



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

GISNAYLE ANA DA SILVA PEREIRA

**ANÁLISE DE RECEPTORES TOLL-LIKE E CITOCINAS ENVOLVIDAS NA
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÕES VIRAIS**

Recife

2021

GISNAYLE ANA DA SILVA PEREIRA

**ANÁLISE DE RECEPTORES TOLL-LIKE E CITOCINAS ENVOLVIDAS NA
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÕES VIRAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador (a): Dr. José Luiz de Lima Filho

Coorientador (a): Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Pereira, Gisnayle Ana da Silva

Análise de receptores tool-like de citocinas envolvidas na susceptibilidade à infecções virais / Gisnayle Ana da Silva Pereira. – 2021.

53 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho.

Coorientadora: Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Viroses. 2. Chikungunya. 3. Imunidade natural. I. Lima Filho, José Luiz de (orientador). II. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (coorientadora). III. Título.

616.91

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2022-087

GISNAYLE ANA DA SILVA PEREIRA

ANÁLISE DE RECEPTORES TOLL-LIKE E CITOCINAS ENVOLVIDAS NA
SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÕES VIRAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências da
Universidade Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutorado. Área de
concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 27/10/2021

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima-Filho

Departamento de Bioquímica - UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Departamento de Patologia – UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – UFPE

Prof. Dr. Fabrício Motteran

Departamento de Engenharia Civil e Ambiental – UFPE
Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA)
Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental (LABIOTA)

Profa. Dra. Claudia Diniz Lopes Marques

Departamento de Medicina Clínica - UFPE
Hospital das Clínicas - UFPE

Profa. Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

Departamento de Genética – UFPE
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE

RESUMO

Dentre os principais tipos de patologias virais descritas como epidemias estão as infecções ocasionadas pelos vírus da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV). A infecção pelo CHIKV causou grande impacto a saúde pública devido a presença de sintomas altamente debilitantes como, inflamações nas articulações que podem durar meses ou anos. A inflamação induzida pela infecção viral está associada a moléculas da imunidade inata, mas pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da infecção, não estando eles totalmente elucidados. Em nossas análises avaliamos polimorfismos em Receptores Toll-Like (TLRs) associados à infecções virais e avaliar a expressão gênica de citocinas induzidas em pacientes infectados pelo vírus Chikungunya. Através do banco de dados de previsão funcional não sinônimo (dbNSFP) coletamos dados de SNPs não sinônimos (nsSNPs) presentes em TLRs (TLR3, 4, 7, 8, 9 e 10) e realizamos uma análise computacional preditiva de impactos funcionais dos nsSNPs nos TLRs através de 16 algoritmos. Ferramentas para previsão de danos estruturais nas proteínas após a mutação também foram utilizados. Adicionalmente, neste estudo, níveis de expressão das citocinas IL-1 β , IL-10, IL-18 e IFN- β foram avaliados, por PCR em tempo real, em sangue total de pacientes na fase aguda da infecção por CHIKV (n=43) e de indivíduos saudáveis (IS), não infectados (n=13) utilizados como grupo controle. Treze nsSNPs foram encontrados com alto impacto funcional/estrutural. O nsSNP TLR3 p.Leu532Pro, foi previsto como deletério à função da proteína por todos os algoritmos. TLR4 p.Leu452Arg e TLR7 p.Leu179Arg, além de terem sido previstos como deletérios pela maioria dos algoritmos, foram os nsSNPs que obtiveram maior variação na hidrofobicidade (0.53). Análises em estruturas 3D corroboraram com os resultados dos algoritmos, devido à presença e ao impacto de tais mutações em regiões conservadas, importantes no reconhecimento viral e na dimerização protéica, iniciando a via de sinalização. Os pacientes infectados pelo CHIKV apresentaram diminuição na expressão de IL-18, enquanto um grupo de pacientes apresentou níveis elevados de expressão de IL-1 β , e um grupo de pacientes apresentou redução da expressão da citocina, quando comparados aos IS. Valores mais altos de expressão foram encontrados na IL-1 β quando comparados à IL-18, havendo diferença estatística significativa de expressão, apesar da expressão de IL-1 β e IL-18 ser *downregulated*. Em nossos resultados a infecção pelo CHIKV em pacientes em fase aguda induziu diminuição na produção de IL-1 β e IL-18, moléculas da imunidade inata transcritas por TLRs e ativadas por inflamassomas. Havendo correlação regular positiva entre os genes IL-1 β e IL-18 e o gênero dos pacientes, onde níveis de IL-1 β são menores em mulheres e níveis de IL-18 são maiores em mulheres, e correlação positiva entre

