



**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⁺ NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CHIKUNGUNYA:
AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E INVESTIGAÇÃO
DO PAPEL IMUNOMODULADOR DA RIPARINA III**

**João Pessoa – PB
2019**

CINTHIA NÓBREGA DE SOUSA DIAS

**CÉLULAS T CD8⁺ 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**

Catálogo 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

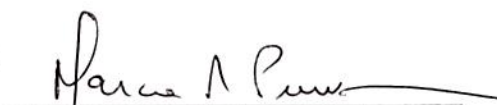
**CÉLULAS T CD8⁺ NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA CHIKUNGUNYA:
AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E INVESTIGAÇÃO
DO PAPEL IMUNOMODULADOR DA RIPARINA III**

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^a Dra. Tatjana Keesen de Souza
Clemente
(Co-Orientadora)

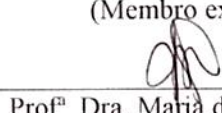

Prof^a Dra Márcia Regina Piuvezam
(Membro interno titular)


Prof^a Dra. Josiane de Campos Cruz
(Orientadora)

Prof^a Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira
(Membro externo titular)

Prof^o. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos
Santos
(Membro externo titular)

Prof^a Dra. Hilzeth Luna Freire Pessôa
(Membro externo suplente)


Prof^a Dra. Maria 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⁺, 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 Manguiera, 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⁺ 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⁺ 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 alcanoides 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⁺ 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⁺ 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 expressão 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- γ , 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 anti-inflamatório dessa molécula. 9- O efeito anti-inflamatório desempenhado pela Riparina III em células T CD8⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ T cells and the Riparina III immunomodulatory role by the flow cytometry method. The results obtained in this work demonstrated that: 1- CD8⁺ 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- γ , 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 anti-inflammatory 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

Tabela 1- Quadro de sintomas clínicos agudos e crônicos mais prevalentes na doença Chikungunya	35
Tabela 2- Reagentes e sequência para realização da transcrição reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya.....	49
Tabela 3- Painel de marcação com anticorpos monoclonais para análise de células T CD8 ⁺ e seus diferentes fenótipos de expressão.....	52
Tabela 4- Painel de marcação com anticorpos monoclonais para análise de células T CD8 ⁺ e seus diferentes fenótipos de expressão após o tratamento com as diferentes drogas utilizadas.....	54
Tabela 5- Toxicidade da Riparina III frente a eritrócitos humanos <i>in vitro</i>	58
Tabela 6- Dados demográficos e clínicos do grupo controle (Indivíduos saudáveis)	60
Tabela 7- Dados demográficos e clínicos do grupo Chikungunya Aguda	60
Tabela 8- Dados demográficos e clínicos do grupo Chikungunya Crônica	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclos de infecção silvestre (A) e urbano (B) envolvidos na transmissão da Chikungunya.....	20
Figura 2 - Diagrama de transmissão do vírus Chikungunya.....	21
Figura 3 - Exemplos de tropismo do vírus Chikungunya.....	24
Figura 4 - Resposta imunológica na infecção por CHIKV.....	25
Figura 5 – Mecanismo de ativação de células T CD8 ⁺	28
Figura 6 – Sistema colinérgico linfocítico na regulação imunológica.....	32
Figura 7 - Estrutura química da Riparina III.....	39
Figura 8 - Reação de redução do MTT a formazan.....	47
Figura 9 - Esquema de tratamento com drogas e marcação com anticorpos.....	53
Figura 10 - Estratégia de Análise de Células T CD8 ⁺	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Avaliação da viabilidade de células mononucleares do sangue periférico frente a diferentes concentrações da Riparina III.....	59
Gráfico 2 - Medida da porcentagem de células T CD8 ⁺ 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.....	62
Gráfico 3 - Expressão de CD69 em células T CD8 ⁺ 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.....	63
Gráfico 4 - Expressão de CD107A em células T CD8 ⁺ 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.....	64
Gráfico 5 - Produção de Granzima B em células T CD8 ⁺ 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.....	64
Gráfico 6 – Produção Perforina em células T CD8 ⁺ 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.....	65
Gráfico 7 – Produção de IL-10 em células T CD8 ⁺ 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.....	66
Gráfico 8 - Expressão de IL-10R em células T CD8 ⁺ 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.....	66
Gráfico 9 – Produção de IL-17A em células T CD8 ⁺ 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	67
Gráfico 10 – Produção de INF- γ em células T CD8 ⁺ 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.....	68
Gráfico 11 - Expressão de PD-1 em células T CD8 ⁺ 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.....	69

Gráfico 12 - Expressão de CD95 em células T CD8⁺ 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.....70

Gráfico 13 - Expressão de CD95L em células T CD8⁺ 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.....70

Gráfico 14 - Coexpressão de CD95/CD95L em células T CD8⁺ 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.....71

Gráfico 15- Expressão de CD69 em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....72

Gráfico 16- Expressão de CD107A em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....73

Gráfico 17- Produção de Granzima B em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....74

Gráfico 18- Produção de Perforina em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....75

Gráfico 19- Produção de IL17A em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....76

Gráfico 20- Produção de INF- γ em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....77

Gráfico 21- Produção de IL-10 em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....78

Gráfico 22- Expressão de PD-1 em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.....79

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
RNA_m- RNAmensageiro
RTPCR- PCR em tempo real
PLC- Fosfolipase C
GMP_c – 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. INTRODUÇÃO.....	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 Diagnóstico 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 (células mononucleares do sangue periférico).....	46
4.3 Seleção de amostras 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 Polimerase (q-PCR) para detecção do vírus Chikungunya	49
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 indivíduos saudáveis com a Riparina III.....	51
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	52
4.11 Protocolo de marcação com anticorpos monoclonais de leucócitos <i>ex vivo</i> e após o tratamento com as drogas em estudo.....	54
4.12 Citometria de fluxo.....	55

4.13 Estratégia de análise de células T CD8 ⁺ e respectivos marcadores avaliados	56
4.14 Análise estatística.....	57
5. RESULTADOS.....	58
5.1 Avaliação da citotoxicidade da Riparina III frente a eritrócitos humanos	58
5.2 Avaliação da citotoxicidade da Riparina III frente a células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	59
5.3 Dados demográficos e clínicos.....	60
5.4 Avaliação do perfil fenotípico de linfócitos T CD8 ⁺ 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..	61
5.5 Expressão do perfil fenotípico de ativação celular (marcador extracelular CD69) em linfócitos T CD8 ⁺ 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	62
5.6 Expressão do perfil fenotípico de mecanismos de exocitose (CD107A) de proteínas citotóxicas (Granzima B e Perforina) em linfócitos T CD8 ⁺ 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	63
5.7 Expressão do perfil fenotípico da citocina intracelular reguladora IL-10 e seu receptor (IL-10R) em linfócitos T CD8 ⁺ 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	65
5.8 Expressão do perfil fenotípico de citocinas intracelulares inflamatórias (IL-17A e INF- γ) em linfócitos T CD8 ⁺ 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.....	67
5.9 Expressão de marcadores de morte (PD-1, CD95 e CD95L) em linfócitos T CD8 ⁺ 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	68
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.....	71
6. DISCUSSÃO.....	80
7. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
APÊNDICES.....	114
ANEXOS	128

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 arbovirose, 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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 $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$ e $\alpha 10$ 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 significativa 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 músculo 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⁺ e seu papel na infecção por CHIKV, assim como, demonstrar o papel bioativo da Riparina III em linfócitos T CD8⁺ 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).

