Souza Lima, Department of Cellular and Molecular Biology - Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, State of Paraíba, 58051-900, Brazil. Email: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br Senior author: Tatjana Souza Lima Keesen

#### Introduction

Chikungunya is an acute self-limiting disease characterized by a number of symptoms, including acute inflammation

## Summary

There is a need for more detailed elucidation of T-cell immunity in chikungunya infection. CD8 T cells are one of main actors against viruses. Here, we analysed CD8+ T lymphocytes from patients in the acute and chronic phases of chikungunya disease (CHIKD). Our results demonstrate that CD8+ T cells expressed higher ex vivo granzyme B, perforin and CD107A expression in patients in the acute phase of CHIKD compared with healthy individuals and higher ex vivo expression of CD69, interleukin-17A, interleukin-10 and CD95 ligand, and co-expression of CD95/ CD95 ligand. These results elucidate the importance of these lymphocytes, demonstrating immune mechanisms mediated in human chikungunya

Keywords: activation; CD8 T-cell; chikungunya infection; cytokines;

accompanied mainly by fever, muscle pain, skin rash, myalgia and arthralgia, which usually decrease after 7-10 days.1,2 In some individuals, this illness can develop into chronic disease.3 It occurs when infected individuals

Abbreviations: CHIKD, chikungunya disease; CHIKV, chikungunya virus; IL-10R, interleukin-10 receptor

experience an incapacitating arthralgia, which often includes signs of joint inflammation and tenosynovitis, that persists for months or years after the acute phase.  $^{4-6}$ 

Acute chikungunya virus (CHIKV) infection generates a strong immune response that is capable of eliminating circulating infectious virus, but the immunobiology of chronic disease is still not well understood.<sup>3,7</sup> T and B lymphocytes and dendritic cells derived from monocytes are not susceptible to CHIKV infection, and their role in killing infected cells or possibly in the pathogenesis of the disease remains to be established.<sup>8,9</sup>

CD8 T cells have an important role in virus infection and some authors have shown that CD8<sup>+</sup> T cells are involved early in CHIKV infection in humans<sup>10</sup> and have been detected in blood samples > 7 weeks after infection.<sup>11</sup> However, investigations of CD8<sup>+</sup> T cells' role in mechanisms regarding chikungunya disease (CHIKD) and rheumatic disorders have been limited, mainly by the difficulty of establishing relevant and accessible models to study the disease.

Here, we evaluate the expression of cytotoxic molecules and cytokines in CD8<sup>+</sup> T cells in individuals infected by CHIKV with acute and chronic disease. Apoptosis markers were also included to better characterize the expression profile of CD8<sup>+</sup> T cells. Our results demonstrate that CD8<sup>+</sup> T cells have higher cytotoxic molecule expression, mainly in individuals with acute CHIKD. Analysis of cytokines and apoptotic molecules has also demonstrated that some of these molecules are expressed in an increased manner in both phases of the disease. Our data provide for the first time new insights into the functional competence of CD8<sup>+</sup> T cells and suggest that modulation of the expression profile in CD8<sup>+</sup> T cells differs between the acute and chronic phases of CHIKD.

#### Materials and methods

Blood samples from patients infected with CHIKV were obtained from the Lauro Wanderley University Hospital, in the city of João Pessoa-Brazil. Infected patients were assigned to acute or chronic groups based on the observation of clinical symptoms of CHIKV infection, such as polyarthralgia, and associated symptoms (high fever, rash, swelling), to enable the evaluation of the long-term and short-term mechanisms involved in the pathophysiology of CHIKV infection. Clinical and biological examinations and blood sampling were performed in patients with symptoms ranging from 2 to 7 days (acute phase) and from 6 to 12 months (chronic phase). Informed consent was obtained from patients with CHIKV infection and from healthy volunteers (hospital staff) from the same local medical hospital. We recruited acutely and chronically infected individuals who were positive for CHIKV on polymerase chain reaction. Acute group (n = 4), chronic group (n=6) and healthy individuals (n=6) were evaluated. Viral RNA extractions were obtained from whole blood or serum samples using the QIAmp Viral Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, Spain) following the manufacturer's predetermined protocol. RNA was analysed by quantitative polymerase chain reaction to detect CHIKV. All samples were kept at  $-80^{\circ}$  until the study was started. This study was approved by the National Commission of Ethics in Research (Certificate number CAAE: 59833416.6.0000.5183).

Whole blood was collected from individuals and processed immediately for ex vivo analyses by flow cytometry. Leucocytes obtained from erythrocyte lysis (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) were then stained with extracellular anti-CD8, anti-CD69, anti-interleukin-10 receptor (IL-10R), anti-CD107A, anti-CD95 and anti-CD95 ligand (CD95L) antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For intracellular cell markers, cells were incubated with brefeldin-A (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for 4 hr and then stained with anti-perforin, antigranzyme B, anti-IL-17A, anti-IL-10, antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). At least 50 000 gated events were acquired for later analysis using a FACS CANTO II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analysed using FLOWJO software version 10.4 (TreeStar, Ashland, OR, USA). Statistical analysis was performed using GRAPHPAD PRISM, Inc. Software (Version 7.0; GraphPad, La Jolla, CA, USA) by Mann-Whitney test, significance was set at P < 0.05.