as expressões de IL-1 β e IL-18 e a idade dos pacientes, onde níveis mais baixos de expressão de IL-1 β e níveis mais altos de expressão de IL-18 estão associados à idades mais avançadas. Através do nosso estudo, descobrimos polimorfismos que podem ter alta correlação com doenças causadas por infecções virais, podendo atuar como potenciais biomarcadores prognósticos, e citocinas que podem ter correlação com a febre Chikungunya, sendo considerados bom marcadores para o direcionamento terapêutico.

Palavras-chave: Infecções virais; Chikungunya; imunidade inata; receptores Toll-like; citocinas

ABSTRACT

Among the main types of viral pathologies described as epidemics are infections caused by the Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) virus, arboviruses whose main mode of transmission occurs through the same vector the *Aedes aegypti* mosquito. The CHIKV infection caused a great impact on public health due to the presence of highly debilitating symptoms such as inflammation in the joints that can last for months or years. Although there are no specific vaccines or drugs for the disease, it is known that inflammation induced by viral infection is associated with innate immunity molecules. However, little is known about the mechanisms involved in the pathogenesis of the infection, and they are not fully elucidated. In our analyzes we evaluated polymorphisms in Toll-Like Receptors (TLRs) associated with viral infections and to evaluate levels of gene expression of cytokines induced in patients infected with the Chikungunya virus. Using the Non-Synonymous Functional Prediction database (dbNSFP), we collected data from non-synonymous SNPs (nsSNPs) present in TLRs (TLR3, 4, 7, 8, 9 and 10) and performed a predictive computational analysis of the functional impacts of nsSNPs in TLRs through 16 algorithms. Tools for predicting structural damage to proteins after the mutation were also used. In addition, in this study, expression levels of the cytokines IL1- β , IL10, IL18 and IFN- β were evaluated, by real-time PCR, in whole blood of patients in the acute phase of CHIKV infection (n = 43) and healthy individuals (IS), uninfected (n = 13) used as a control group. Thirteen nsSNPs were found to have a high functional/structural impact. The nsSNP TLR3 p.Leu532Pro, was predicted to be damage to the function of the protein by all algorithms. TLR4 p.Leu452Arg and TLR7 p.Leu179Arg, in addition to being predicted as deleterious by most algorithms, it was the nsSNPs that obtained the greatest variation in hydrophobicity (0.53). Analysis in 3D structures corroborated with the results of the algorithms, due to the presence and impact of such mutations in conserved regions, important in viral recognition and protein dimerization, initiating the signaling pathway. Patients infected with CHIKV showed a decrease in IL18 expression, while a group of patients showed high levels of IL1- β expression, and a group of patients showed a reduction in cytokine expression, when compared to IS. Higher values of expression were found in IL1- β when compared to IL18, with a statistically significant difference in expression, despite the expression of IL1- β and IL18 being *downregulated*. In our results, CHIKV infection in patients in the acute phase induced a decrease in the production of IL1- β and IL18, molecules of innate immunity transcribed by TLRs and activated by inflammasomes. There is a regular positive correlation between the IL1- β and IL18 genes and the patient's gender, where IL1- β levels are

lower in women and IL18 levels are higher in women, and a positive correlation between IL1- β and IL18 expressions and the age of the patients, where lower levels of IL1- β expression and higher levels of IL18 expression are associated with older ages. Through our study, we discovered polymorphisms that can be highly correlated with diseases caused by viral infections, which can act as potential prognostic biomarkers, and cytokines that can be correlated with Chikungunya fever, being considered good markers for therapeutic targeting.