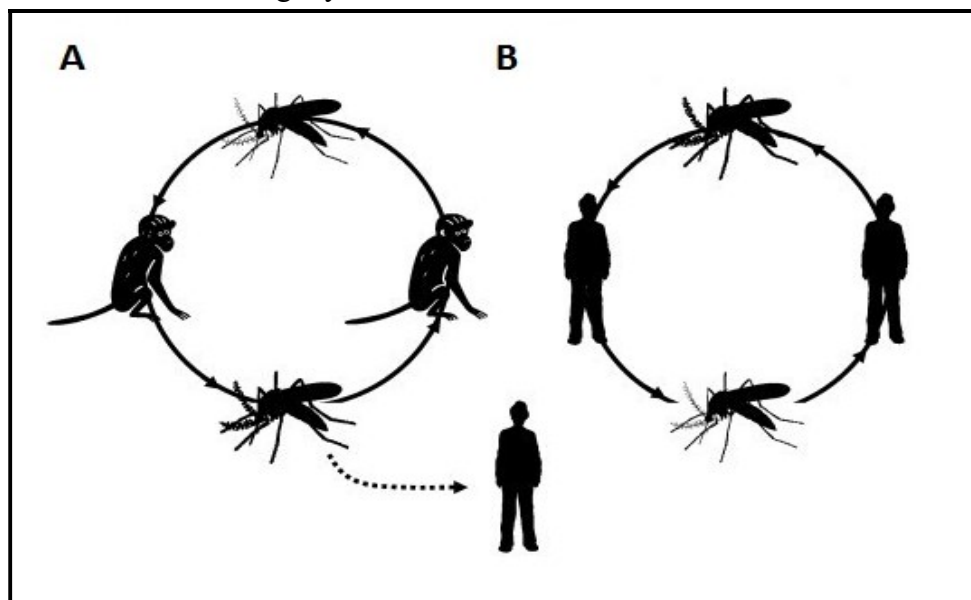
Apesar de o vírus CHIK ser um membro dos alfavírus artrítogênicos, foi registrado, durante um surto recente, casos de meningoencefalite (principalmente em recém-nascidos) e doença hemorrágica (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; TANABE et al., 2018), indicando essas complicações como importantes na infecção aguda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

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^{10} cópias/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

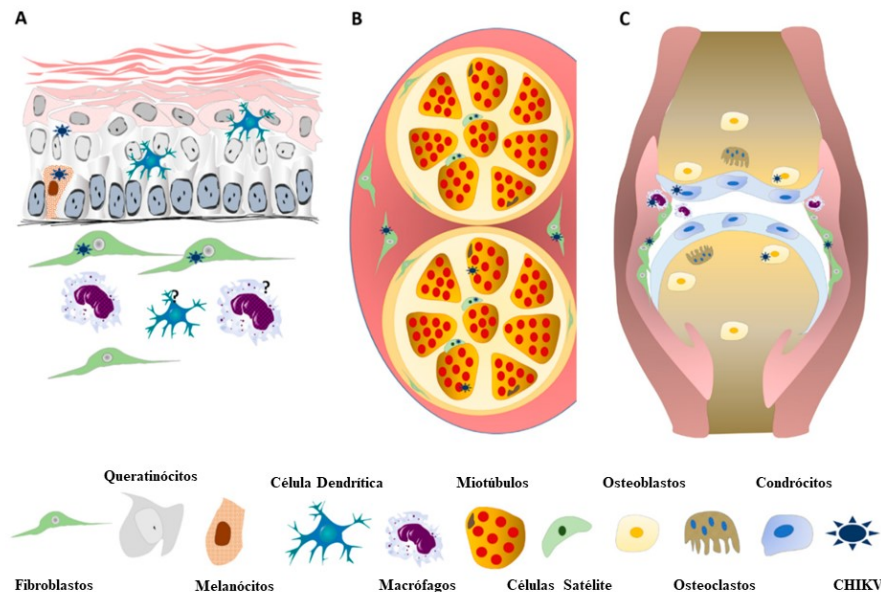
adversas (**Figura 2B**) (CHOMPOOSRI et al., 2016; JAIN et al., 2016). Uma vez dentro do artrópode, CHIKV se replica e alcança as glândulas salivares do mosquito e por volta de 10 dias ocorre a transmissão para humanos susceptíveis (**Figura 2C**) (SILVA JR et al., 2018).

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 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, fígado, baço, músculos e articulações (**Figuras 3 e 4**) (PETITDEMANGE, WAUQUIER, VIEILLARD, 2015).

Figura 3. Exemplos de tropismo do vírus Chikungunya.

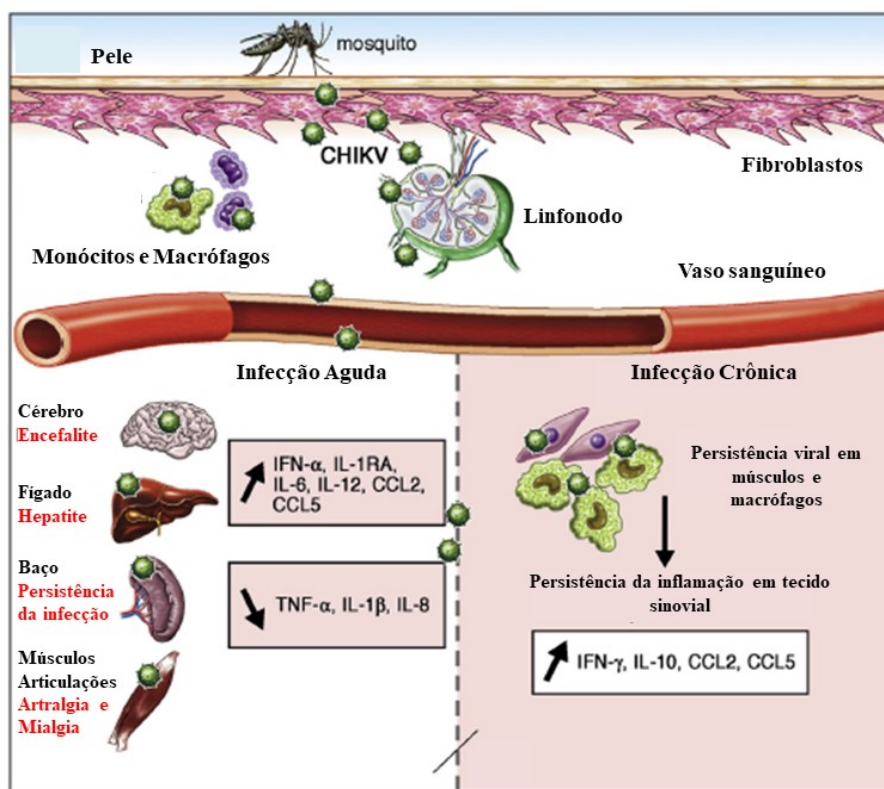


Fonte: Adaptado de Matusali et al., 2019. (A) O vírus Chikungunya (CHIKV) infectando células na pele; (B) No músculo esquelético; (C) Nas articulações e ossos.

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 próinflamatória, 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 próinflamatórias, tais como TNF- α , IL- 1 β 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⁺, 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 CD11b⁺ 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).

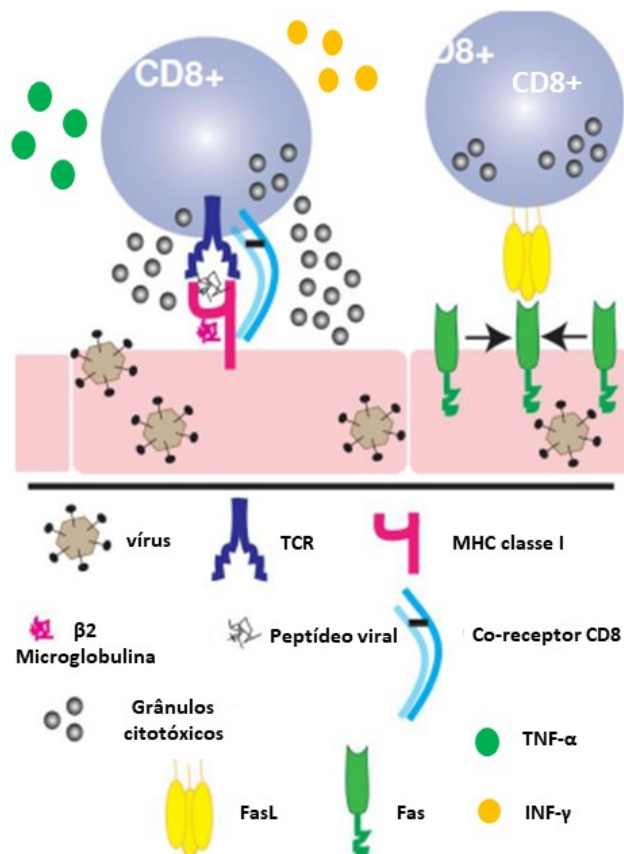
Ademais por serem as principais responsáveis pela disseminação do vírus para outros locais do corpo, como o sistema nervoso e fluido sinovial, e, portanto, podem ser as principais contribuintes no desenvolvimento de manifestações clínicas graves (**Figura 4**). Além dos monócitos/macrófagos, a presença 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 $CD4^{+}$ 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 $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ 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 $CD8^{+}$ 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 $CD8^{+}$ reconhecem o antígeno tornam-se ativadas (**Figura 5**) e agem por três principais mecanismos. O primeiro é a secreção de citocinas, prioritariamente $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, 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 $CD8^{+}$ 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).