#### Results

Percentage of CD8+ T cells was assessed (Fig. 1a) and no alteration was observed in CD8+ levels of patients with either acute or chronic CHIKV infection compared with the control group. CD69 activation marker was evaluated (Fig. 2a), and CD8+ T cells of acute and chronic patients showed an increased expression of this marker in relation to the control individuals, demonstrating activation of these lymphocytes upon CHIKV infection. While evaluating the exocytosis mechanism of CD8+ T-cell cytotoxic proteins, the CD107A expression was found to be upregulated (Fig. 1b) in patients with the acute disease compared with control individuals; this is an important molecule in the cytotoxic synapse that coordinates the exocytosis of granzyme B. Similarly, there was an increase in granzyme B expression (Fig. 1c) in patients with acute and chronic disease and an increase in the expression of perforin (Fig. 1d) in patients with acute disease in relation to healthy individuals.

The levels of IL-17A expression (Fig. 2b) were increased in acute CHIKD, and this phenomenon was sustained during the chronic phase, with high expression of this molecule compared with healthy individuals; however, there was a decrease in comparison with the acute

phase. Expression of IL-10 was increased in patients with CHIKV infection, in both acute and chronic phases. Regarding IL-10R, lower expressions levels were demonstrated in patients with acute CHIKD compared with controls. The cell death induction pathway, CD95/CD95L, on CD8<sup>+</sup> T cells was also investigated (Fig. 3); there was increased expression of CD95 in the chronic phase, increased expression of CD95L in both acute and chronic phases, and an increase in the co-expression of CD95/CD95L in both the acute and chronic phases of CHIKV infection.

#### Discussion

CD8<sup>+</sup> T cells in particular are responsible for killing virus-infected cells by inducing cytolytic mechanisms as well as for producing a variety of antiviral factors; <sup>13</sup> however, the characterization of immunological mechanisms involved in CHIKD is not yet well known.<sup>7</sup> Activation of naive CD8<sup>+</sup> T cells induces a development programme that stimulates effector and memory cell proliferation and differentiation.<sup>1,2</sup> Effector CD8<sup>+</sup> T cells exhibit activated functions, such as cytotoxicity and cytokine production, that favour elimination of virus.<sup>7</sup> Although no difference was observed in the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of acute and chronic patients in relation to healthy individuals (Fig. 1a), analysis of the CD69 expression, an early activation marker for CD8<sup>+</sup> T cells,

demonstrated an increased CD8<sup>+</sup> T-cell activation in both acute and chronic disease (Fig. 2a), corroborating previous results observed in humans in the acute phase of infection. However, CD8<sup>+</sup> T-cell activation drops considerably in patients with chronic disease when compared with acute disease, even though activation is still higher than in the control group, demonstrating that these cells may still participate in the immune response during the chronic phase of the disease.

There are two major pathways by which CD8+ T lymphocytes mediate cytolytic activity against target cells: release of cytolytic granules through exocytosis and the granule-independent pathway, which consists of binding to death receptors in target cells. 14 Secretory effector lysosomes are characterized by a specific set of membrane and luminal protein markers, including CD107. We demonstrated that there was an increase in CD107A, granzyme and perforin (Fig. 1b,c,d) expression in CD8+ T lymphocytes in patients with acute CHIKD when compared with controls. These results allow us to suggest that CD8+ T cells mediate cytolytic activity against CHIKVinfected cells in these patients. However, patients with chronic disease did not present increased expression of these proteins compared with healthy controls, demonstrating that these mechanisms are not maintained in later stages of the disease.

Chikungunya virus was capable of activating the two CD8<sup>+</sup> T-lymphocyte activation pathways as revealed by

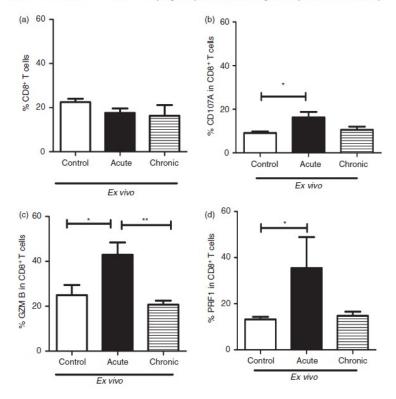


Figure 1. Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells and frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD107A, granzyme B (GZMB) and perforin (PRF1) from patients with acute and chronic chikungunya disease (CHIKD). Percentage of CD8<sup>+</sup> T cells (a), CD107A (b), granzyme B (c) and perforin (d) from healthy individuals (white bars), acute phase patients (black bars) and chronic phase patients (striped bars) was measured ex vivo. Bars represent the mean  $\pm$  standard error for each group. Means were compared using Student's t-test and differences were considered significant when P < 0.05. \*P < 0.05; \*P < 0.05.

© 2018 John Wiley & Sons Ltd, Immunology

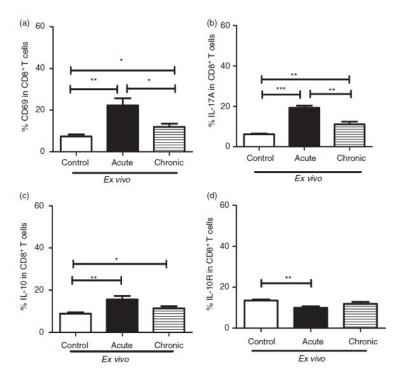


Figure 2. Higher frequencies of CD8 $^+$  T cells expressing CD69, Interleukin-17A (IL-17A), IL-10 and IL-10R are found in patients with acute and chronic chikungunya disease (CHIKD). Percentage of CD69 (a), IL-17A (b), IL-10 (c) and IL-10R (d) from healthy individuals (white bars), acute phase patients (black bars) and chronic phase patients (striped bars) was measured  $ex\ vivo$ . Bars represent the mean  $\pm$  standard error for each group. Means were compared using Student's t-test and differences were considered significant when P < 0.05. \*P < 0.05, \*\*P < 0.005 and \*\*\*P < 0.0001.