Keywords: Viral infections; Chikungunya; innate immunity; Toll-like receptors; cytokines

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Diferenças entre Dengue, Chikungunya e Zika (BLASTING NEWS BRASIL, 2016)	19
FIGURA 2 - Estrutura e genoma do vírus Chikungunya. (A) vírus CHIKV. (B) Representação esquemática de partículas virais. (C) Representação esquemática do genoma viral (METZ; PIJLMAN, 2016)	22
FIGURA 3 - Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i> (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020)	23
FIGURA 4 - Disseminação do vírus Chikungunya em humanos (LUM; NG, 2015)	24
FIGURA 5 - Via de sinalização dos Receptores Toll-Like. TLRs expressos ativando vias de sinalizações que desencadeiam a translocação de fator nuclear κ B (NF- κ B) ao núcleo celular induzindo a expressão de de IFNs do tipo I e citocinas pró-inflamatórias (OZATO et al., 2008)	27
FIGURA 6 - Via de sinalização do inflamassoma. Esquema da NALP3, proteína codificada pelo gene NLRP3. A figura mostra a transcrição das proformas das citocinas IL-1 β e IL-18 através de TLRs e conversão destes em formas ativas através do inflamassoma NALP3 (PIETROCOLA et al., 2011)	30
FIGURA 7 - Estrutura do Receptor Toll-Like. A figura apresenta os domínios presentes nos TLRs. Adaptado de GAO et al., 2017.....	32
FIGURA 8 - Motivo LRR-TLR3. Núcleo hidrofóbico composto por resíduos que formam a sequência consenso xL ² xxL ⁵ xL ⁷ xxN ¹⁰ xL ¹² xxL ¹⁵ xxxxxF ²⁰ xxL ²³ x (CHOE; KELKER; WILSON, 2005)	33
FIGURA 9 - Resultado detalhado da análise do algoritmo PolyPhen-2 para consulta de variante única (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013)	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Localização dos TLRs e padrões moleculares associados à patógenos reconhecidos por TLRs relatados na literatura em associação à infecções virais.....	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6K	Proteína acessória
ANN	Artificial neural network
C	Proteína do capsídeo
CARD	Domínio de ativação e recrutamento de caspase
cDNA	DNA complementar
CHIKV	Vírus Chikungunya
DENV	Vírus da Dengue
DM	Dinâmica molecular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de fita dupla
E	Proteína do envelope viral
HF	High fever (febre alta)
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IS	Indivíduo saudável
JP	Joints Pain (Dores nas articulações)
LPS	Lipopolissacarídeos
LRRs	Repetições ricas em leucina
MyD88	Fator de <i>diferenciação mieloide 88</i>
NALP3	Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NLR	Receptor do tipo Nod Like
NK	Natural Killer
nsP	Proteína não estrutural
nsSNP	Polimorfismo de nucleotídeo único não sinônimo
OMS	Organização mundial de saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia de polimerase