Figura 5 – Mecanismo de ativação de células T CD8⁺



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⁺ 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⁺ 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⁺, 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 demonstrando 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 $[Ca^{2+}]_i$. 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^+ e K^+ , e medeiam a transmissão

excitatória inicial. Esses receptores possuem cinco subunidades (α , β , γ , δ , ϵ) organizadas para formar um canal iônico (CRESPI; COLOMBO; GOTTI, 2017).

Existem diferentes subunidades proteicas que formam nAChRs, sendo dez isoformas de subunidades α , quatro subunidades β , além das subunidades δ , γ e ϵ . 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^{2+} (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^{2+} (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).

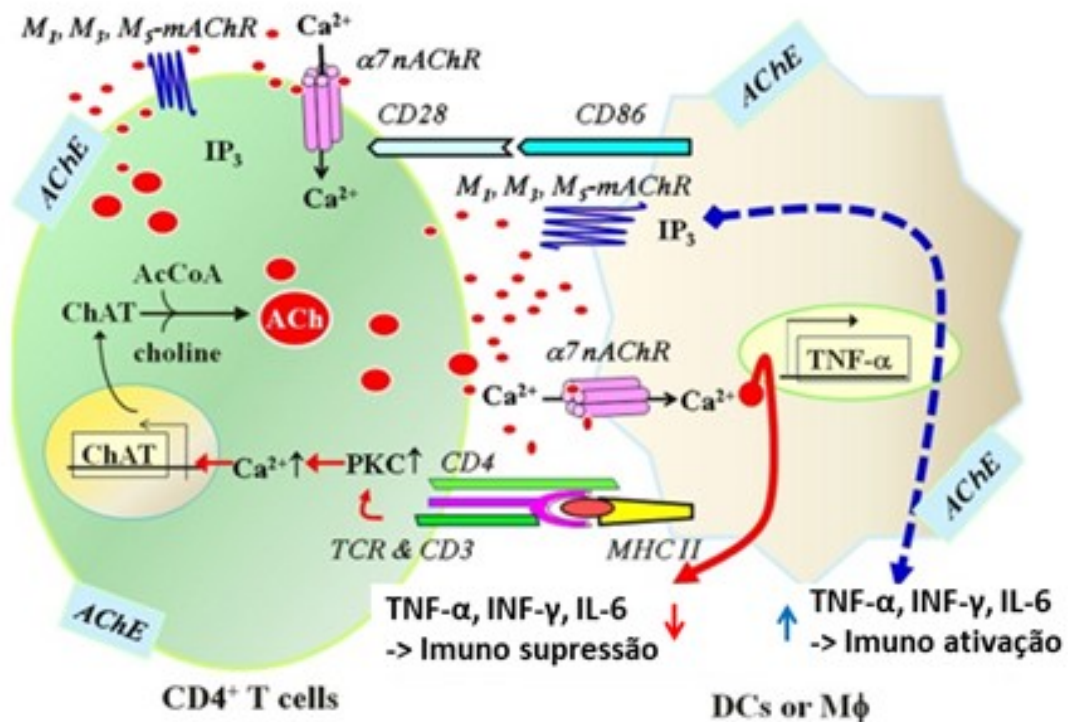
Em relação a células T CD4^+ ou T helper (Th), alguns demonstraram que o nAChR está envolvido na diferenciação dessas células em seus diferentes perfis (FUJII et al., 2017). Relatou-se que a nicotina suprime a neuroinflamação por diminuição da resposta Th1 e Th17 (WU et al., 2014). Em um modelo de colite, 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).

A estimulação com ACh 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 IP₃ 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⁺²] 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 (FUJII et al., 2017) aumentou a expressão do RNAm de *c-fos* e a liberação de [Ca⁺²]_i mediada por IP₃ (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 resposta 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 (KAWASHIMA; 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⁺, Células Dendríticas e Macrófagos possuem a maquinaria para síntese, ligação e degradação da acetilcolina. A ativação de células T CD4⁺ via TCR e MHC de classe II gera cascata de sinalização de ativação que aumenta os níveis intracelulares de Ca⁺⁺ 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 artrítogênica (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 linfadenopatia 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 linfadenomegalias 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 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 esteroide (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; WICHIT et al., 2017; 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).

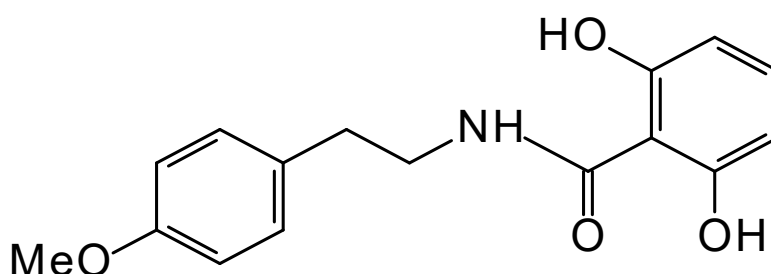
Um grande número de espécies com grande diversidade e uso medicinal pertence à família Lauraceae, o que levou à crescente exploração de plantas dessa família tornando-a vulnerável a extinção (MARQUES, 2001).

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 a 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 pró-inflamatórias 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: C₁₆H₁₇NO₄.

Dentre as atividades biológicas demonstradas pelas Riparinas, a ação anti-inflamatória da Riparina II em modelos animais, na qual se observou a diminuição dos níveis de TNF- α e IL-1 β (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⁺⁺ no compartimento intracelular e inibição da liberação dos estoques intracelulares de Ca⁺⁺ (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⁺ 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⁺ 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⁺ provenientes de pacientes infectados com CHIKV e indivíduos saudáveis.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar as características fenotípicas de linfócitos T CD8⁺, 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⁺ 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⁺ 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⁺ 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⁺ de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;