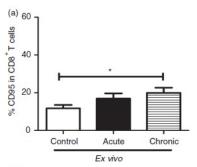
investigation of the death receptors. The expression of CD95L and the CD95/CD95L co-expression was observed in both phases of the disease, demonstrating their importance in the elimination of virus during the acute and chronic phases (Fig. 3). As CD8<sup>+</sup> T cells only express CD95L after activation, <sup>15</sup> we can propose that these cells remain activated even in the chronic phase of the disease, so they may also be involved in CHIKD's chronicity mechanism. Strong immune cell activation drives the initial antiviral response and may lead to T-cell exhaustion, and this has been linked subsequently to the viral persistence observed in the chronic phase. <sup>16</sup>

In an animal model infected with CHIKV, CD4<sup>+</sup> T and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were found in infiltrate from inflamed joints, whereas other animal studies have proposed that CD4<sup>+</sup>, but not CD8<sup>+</sup>, T lymphocytes, perform a significant role in the severity of joint inflammation.<sup>3</sup> Others demonstrated that the absence of CD8<sup>+</sup> T cells in synovial tissue may contribute to the persistence of CHIKV.<sup>16</sup> CD8<sup>+</sup> T cells play important roles against viral infection, and our results suggest that these cells have an immunomodulatory function in the systemic circulation of CHIKV.

It is well established that just like CD8<sup>+</sup> T cells, other immune cells can synthesize and produce IL-17A cytokine. The secretion of IL-17 by CD8<sup>+</sup> T cells has been described in several human inflammatory illnesses. <sup>17,18</sup> This cytokine has been a relevant target of many studies involving inflammatory diseases, like rheumatic and joint

inflammation.<sup>19</sup> In this study, we observed that CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from patients in the acute phase of disease had a significant increase of IL-17A cytokine (Fig. 2b) production in relation to the control and chronic groups. Patients in the chronic phase, who are still afflicted with the arthritogenic symptoms, also presented high levels of IL-17A (Fig. 2b) in relation to the control. These data suggest that CD8<sup>+</sup> IL-17-producing T cells may be directly involved in joint symptoms and contribute to the establishment of CHIKV-induced arthritis, as well as in the persistence of this condition in patients who are chronically affected.

Interleukin-10 is a regulatory cytokine that has antiinflammatory properties and develops an important role in controlling host immune responses to pathogens. It acts by preventing the damage caused by an exacerbated inflammatory response and by maintaining tissue homeostasis. Immunopathologies in response to infections and the development of autoimmune diseases are associated with dysregulation of IL-10.18 Increased IL-10 expression by CD8+ T cells was observed in the acute and chronic phases of CHIKD (Fig. 2c), which can be explained by a mechanism of compensation for the high activation profile of CD8+ T cells. On the other hand, the expression of IL-10R (Fig. 2d) was decreased in the acute phase when compared with the control group. Persistence of antigen and viral RNA in synovial tissue was demonstrated in patients with chronic arthralgia, and viral persistence was associated with the expression of interferon-α, IL-10 and



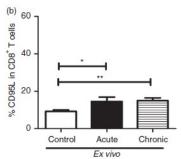
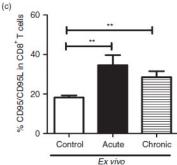


Figure 3. Higher frequencies of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD95, CD95 ligand (CD95L) and co-expression of CD95/CD95L are found in patients with acute and chronic chikungunya disease (CHIKD). Percentage of CD95 (a), CD95L (b), CD95/CD95L (c) from healthy individuals (white bars), acute phase patients (black bars) and chronic phase patients (striped bars) was measured ex vivo. Bars represent the mean  $\pm$  standard error for each group. Means were compared using Student's *t*-test and differences were considered significant when P < 0.05. \*P < 0.05 and \*P < 0.005.



CCL2. <sup>16</sup> However, the viral persistence was not associated with inflammatory cytokines, such as interferon- $\gamma$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . <sup>16</sup> For the establishment of chronic CHIKD, silencing mechanisms of the inflammatory response appear to be involved. Down-regulation in inflammation during the acute and recovery phases or absence of anti-inflammatory responses play major roles in the development of chronic arthralgia or arthritis in these patients. <sup>3</sup> The decrease of IL-10R expression in acute CHIKD CD8+ T cells suggests an anti-inflammation silencing mechanism, which may promote the development of chronic arthralgia, as the immunomodulatory effect of IL-10 starts with its binding to IL-10R. <sup>20</sup>

All these results are important in the field of T-cell immunity of human CHIKV infection. However, other studies are needed to aid in the elucidation of how gender and aging may influence the immune response in infectious diseases. A recent review showed important points related to several age-dependent differences that could influence disease severity and host recovery in alphavirus infection.<sup>21</sup>

In summary, our data demonstrate for the first time the role, and putative mechanisms, of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes from CHIKV-infected patients in the acute and chronic phases of infection. Expression of markers demonstrated that the cytolytic exocytosis mechanism is activated in this pathology, indicating the ability of these cells to eliminate CHIKV. The decrease of IL-10R may allow viral persistence and IL-17A may be the key cytokine in the development of joint symptoms in the acute

phase of infection and in the maintenance of these symptoms in the chronic phase. Our data confirm that acute CHIKV infection generates a strong immune response and suggest the important role of the CD8<sup>+</sup> T lymphocyte towards virus clearance in the circulation, mainly by mechanism of activation and cytotoxicity. In addition, these lymphocytes appear to participate in the clinical conditions observed in the disease through the production of IL-17A, the key cytokine found in arthritis.<sup>19</sup>

#### Acknowledgements

We would like to thank to Isabel Sarmento and Anna Stella Pachá from Paraiba's Health Department.