PDB	Banco de dados de Proteína
PYD	Domínio da pirina
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RT-qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa em Tempo Real
RF	Random Forest
RNA	Ácido ribonucleico
ssRNA	RNA de fita simples
SDM	Simulações de dinâmica molecular
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SR	Skin rash (rash cutâneo)
SVM	Support vector machine
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TF	Proteína transframe
TIR	Receptor IL-1 de domínio Toll
TLR	Receptores Toll-Like
TM	Transmembrana
TNF	Fator de necrose tumoral
TRIF	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR induzindo interferon β
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 INFECÇÃO VIRAL.....	17
2.2 ARBOVIROSES.....	17
2.3 VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)	20
2.3.1 Genoma do vírus Chikungunya.....	21
2.3.2 Disseminação do vírus Chikungunya.....	22
2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA.....	25
2.5 RECEPTORES TOLL-LIKE.....	26
2.6 TLRs E VIA DE SINALIZAÇÃO.....	26
2.6.1 Citocinas.....	28
2.6.2 Inflamassoma.....	29
2.7 TLRs E INFECÇÕES VIRAIS.....	31
2.8 ESTRUTURA DOS TLRs.....	32
2.9 BIOINFORMÁTICA.....	34
2.9.1 Algoritmos de predição funcional.....	35
2.9.2 Algoritmos de predição estrutural.....	37
2.9.3 Modelagem por homologia.....	38
3 JUSTIFICATIVA	40
4 OBJETIVOS.....	41
4.1 OBJETIVO GERAL.....	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41

5 MANUSCRIPT 1: COMPUTATIONAL ANALYSIS OF DELETERIOUS IMPACT OF NON-SYNONYMOUS SNPs IN TOLL-LIKE RECEPTORS GENES ASSOCIATED WITH VIRAL INFECTIONS.....	42
6 MANUSCRIPT 2: EVALUATION OF THE PROFILE OF CYTOKINES INVOLVED IN THE INNATE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS INFECTED BY THE CHIKUNGUNYA VIRUS.....	44
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A.....	53

1 INTRODUÇÃO

Desde o final do ano de 2015, o Brasil precisou reorganizar seu serviço de saúde para o enfrentamento de recorrentes epidemias de dengue, febre chikungunya e zika, doenças transmitidas pela picada de mosquitos infectados, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. No entanto, o que deixou o país em evidência na mídia mundial, foi o fortalecimento da associação entre o vírus Zika e casos de malformações congênitas em recém-nascidos, através de achados necroscópicos de alta concentração viral no tecido nervoso de natimortos acometidos por microcefalia, característica predominante entre o amplo espectro de malformações (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Atualmente o Nordeste foi a região que apresentou a maior taxa de incidência de casos registrados de Chikungunya no Brasil, sendo o estado de Pernambuco umas das unidades da federação que apresentou maior número de casos confirmados (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Descrita como grave problema de saúde pública, a febre Chikungunya é uma doença viral reemergente, cujo agente etiológico, o vírus Chikungunya (CHIKV), foi isolado pela primeira vez em 1952 por Ross em Newala, atual Tanzânia (MARTINS et al., 2020). O termo “Chikungunya” é um termo derivado da língua Makonde, língua de um grupo étnico do sudeste da Tanzânia e norte de Moçambique, que significa “aqueles que se dobram”, pela aparência curva e fortes artralgias observadas nas pessoas infectadas (DÍAZ et al., 2019).

No Brasil a febre Chikungunya foi identificada pela primeira vez em setembro de 2014, quase que simultaneamente nas regiões Norte e Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016), e de acordo com dados epidemiológicos de 2021, até o dia 29 de maio foram registrados 36.242 mil casos prováveis de Chikungunya com taxa de incidência de 17,1 casos por 100 mil habitantes no país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). O vírus Chikungunya (CHIKV), é um vírus do gênero *Alphavirus*, pertencente à família *Togaviridae*, que possui genoma de RNA de fita simples e é transmitido por artrópodes que caracterizam a doença como uma arbovirose, sendo os mosquitos do gênero *Aedes* (*Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*) os principais vetores (KISER; SOKOLOSKI; HARDY, 2021).