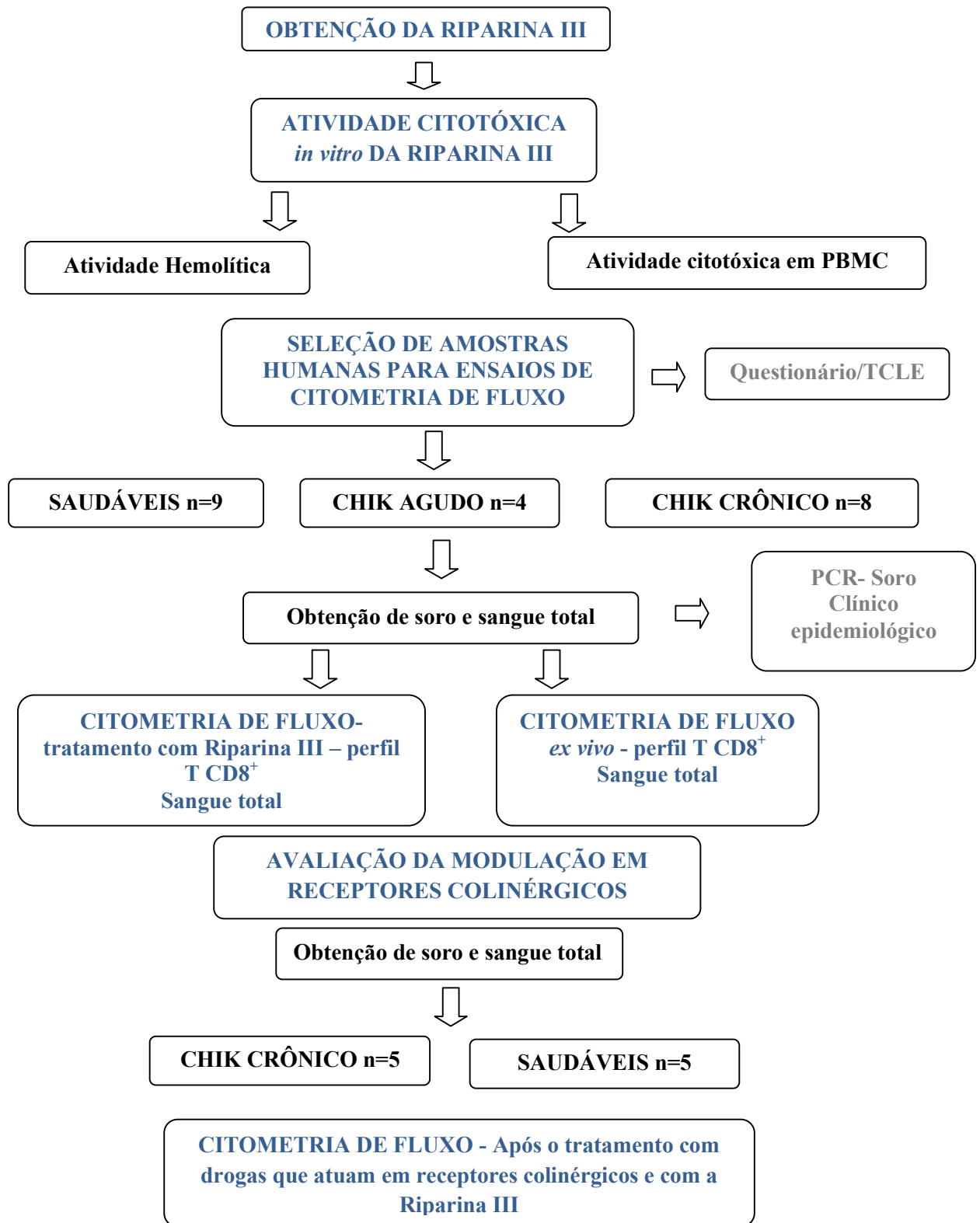
- Avaliar modulação da Riparina III na expressão de citocinas intracelulares inflamatórias (IL-17A e INF- γ), em células T CD8⁺ de pacientes em fase aguda e crônica de infecção;
- Avaliar modulação da Riparina III na expressão da citocina intracelular reguladora IL-10 e seu receptor (IL-10R) em células T CD8⁺ 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⁺ 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⁺, e o possível papel da Riparina III agindo nesses receptores em pacientes em fase crônica de infecção por CHIKV, na expressão de:
 - 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
 - Expressão de marcador de morte PD-1

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Fluxograma de Metodologia



4.1 Obtenção da Riparina III

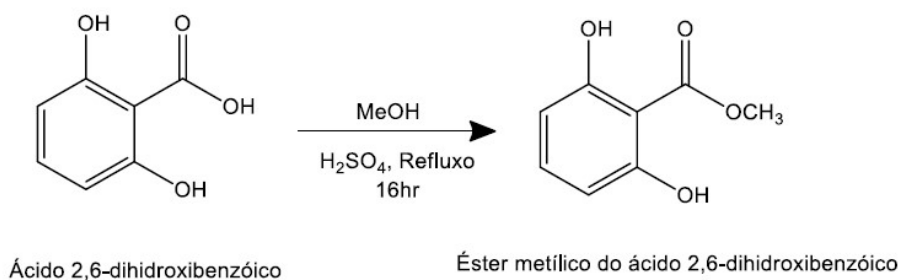
A Riparina III foi gentilmente cedida pelo professor Dr. José Maria Barbosa Filho. E todo o processo de obtenção foi realizado por seus alunos no laboratório do mesmo.

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

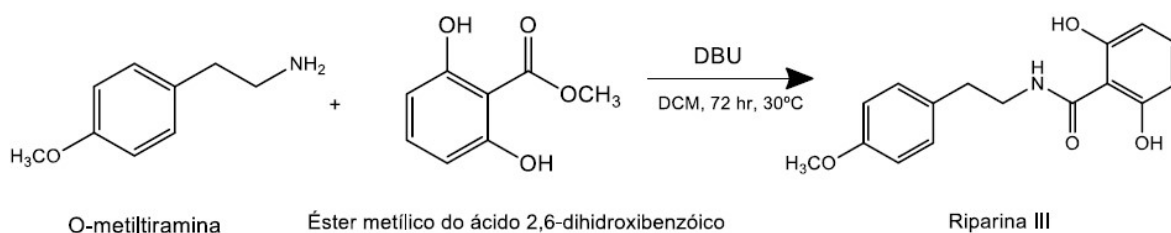
O método de obtenção da riparina III consistiu em duas etapas: (I) preparação do éster metílico do ácido 2,6-dihidroxibenzoico e (II) pela reação de Schotten- Baumann.

Etapa I



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:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Abs. do grupo tratado} - \text{Abs. do controle negativo}}{\text{Abs. do controle positivo} - \text{Abs. do controle negativo}} \times 100$$

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

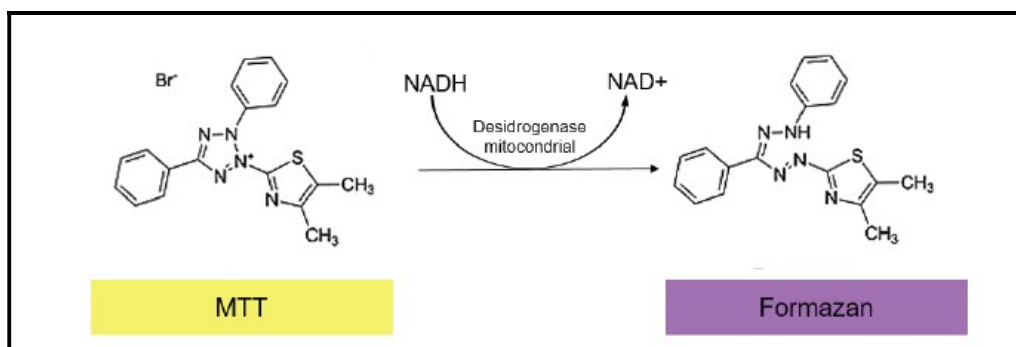
Para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis utilizou-se tubos com o anticoagulante heparina. Coletou-se 4mL de sangue total de indivíduos saudáveis (n=6) e diluiu-se o sangue em mesmo volume de PBS. Em um tubo Falcon estéril foi adicionado 4 mL de FICOLL Histopaque® 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 subseqüentes lavagens. Posteriormente foi desprezado o sobrenadante, despreendido 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 Tripán 0,4% (190 µL de célula + 10 µL de azul de tripan) para contagem em câmara 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 $2,5 \times 10^5$ 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 CO₂.

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.

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 $\geq 38^{\circ}\text{C}$, 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 *ependorfs* 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⁺ 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 a placa 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 ₂ O		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 alcalamida 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 (DaiggeVortex Genie 2, A. Daigge & 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- Pannel de marcação com anticorpos monoclonais para análise de células T CD8⁺ 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 (34 μ M) 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- 5 μ M (Agonista nicotínico), MLA-Metilicaconitina - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10 μ M (Antagonista muscarínico) e Riparina III - 34 μ M (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 CO₂ 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
x	CD69	CD8	2
x	PD1	CD8	3
x	IL10	CD8	4
INF γ	IL17	CD8	5
Granzima B	Perforina	CD8	6
IgG	IgG	x	7
x	x	x	8

			1	2	3	4	5	6	7	8
Sem Tratamento	A	FITC	x	x	x	x	INF γ	Granzima B	IgG	x
		PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
Riparina	B	FITC	x	x	x	x	INF γ	Granzima B	IgG	x
		PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
Atropina	C	FITC	x	x	x	x	INF γ	Granzima B	IgG	x
		PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
MLA	D	FITC	x	x	x	x	INF γ	Granzima B	IgG	x
		PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
MLA+Riparina	E	FITC	x	x	x	x	INF γ	Granzima B	IgG	x
		PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x
		PECy5	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	x	x
Atropina+Riparina	F	FITC	x	x	x	x	INF γ	Granzima B	IgG	x
		PE	CD107a	CD69	PD1	IL10	IL17	Perforina	IgG	x

apresentadas por linfócitos T CD8⁺ 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⁺ 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 (34 μ M), PNU-282987- 5 μ M (Agonista nicotínico), MLA - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10 μ M (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 25 μ L de leucócitos (2,5 x 10⁵ 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 10 μ L 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 μ L de RPMI suplementado com L-glutamina e 10% de SBF. A placa foi incubada

em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ 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.