#### Conflict of interest

All authors declare that there are no conflicts of interest to declare.

#### References

- Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. Nat Rev Rheumatol 2012; 8:420–9.
- 2 Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. Nat Rev Microbiol 2010; 8:491–500.
- 3 Petitdemange C, Wauquier N, Vieillard V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. J Allergy Clin Immunol 2015; 135:846–55.
- 4 McCarthy MK, Morrison TE. Chronic chikungunya virus musculoskeletal disease what are the underlying mechanisms? Future Microbiol 2016; 11:331–4.
- 5 Borgherini G, Poubeau P, Jossaume A, Gouix A, Cotte L, Michault A et al. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on Reunion island. Clin Infect Dis 2008; 47:469–75.

#### C. N. S. Dias et al.

- 6 Gérardin P, Fianu A, Malvy D, Mussard C, Boussaïd K, Rollot O et al. Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. BMC Med 2011; 9:5.
- 7 Fox JM, Diamond MS. Immune-mediated protection and pathogenesis of chikungunya virus. J Immunol 2016; 197:4210–8.
- 8 Ng LF, Chow A, Sun YJ, Kwek DJ, Lim PL, Dimatatac F et al. IL-1β, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. PLoS ONE 2009; 4:e4261.
- 9 Vu DM, Jungkind D, LaBeaud AD. Chikungunya Virus. Clin Lab Med 2017; 37:371-82.
- 10 Wauquier N, Becquart P, Nkoghe D, Padilla C, Ndjoyi-Mbiguino A, Leroy EM. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. J Infect Dis 2011; 204:115–23.
- Miner JJ, Aw Yeang HX, Fox JM, Taffner S, Malkova ON, Oh ST et al. Brief report: chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatol 2015; 67:1214–20.
   Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time
- 12 Faye O, Faye O, Diallo D, Diallo M, Weidmann M, Sall AA. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. Virol J 2013; 10:311.
- 13 Rulli NE, Melton J, Wilmes A, Ewart G, Mahalingam S. The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections. Ann N Y Acad Sci 2007; 1102:96–108.

- 14 Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A. Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8<sup>+</sup> T cells. J Exp Med 2004; 199:925–36.
- 15 Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. Nat Med 1999; 5:90.
- Hoarau JJ, Bandjee MCJ, Trotot PK, Das T, Li-Pat-Yuen G, Dassa B et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. J Immunol 2010; 184:5914–27.
   Srenathan U, Steel K, Taams LS. IL-17<sup>t</sup> CD8<sup>t</sup> T cells: differentiation, phenotype and
- 17 Srenathan U, Steel K, Taams LS. IL-17\* CD8\* T cells: differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunol Lett* 2016; 178:20–6.
- 18 Zeichner JA, Armstrong A. The role of IL-17 in the pathogenesis and treatment of psoriasis. J Clin Aesthet Dermatol 2016; 9(6 Suppl 1):S3.
- 19 Miossec P. II.-17, now an important target for treatment in arthritis!. Joint Bone Spine 2017; 84:247.
- 20 Zhu L, Shi T, Zhong C, Wang Y, Chang M, Liu X. IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease. Gastroenterol Res 2017; 10:65.
- 21 Chan Y-H, Ng LFP. Age has a role in driving host immunopathological response to alphavirus infection. *Immunology* 2017; 152:545–55.

# **Apêndice II** – Artigo Submetido em tema relacionado à tese- QUALIS B1 – Área da Farmácia.

**Cytokine** <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Responder a: Cytokine <cytokine@elsevier.com>
Para: cinthia@pibja.org

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Dr. Cinthia Dias,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Cvtokine

Title: RIPARIN MODULATES IL17a AND IL10R IN CD8+ T CELLS FROM ACUTE CHIKUNGUNYA VIRUS

INFECTION IN HUMANS

Corresponding Author: Tatjana Keesen

Co-Authors: Cinthia N Dias; Bruna M Gois; Pedro Henrique S Palmeira; Aline G Lara; Rephany F Peixoto; Ronara G Cambuí; Josélio G Araújo; Gabriela R Sousa; Stanley Juan C Guttierrez; Isac A Medeiros; Fatima de Lourdes A Azevedo; Robson C Veras; Ian P Amaral; Daniele I Janebro; José M Barbosa Filho;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: https://ees.elsevier.com/ycyto/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Cinthia&lname=Dias&email=cinthia@pibja.org

Or log in: https://ees.elsevier.com/ycyto/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=cinthia@pibja.org

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at tat.keesen@cbiotec.ufpb.br;tat.keesen@gmail.com.

Thank you,

Cytokine

# RIPARIN MODULATES IL17a AND IL10R IN CD8<sup>+</sup> T CELLS FROM ACUTE CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION IN HUMANS

Cinthia Nóbrega de Sousa Dias<sup>a</sup>, Bruna Macêdo Gois<sup>a</sup>, Pedro Henrique de Sousa Palmeira<sup>a</sup>, Aline Lara <sup>d</sup>, Rephany Fonseca Peixoto<sup>a</sup>, Ronara Adriane Gonçalves Cambuí <sup>a</sup>, Josélio Maria Galvão Araújo<sup>b</sup>, Gabriela Ribeiro de Sousa<sup>c</sup>, Stanley Juan Chavez Guttierrez <sup>e</sup>; Isac Almeida de Medeiros<sup>c</sup>, Fátima de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo<sup>c</sup>, Robson Cavalcanti Veras<sup>c</sup>, Ian Porto Gurgel do Amaral<sup>d</sup>, Daniele Idalino Janebro<sup>a</sup>, José Maria Barbosa Filho<sup>c</sup>, Tatjana Souza Lima Keesen<sup>a</sup>

almmunology of Infectious Diseases Laboratory of Department of Cellular and Molecular Biology of Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil
 bMolecular Biology of Cancer and Infectious Diseases Laboratory of Post-Graduation Programme on Parasite Biology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

<sup>c</sup>Research Institute for Drugs and Medicines, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

<sup>d</sup> Biotechnology Center, Federal University of Paraiba, João Pessoa, Brazil
 <sup>e</sup>Department of Biochemistry and Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, Brazil

\*Corresponding author: Tatjana Keesen de Souza Lima; Tel: +55 83 32167173; E-mail: tat.keesen@cbiotec.ufpb.br. Department of Cellular and Molecular Biology - Federal University of Paraíba (UFPB), João Pessoa, state of Paraíba, 58051-900, Brazil.

#### Abbreviations:

CHIKV - Chikungunya virus

CHIKD -- Chikungunya disease

CD - Cluster Differentiation

#### ABSTRACT

The symptoms of the chikungunya disease (CHIKD), especially in the acute phase, are justified by the presence of proinflammatory cytokines, which shows the strong participation of the immune system in the establishment of this disease. We aimed to investigate the role of Riparin III in the immunomodulation of CD8+ T lymphocytes from patients infected with chikungunya virus (CHIKV) in acute and chronic phases of disease and compare them with healthy individuals. Our results demonstrated that Riparin III reduced the levels of IL-17a and INFy expression in the acute phase of CHIKD and in healthy individuals. In relation to IL-10R, Riparin III positively modulated the expression of these receptors in CD8+ T lymphocytes, implying in an increase of IL-10R expression only in patients in the acute phase. Thus, here we demonstrate that Riparin III, a drug isolated from *Aniba riparia*, has an immunomodulatory effect in CD8+ T lymphocytes *in vitro*, mainly in the acute phase of the disease.

Key words: Inflammation; Riparin; Cytokine

#### 1. INTRODUCTION

Cytokines play a crucial role in physiological and autoimmune conditions of the immune system, as well as in processes of defense against invading pathogens [1]. In some cases, the elimination of the pathogens is only partial, and virus or viral antigen remain in the body of the individual for a long period and promote development of chronic symptoms. In this context, Chikungunya disease (CHIKD) has an expressive symptomatology in the acute phase, characterized mainly by severe arthralgia, which can progress to arthritis in the chronic phase [2]. Viral antigen and RNA may remain for up to 18 months in the synovial tissue of patients with chronic arthralgia after chikungunya virus infection (CHIKV) and this persistence has been associated with an increase in Interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), and proinflammatory cytokines [3]. Besides symptoms such as arthralgia, myalgia, fever, nausea and headache, edema is also very pronounced in this disease, which is related to increased IL-6 levels due to the activity of macrophages and Natural Killer cells (NK), as well as other proinflammatory mediators [4].

Currently there are no specific treatments for CHIKVD, so non-steroidal antiinflammatory (NSAIDs) and corticosteroid drugs are used to attenuate the symptoms of the disease. Both classes of drugs have several side effects including severe gastric ulcers and renal failure [5]. Thus, it is important to investigate drugs that may inhibit the pathological mechanism of CHIKV, especially the inflammatory mechanisms that are related to the severity of the disease.

Biologically active substances have great potential in immunomodulatory activity. Riparin has been described as a significant anti-inflammatory substance [6]. Riparin I, II, III and IV are alkamides isolated from *Aniba riparia* and have known several biological effects such as antimicrobial and antimalarial [7,6].

Here we evaluated Riparin III and modulation of the cytokines IL-17a, IL-10, INFγ, in addition to the IL-10 receptor (IL10R) and CD69. Our results demonstrated that Riparin III, in the acute phase, is able to decrease the expression of IL17a and INFγ and increase the expression of IL10R in CD8<sup>+</sup> T cells, thus being considered a molecule capable of immunomodulation of CD8<sup>+</sup> T cell responses.

#### MATERIAL AND METHODS

Infected patients from João Marsicano Maternal Children's Hospital – Bayeux-PB, Prompt Care Unit of Christ the Redeemer and Lauro Wanderley University Hospital, in the city of João Pessoa- PB- Brazil, were assigned to the acute or chronic groups based on the observation of clinical symptoms of CHIKV infection such as polyarthralgia and associated symptoms (high fever, rash and swelling). Clinical and laboratory examinations were performed in adult patients older than 18 years with symptoms lasting from 2 up to 7 days (acute phase) and from 6 up to 12 months (chronic phase). Acutely infected individuals who were positive for CHIKV by polymerase chain reaction were recruited. Acute group (n = 4), chronic group (n = 8) and healthy individuals (n = 9) were evaluated.