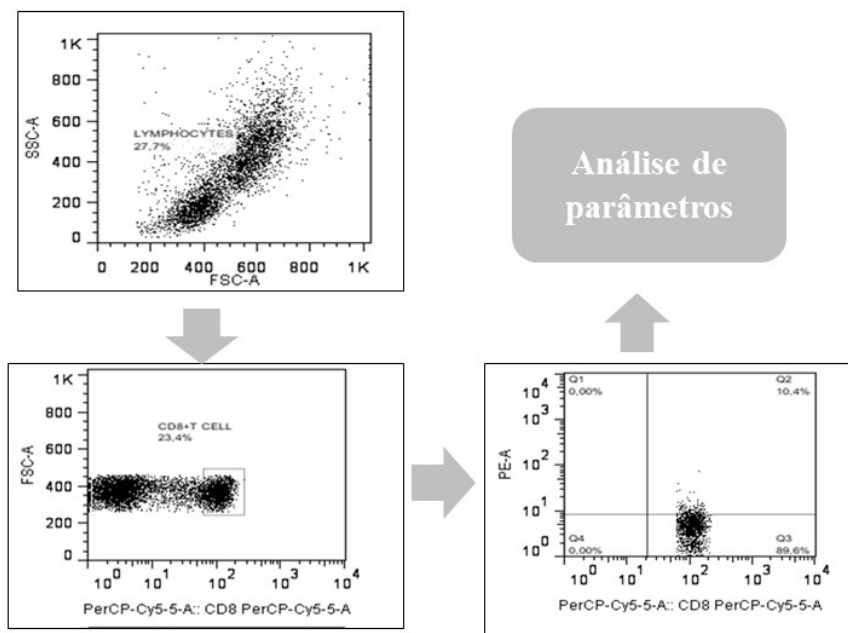
4.12 Citometria de fluxo

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⁺ e respectivos marcadores avaliados.

Para análise 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⁺ (**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⁺.



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 (34μM) e analisadas por no programa de análise *flowjo*. Gráficos de pontos representativos mostram a porcentagem de linfócitos e em seguida de linfócitos T CD8⁺ e expressão de CD69 em células T CD8⁺.

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⁺ 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⁺ 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%

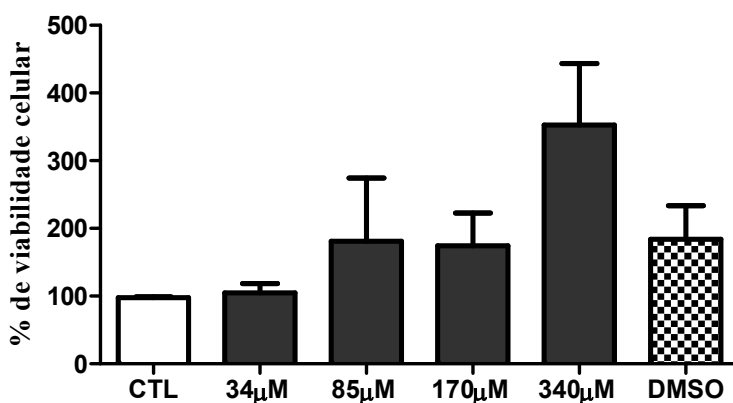
Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média da % de hemólise calculada com base em três experimentos independentes.

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 significativa 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_2 durante 24h. A leitura em espectrofotômetro em absorbância de 540nm. Gráfico representa a média $\pm$ 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
<i>ARB CTL 1</i>	50	F	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 2</i>	51	F	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 4</i>	51	F	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 5</i>	31	M	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 6</i>	25	F	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 8</i>	26	F	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 9</i>	27	F	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 10</i>	25	M	-	Indivíduo Saudável
<i>ARB CTL 11</i>	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
<i>ARB02</i>	19 anos	M	2	Febre ($> 38^{\circ}\text{C}$), cefaleia, dor nas costas, edema e calafrios.
<i>ARB12</i>	Não Informado	M	5	Febre (39.2°C), cefaleia, vômito, exantema, mialgia e artralgia.
<i>ARB 35</i>	27 anos	M	2	Febre (39.5°C), artralgia, cefaleia, hipertrofia ganglionar, dor retro orbital.
<i>ARB 38</i>	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.

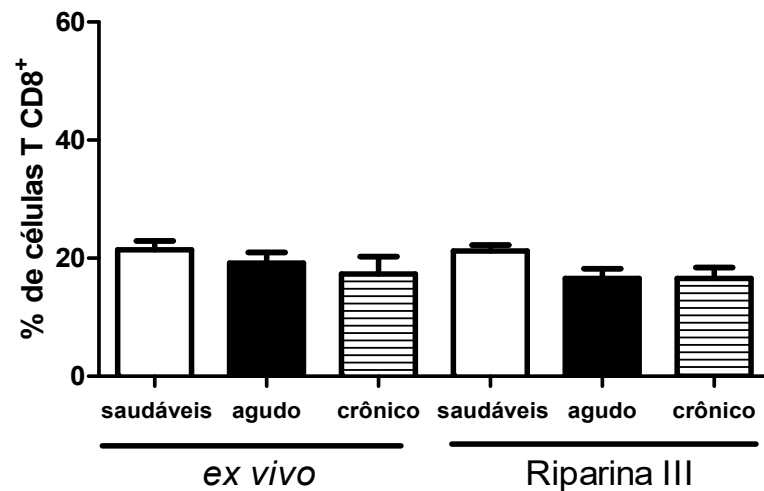
Código	Idade	Sexo	Tempo de início dos sintomas (Meses)	Sinais e Sintomas
<i>ARB 18</i>	33	F	10	Edema frequente e artralgia e fadiga pós- esforço.
<i>ARB 19</i>	27	F	6	Artralgia frequente.
<i>ARB 20</i>	31	F	7	Artralgia frequente.
<i>ARB 27</i>	21	M	8	Artralgia e edema.
<i>ARB 37</i>	50	F	9	Artralgia,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

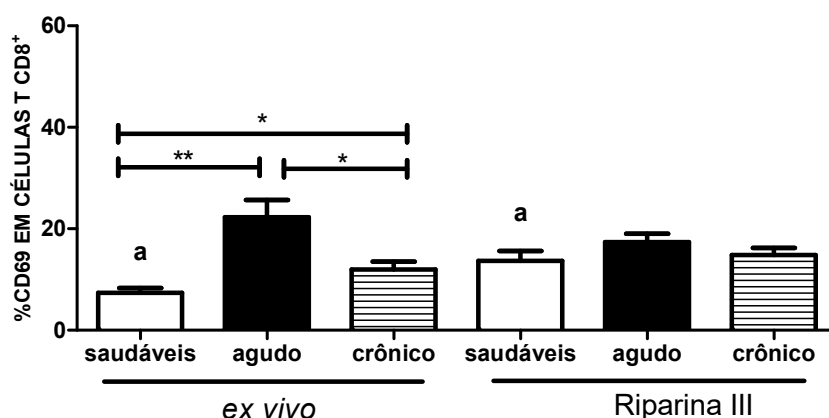


Fonte: DIAS, 2019. O gráfico demonstra a % das células T CD8⁺ *ex vivo* e tratadas com 34μM Riparina III. Células provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo test *t*'student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

5.5 Expressão do perfil fenotípico de ativação celular (marcador extracelular CD69) em linfócitos T CD8⁺ 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⁺ 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⁺ 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.