For PCR tests, viral RNA extractions were obtained from whole blood or serum samples using the QIAmp Viral Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, Spain) following the manufacturer's predetermined protocol. RNA was analyzed by quantitative polymerase chain reaction to detect CHIKV (MINNER et al., 2015). All samples were kept at -80° until the study was started. This study has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) and was approved by the National Commission of Ethics in Research (Certificate number CAAE: 59833416.6.0000.5183), and Informed agreement document was obtained from patients with CHIKV infection and from healthy volunteers.

Whole blood was collected from individuals and leucocytes were obtained from erythrocyte lysis (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The wide biological activity of the Riparins and some preliminary tests led us to choose Riparina III for this research. Leucocytes were immediately processed for flow cytometry (untreated) or were previously treated with Riparin III in the concentration of 34μM for 16 hours and analyzed by flow cytometry. Leucocytes were marked with extracellular anti-CD8, anti-CD69, anti-interleukin-10 receptor (IL-10R) antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). For intracellular cell markers, cells were incubated with brefeldin-A (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for 4 hr and then marked with anti-IL10, antilL10R, anti-IL-17A, anti-INFγ antibodies (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). At least 50,000 gated events were acquired for later analysis using a FACS CANTO II (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed (Figure 1A) using FLOWJO software version 10.4 (TreeStar, Ashland, OR, USA). Statistical analysis was performed using GRAPHPAD PRISM Inc. Software (Version 7.0; GraphPad, La Jolla, CA, USA) by Student's t-test, significance was set at P < 0.05.

#### RESULTS

CD69 activation marker was evaluated (Figure 1B) and cells treated with Riparin III increased this marker in CD8<sup>+</sup> T cells compared to the healthy individuals. Riparin III treatment decreased the levels of IL17a expression (Figure 2A) in acute CHIKD and downregulated the expression of INFy in acute and chronic phase, as shown in figure 2B. Regarding IL-10R (Figure 2C), Riparin III negatively modulated the expression of these receptors in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes obtained from heathy individuals and positively from patients in the acute phase of the disease whereas no effect was observed in lymphocytes obtained from patients in the chronic phase. Finally, observing the involvement of Riparin III in modulation of IL10 (Figure 2D), a positive regulation of IL10 expression was observed in healthy individuals, but not in CHIKV-infected individuals.

#### 4. DISCUSSION

Recently, immunomodulatory mechanisms have been investigated as targets for treatment of diseases [8]. In this study it was possible to demonstrate the modulation of cytokines expression by CD8<sup>+</sup>T cells mediated by Riparin III. CD69 is a membrane-bound type II C-lectin receptor and an early marker of lymphocyte activation due to its rapid appearance on the surface of plasma membrane after stimulation. CD69 regulates the differentiation of regulatory T (Treg) cells as well as the secretion

of IFN-γ, IL-17a, and IL-22 [9]. Riparin III increased the activation response in healthy individuals, by increase of activation marker CD69 in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Figure 1B). On the other hand, there was no increase in expression of this marker in CD8<sup>+</sup> T cells of patients infected with CHIKV, and this mechanism can be associated with an anti-inflammatory regulation mechanism triggered by Riparin III.

It is well established that CD8+ T cells can also produce and express IL-17a [10]. The high expression of IL17 family-cytokines is related with induction of a strong inflammatory response associated with protection against pathogen invasion [11]. Though, in addition to the protective role, this cytokine contributes to the tissue destruction that occurs in chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [12, 10]. In CHIKV infection, chronic symptoms are closely related to symptoms of rheumatoid arthritis and IL17a has been investigated as the protagonist in this action. IL-17 cytokine is characterized as a promising therapeutic target, as well as the IL-17-TH17 (T helper cell 17) pathway, including IL-17a cytokine, since it can act as a coadjuvant together with the drugs already used for inflammatory disorders [13]. Here, we have demonstrated that Riparin III was able to decrease the expression of IL-17a in CD8+ T cells (Figure 2A). In view of the above, this molecule has an anti-inflammatory effect in CD8+ T cells in chikungunya disease, which allows further studies to its use in immunotherapeutic context of controlling IL17 levels and, consequentially, inflammatory effects in CHIKD. In addition to the decrease of IL-17a expression, Riparin III was also able to reduce INFy expression (Figure 1B) in lymphocytes obtained from patients in the acute phase and from healthy subjects. Although INFy expression values were not altered in CHIKV infection, decreasing expression of this cytokine, even in healthy individuals, corroborates with the description of an antiinflammatory modulating effect of this molecule in a disease-independent way.

A significant decrease of CD8<sup>+</sup> T cells in the synovial fluid of Patients in chronic phase of CHIVD has been described and may be related to the viral persistence in patients who progress to the chronic phase of the disease [3]. In addition, it was demonstrated that PBMC and synovial fluid from patients with chronic CHIKV infection expressed anti-viral type I INFs; and in tissue and synovial fluid biopsies, inflammatory cytokines such as TNFα, IL1β and INFγ were not found [3]. The absence of increased INFγ expression by CD8 + T cells in peripheral blood in patients infected with CHIKV, as we demonstrated in this work, can be explained as a possible absence of inflammatory cytokine expression by these cells in the chronic phase, as observed in the aforementioned study.