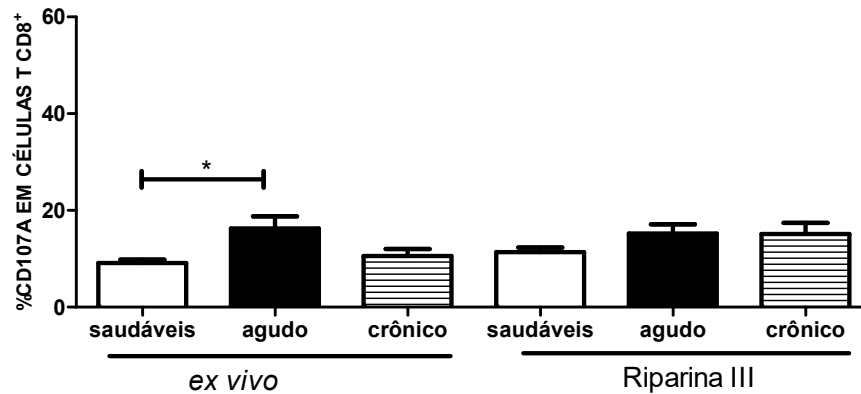


Fonte: DIAS, 2019. Expressão CD69 em T CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Letras representam diferenças 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⁺ de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e crônica *ex vivo* e após o tratamento com a Riparina III.

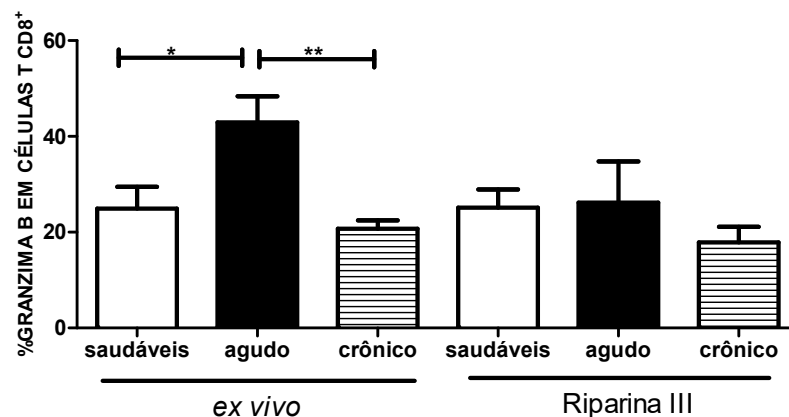
A expressão da molécula CD107a é um importante parâmetro para a avaliação da formação de sinapses citotóxicas e medeia a exocitose da Granzima B. Demonstrou-se que a expressão dessa molécula foi regulada positivamente (**Gráfico 4**) em pacientes infectados com o CHIKV em fase aguda em relação a indivíduos 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⁺ 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⁺ 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.



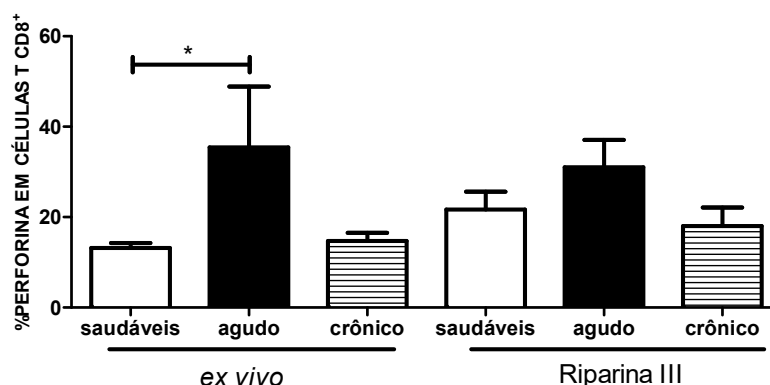
Fonte: DIAS, 2019. Expressão CD107A em T CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa a 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 $p < 0,05$.

Gráfico 5 – Produção de Granzima B em células T CD8⁺ 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⁺ 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 $p < 0,05$. (**) e representa $p < 0,005$.

Gráfico 6 – Produção de Perforina em células T CD8⁺ 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.



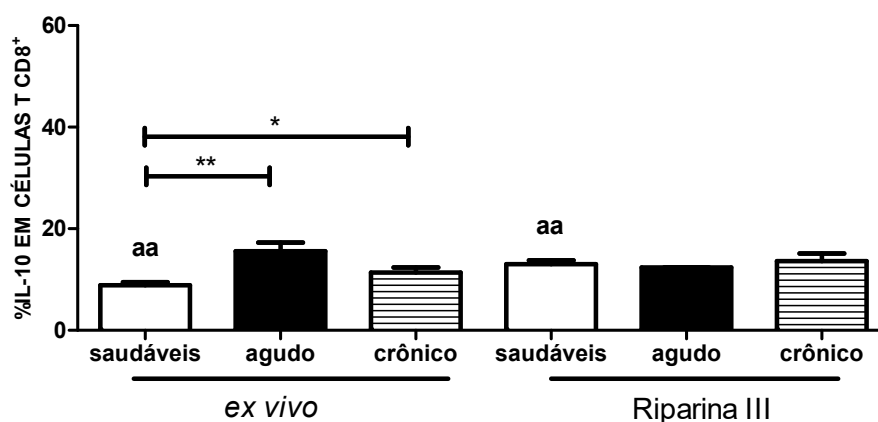
Fonte: DIAS, 2019. Produção de Perforina em T CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa 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⁺ 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⁺ 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**).

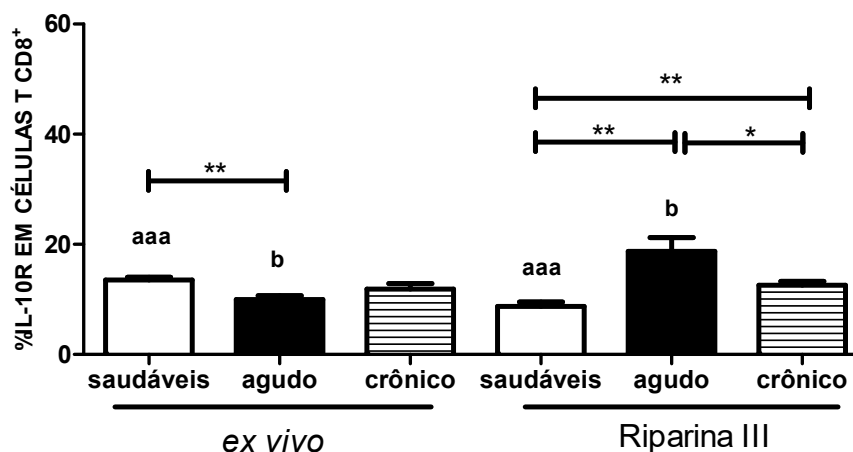
Por outro lado, em relação a IL-10R, a expressão foi menor na fase aguda da doença quando comparado com indivíduos saudáveis *ex vivo*. Em células tratadas com a Riparina III, como observado no **gráfico 8**, houve diminuição da expressão de IL-10R em células provenientes de indivíduos saudáveis e aumento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

Gráfico 7 - Produção de IL-10 em células T CD8⁺ 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⁺ 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⁺ 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.



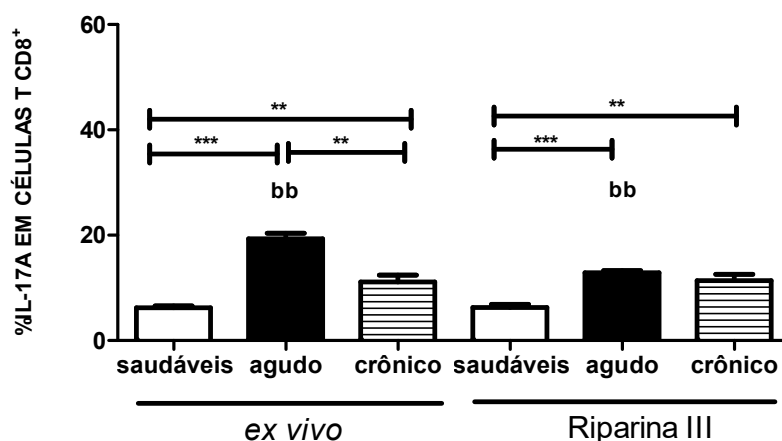
Fonte: DIAS, 2019. Expressão de IL-10R em T CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Letras representam 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 (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⁺ 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 (**Gráfico10**). Os níveis de expressão de IL-17A em linfócitos T CD8⁺ 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⁺ de pacientes na fase aguda em relação ao grupo *ex vivo*.

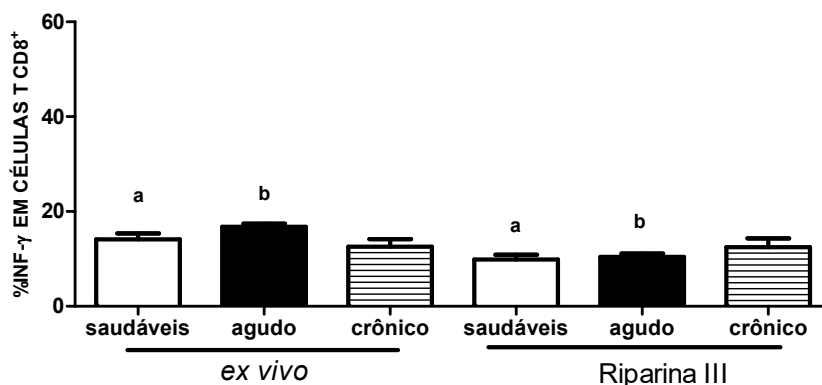
Não houve mudança de expressão de INF- γ por linfócitos T CD8⁺ de pacientes em fase aguda e crônica da doença em relação aos indivíduos saudáveis. A Riparina III, por sua vez, foi capaz de modular negativamente a expressão do INF- γ (**Gráfico10**) tanto em células T CD8⁺ de indivíduos saudáveis quanto 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⁺ 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⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34 μ 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 (bb) representa $p < 0,005$. (***) representa $p < 0,0001$.

Gráfico 10 - Produção de INF- γ em células T CD8⁺ 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- γ em T CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34 μ 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⁺ 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⁺ de nenhum dos grupos avaliados (**Gráfico 11**).

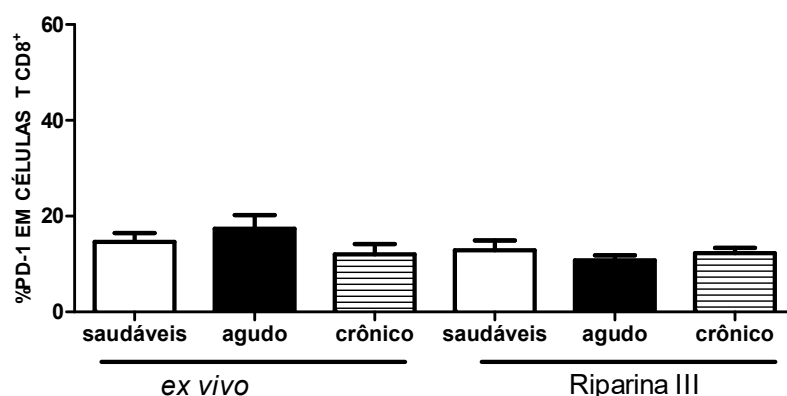
A via de indução de morte celular CD95/ CD95L também foi investigada e demonstrou-se um aumento na expressão do marcador CD95(Fas) em células provenientes de pacientes na fase crônica em relação aos indivíduos saudáveis *ex vivo*. A Riparina III foi capaz de aumentar a expressão dessa proteína nas células T CD8⁺ 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**).

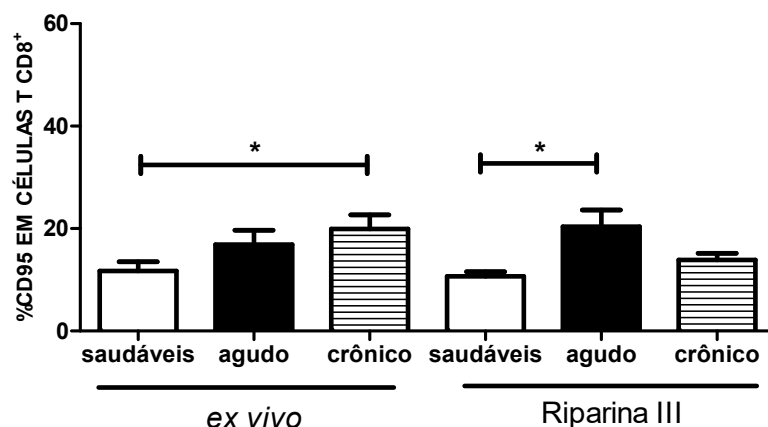
Quando se avaliou a coexpressão de CD95/CD95L (**Gráfico 14**) nas duas fases da infecção *ex vivo* observou-se um aumento da coexpressão em relação aos indivíduos saudáveis. Quando as células foram tratadas com a Riparina III observou-se uma manutenção do aumento da coexpressão em linfócitos T CD8⁺ 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⁺ 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.



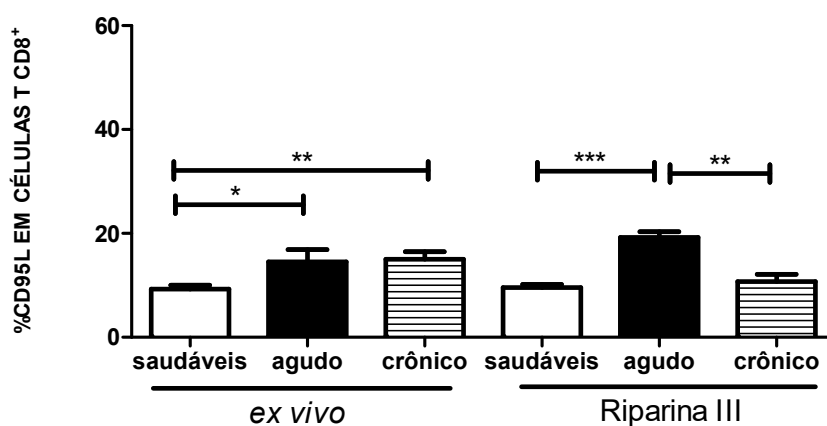
Fonte: DIAS, 2019. Expressão de PD-1 em T CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Gráfico representa a média ± erro padrão da média. Médias foram comparadas pelo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

Gráfico 12 - Expressão de CD95 em células T CD8⁺ 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.



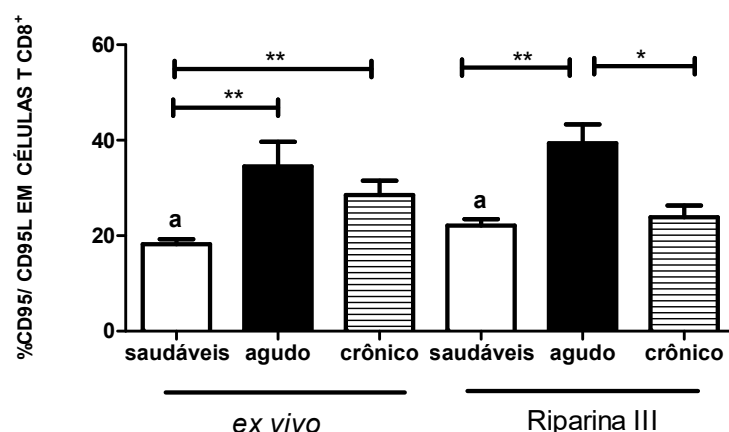
Fonte: DIAS, 2019. Expressão de CD95 (Fas) em T CD8⁺ provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes infectados com CHIKV em fase aguda e fase crônica. Riparina III representa células tratadas durante 16h com 34μM dessa droga. Barras representam a diferença entre os diferentes grupos. Gráfico representa 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 $p < 0,05$.