We have demonstrated that Riparin III is able to modulate CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by increasing IL10 expression in lymphocytes from healthy subjects. However, IL10 is also related to CD8<sup>+</sup> T lymphocyte responses [14] and IL10 / IL10R deficiency generates a failure in CTL immune surveillance [15]. Therefore, the increase in IL10 observed in lymphocytes from infected patients without Riparin III can be considered a response of these CHIKV infected cells, thus Riparin III modulates the production of IL10 only in healthy individuals. Once that IL10R expression was modulated by Riparin III and caused increased IL10R expression in CD8<sup>+</sup> T cells from patients in the acute phase of the disease, increased IL10 uptake by IL-10R increase may be related to decreased IL17a and, therefore, a further moderate inflammatory response in the chronic phase of disease. As the immunomodulatory effect of IL-10 begins with its binding to IL-10R, this increase can justify the immunomodulatory role of Riparin III, reassuring the anti-inflammatory role of this drug.

#### CONCLUSION

Modulation of immune responses has been, in recent years, a new alternative for the treatment of chronic and autoimmune inflammatory diseases. Recently a reemergence of the CHIKV infection has led to an infection of many individuals, and the inflammatory arthritogenic symptoms characteristic of the disease decrease the quality of life, and often incapacitation, of the patients. Unfortunately, the drugs used to attenuate the symptoms are relatively toxic and may cause other health problems. Here we demonstrate that Riparin III has an immunomodulatory capacity involving CD8+ T lymphocytes, in vitro trials, mainly in the acute phase of the disease. Additional research strategies, especially regarding other types of immune cells should be performed to confirm the role of this drug in the chronic phase of the disease. Understanding the role of this drug is highly important, once it brings a new perspective in developing a more effective treatment for CHIKD.

#### REFERENCES

- VAILLANT, Angel A. Justiz; JAN, Arif. Physiology, Immune Response. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2019.
- [2] KUCHARZ, Eugene J.; CEBULA-BYRSKA, Ilona. Chikungunya fever. European journal of internal medicine, v. 23, n. 4, p. 325-329, 2012
- [3] HOARAU, Jean-Jacques et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. The Journal of Immunology, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.
- [4] ROUZAIRE, Paul et al. Natural killer cells and T cells induce different types ofskin reactions during recall responses to haptens. European journal of immunology, v. 42, n. 1, p. 80-88, 2012.
- [5] LEE, Wai Suet et al. Alphaviral targeted antivirals: evaluating the old, planning the future. Future Virology, v.12, n.1,p 49-54, 2016.
- [6] DE CARVALHO, Alyne Mara Rodriques et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methil-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. Chemico-biological interactions, v. 205, n. 3, p. 165-172, 2013.
- [7] MELO, Carla Thiciane Vasconcelos et al. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. Fundamental & clinical pharmacology, v. 27, n. 1, p. 104-112, 2013.
- [8] MAGER, Lukas F. et al. Cytokine-induced modulation of colorectal cancer. Frontiers in oncology, v. 6, p. 96, 2016.
- [9] CIBRIÁN, Danay; SÁNCHEZ-MADRID, Francisco. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. European journal of immunology, v. 47, n. 6, p. 946-953, 2017.
- [10] 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.
- [11] VELDHOEN, Marc. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. Nature immunology, v. 18, n. 6, p. 612, 2017.
- [12] MIOSSEC, Pierre; KOLLS, Jay K. Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation. Nature reviews Drug discovery, v. 11, n. 10, p. 763, 2012...
- [13] BARTLETT, Hilary; MILLION, Ryan. Targeting the IL-17-TH17 pathway. Nature Reviews, v. 14, 2015.
- [14] NIZZOLI, Giulia et al. IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8+ memory T cells and, when produced by CD1c+ DCs, shapes naive CD8+ T-cell priming. European journal of immunology, v. 46, n. 7, p. 1622-1632, 2016.
- [15] OFT, Martin. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. Cancer immunology research, v. 2, n. 3, p. 194-199, 2014.

**Anexo I-** Parecer de aprovação emitido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

## COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos das infeccões 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 (Togaviridade, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae). Os vírus da Dengue (DENV) e da Zika (ZIKV) estão inclusos na família Flaviviridae que é composta por três gêneros: O gênero Flavivírus (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 Pestevírus na qual inclui-se os vírus da diarreia bovina e da peste suína clássica, e o gênero Hepacivírus, no qual

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edificio Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-521

UF: DF Municipio: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 01 de 32

# 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_TatjanaK eesen.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	Colaboration_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 UF: DF CEP: 70.750-521

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br

Página 32 de 32

## **Anexo II-** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)





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

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

<u>Título do Projeto:</u> 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 parecidas 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.

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. Esses procedimentos se justificam pelo fato da avaliação médica, as informações acerca do seu estado de saúde e também das informações que constarão no questionário, nos permitir inclui-lo no grupo de pessoas doentes ou saudáveis, visando uma correta distribuição e análise dos resultados obtidos.