Gráfico 13 - Expressão de CD95L em células T CD8⁺ 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⁺ 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 $p < 0,05$. (**) e representa $p < 0,005$ e (***) representa $p < 0,0001$.

Gráfico 14 - Coexpressão de CD95/CD95L em células T CD8⁺ de indivíduos saudáveis, pacientes infectados com CHIK



Fonte: DIAS, 2019. Coexpressão de CD95/CD95L (Fas/Fas-L) em T CD8⁺ 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.

5.10 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.

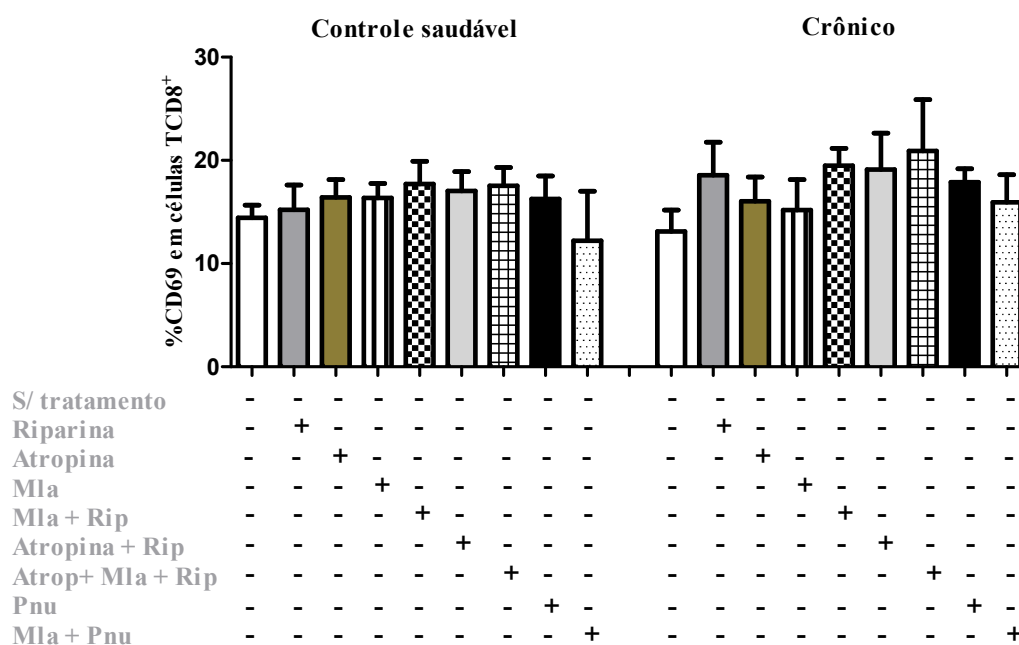
Este item refere-se aos resultados obtidos a partir dos experimentos realizados de acordo com o objetivo específico III, o qual visou à avaliação da participação de receptores colinérgicos na modulação de características fenotípicas de linfócitos T CD8⁺ na infecção por CHIKV.

Além da avaliação das características fenotípicas de células T CD8⁺ 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⁺ 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

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- 5 μ M (Agonista nicotínico), MLA- Metilicaconitina - 100nM (Antagonista nicotínico), Atropina - 10 μ M (Antagonista muscarínico) e Riparina III (34 μ M)] alterou a expressão desse marcador, como demonstrado no **gráfico 15**, não houve alteração de expressão de CD69 por células T CD8⁺ em nenhum dos grupos avaliados.

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



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⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.

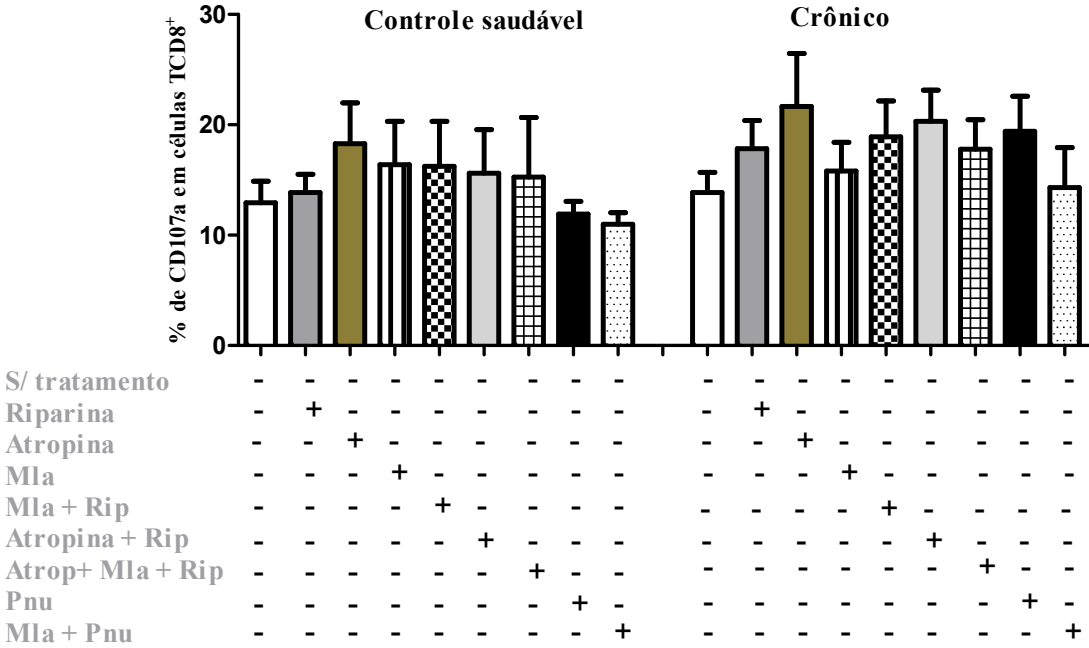
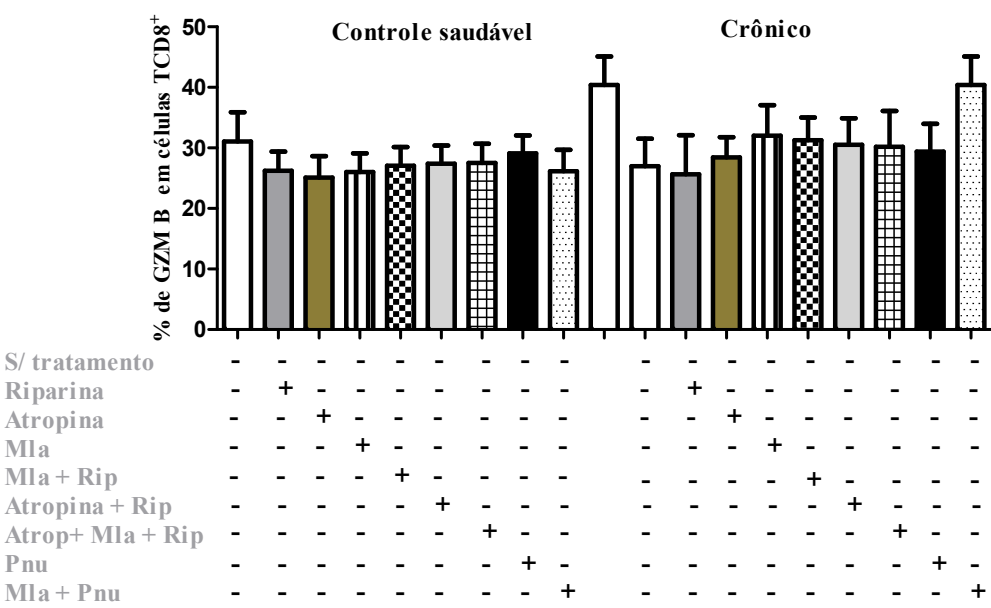


Gráfico 17- Produção de Granzima B em células T CD8⁺ de pacientes crônicos e indivíduos saudáveis após o tratamento com as diferentes drogas avaliadas.



Fonte: Dias, 2019. Produção de Granzima B em células T CD8⁺ de indivíduos saudáveis e pacientes infect

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