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

Todos os procedimentos estarão de acordo com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde. Com sua permissão serão coletados, por uma pessoa devidamente treinada, aproximadamente 15 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

1 de 3

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

sangue (hemograma), para determinar se você tem anemia. Uma parte do seu sangue será armazenada a uma temperatura que permita a conservação das células em um equipamento direcionado para esse fim. A outra parte do seu sangue iremos utilizar para estudar seu sistema de defesa (sistema imunológico), como também faremos uma análise para confirmar se você tem Zika, Chikungunya ou Dengue. Além disso, será realizado o estudo farmacológico da riparina, uma substância isolada de uma planta, que quando colocada em contato com o seu sangue poderá atuar de maneira positiva, ativando o seu sistema de defesa a combater melhor a infecção. Essa abordagem permitirá a proposição futura de novas estratégias de diagnóstico e tratamento e associações terapêuticas, visando à melhoria da qualidade de vida dos portadores dessas doenças. Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Com a sua autorização, uma parte do material biológico, o que foi acondicionado de maneira adequada para manutenção das células, será enviada para outro <u>país</u> (Inglaterra), onde os pesquisadores de lá farão estudos de substâncias no sangue que podem influenciar na resposta do seu sistema de defesa (imunológico). Após a realização dos ensaios seu material biológico será descartado.

Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, para a guarda e utilização do material biológico sem que isso lhe traga nenhum prejuizo ou penalidade. Para erradicar qualquer risco de vazamentos dados dos prontuários e questionários aplicados serão guardados em local seguro, conhecido apenas pela equipe brasileira envolvida na pesquisa. A amostra será armazenada como biorepositório, que é um tipo de armazenamento das suas amostras, somente no tempo de execução deste projeto. Também garantimos que, o seu sangue que irá para Inglaterra, será utilizado apenas para este estudo a, em seguida, descartados.

Todos os seus dados serão confidenciais e colocados de maneira anônima por devida codificação dos seus dados (ARBXX). Todas as informações do seu prontuário e questionários serão depositadas em um banco de dados (drive), cuja senha só terá acesso os pesquisadores envolvidos. Só após essa codificação é que o seu material biológico será encaminhado à Inglaterra. 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. Também é importante assegurar que caso você tenha interesse nos resultados de exames e da pesquisa basta solicitar ao pesquisador responsável.

Os benefícios da sua participação nesta pesquisa são que você estará contribuindo para um melhor entendimento da doença, e com estudos que podem trazer a descoberta de novos tratamentos e/ou cura. Dessa maneira, contribuindo com a ciência e a comunidade à sua volta.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você não será pago por participar do estudo. No entanto, caso você tenha algum gasto, como por exemplo, com transporte e alimentação, você será ressarcido. Caso sofra algum dano decorrente da pesquisa (direto ou indireto, imediato ou tardio), você terá direito à assistência integral e imediata pelo tempo que for necessário, além do direito de buscar indenização.

Você receberá uma via deste documento devidamente assinada pelo pesquisador e por você e rubricada em todas as páginas por ambos. Toda dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora D 2 Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, no Centro de Biotecnologia,

2 de 3

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 (CEP) da UFPB. O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que existe nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. Endereço: Hospital Universitário Lauro Wanderley-HULW- 2º andar (ao lado da biblioteca) Horário do Expediente: 8:00 às 12:00 hs e 13:00 às 17:00 hs. 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.

Além do CEP, também existe o CONEP - A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - que é responsável por examinar os aspectos éticos de pesquisas envolvendo seres humanos, nas seguintes áreas: Genética humana, reprodução humana, novos dispositivos para a saúde, pesquisas em populações indígenas, pesquisas conduzidas do exterior e aquelas que envolvam aspectos de biossegurança. Endereço: Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Anexo B. Sala 104B. Brasília-DF, CEP: 70.058-900. Fone: (61) 3315-3821 / 3315-2151 / 3315-3566. e-mail: cns@saude.gov.br

Você, ou alguém que você indique em caso de óbito ou condição incapacitante, terá o acesso gratuito a todas às informações e resultados associados a seu material biológico, inclusive informações genéticas que possam implicar riscos para doenças não preveníveis ou familiares. Quando tiver necessidade você também terá aconselhamento genético gratuito. É importante afirmar que os seus dados genéticos são confidenciais e que não serão repassados a terceiros. Todas as suas informações genéticas serão guardadas de forma anônima de maneira codificada em um banco de dados guardado por senha. Apenas os pesquisadores envolvidos terão acesso a essas informações.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será desenvolvida, os riscos e beneficios envolvidos, bem como os meus direitos, e concordo em participar voluntariamente do estudo "Estudos das infecções causadas pelos vírus da Zika, Chikungunya e Dengue" autorizando o uso do meu sangue para a realização deste estudo.

	data	_/_	_/_
Voluntário:			
	data	1	,

Participante da pesquisa: (assinatura ou impressão datiloscópica):

3 de 3

# Anexo III- Questionário arboviroses aplicado na seleção dos pacientes

	QL	JESTIONÁ	RIO AR	BOVIROSES	
NOME					TELEFONE:
DATA DE NASCIMEN	SEXO/GÊNERO: GESTANTES:			RAÇA:	
/ /		M()F() S()N()			( )B( )P( )A( )N
ENDEREÇO:			ZONA:		
				( ) RURAL ( ) URBAN	
LOCAL DA COLETA:		DATA 1° SINTOMAS: / /			DATA DA COLETA: / /
		QUADRO DI	E SINAIS E	SINTOMAS	
SIM NÃO					
Febre					
(temperatura)					
Manchas na pele			5		
Dor muscular		0	3		
(Intensidade)					
Dor nas					
articulações		7	1		
(Intensidade)					
Edema nas articulações		155			
Conjuntivite					
Cefaleia			6		
Prurido					
Hipertrofia ganglionar		66 (65			
Discrasia hemorrágica					
(hemorragia)		12	5		
Dor retroorbital					
Uso de medicamentos					
Infecção anterior					
de alguma arbovirose					