O quadro clínico clássico da infecção consiste em uma tríade que inclui febre, erupções cutâneas e dores nas articulações (do joelho, tornozelo, pulso, dos pés e mãos). O período de incubação varia entre 3 a 7 dias, onde os indivíduos experimentam a fase aguda da infecção. Após essa fase, para alguns acometidos pela infecção, dores articulares intensas podem persistir

por longos períodos, podendo durar meses e anos (LIMA et al., 2020). Além destas manifestações clínicas típicas, casos mais raros foram relatados, onde alguns pacientes evoluíram para manifestações atípicas, como problemas cardíacos, síndrome de Guillain-Barré (SCHWARTZ; ALBERT, 2010) e quadros de danos neurológicos associados a infecção por CHIKV, proeminentes de transmissões verticais em neonatos de mães infectadas durante a gestação (WEAVER; CHEN; DIALLO, 2020).

Embora o número de casos de síndromes neurológicas relacionadas à arboviroses tenha crescido significativamente no país, a relação entre infecções por arbovírus e a resposta imunológica inata desenvolvida não está bem elucidada (RATHORE et al., 2019; TOMAR et al., 2019). Na atuação contra agentes infecciosos, a imunidade inata funciona como primeiro mecanismo de defesa do organismo, sendo este mecanismo primordial para a consequente ativação da imunidade adaptativa (SORDI et al., 2020).

Os receptores Toll-Like (TLR), principais moduladores da resposta imune inata, são proteínas transmembranares responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, realizando o recrutamento de células imunitárias através da geração de sinais que produzem citocinas pró-inflamatórias. Em humanos, foram reportados dez TLRs e de acordo com o local onde estão presentes classificam-se em TLRs de superfície celular e TLRs intracelulares (WANG et al., 2020). Dentre os TLRs reportados na literatura em associação à vírus estão TLR3, cujo o impacto de polimorfismos está associado à infecção pelo vírus da hepatite B (FISCHER et al., 2018), TLR4, cuja superexpressão está associada à doenças inflamatórias vistas como fatores de risco para COVID-19 (BRANDÃO et al., 2020), TLR7 e TLR8, cujas alterações de variações genéticas influenciam na suscetibilidade à infecção pelo vírus Chikungunya (DUTTA e TRIPATHI, 2017), TLR9 e TLR10, genes que possuem a expressão aumentada diante da infecção pelo vírus da Dengue (PARTHASARATHY et al., 2018).

As citocinas são polipeptídeos considerados mediadores importantes do sistema imunológico, e assim como os TLRs são essenciais na defesa do hospedeiro contra microorganismos (SHEA; GADINA; SIEGEL, 2019). Durante investigações de desempenho de citocinas em infecções virais foi possível verificar fases agudas de infecções por arbovírus sendo caracterizadas por aumentos significativos nos níveis de expressão de IL1 β e IL18 (HALFMANN; HILL-BATORSKI; KAWAOKA, 2018), bem como por menores valores dos níveis de expressão de IL-10 em pacientes infectados pelo CHIKV (SEHRAWAT et al., 2018).

Além de contribuírem para aumento na susceptibilidade à diversas infecções virais, polimorfismos em TLR podem também alterar a resposta celular e a produção de citocinas. Atualmente a aplicação de diversos métodos computacionais para analisar impactos estruturais

e funcionais ocasionados por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em proteínas, tem contribuído bastante para o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática, como, por exemplo, algoritmos de predição, recursos on-line capazes de classificar variações genéticas como deletérias ou neutras à estrutura e ao funcionamento de proteínas (YAZAR ; OZBEK, 2020).

Desta forma o presente estudo visa avaliar o impacto estrutural e funcional de polimorfismos em TLRs associados à infecções virais através de algoritmos computacionais e avaliar níveis de expressão gênica de citocinas envolvidas na imunidade inata e estimuladas mediante infecção pelo vírus Chikungunya. Tais resultados podem contribuir para a ampliação do conhecimento acerca da resposta imunológica em pacientes, auxiliando no futuro desenvolvimento de vacinas e medicamentos contra a febre Chikungunya.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INFECÇÃO VIRAL

Vírus são considerados pequenos agentes infecciosos, microrganismos acelulares, que necessitam de células vivas para sua reprodução. Quando aderem às células, e uma vez dentro delas liberam seu material genético (DNA e RNA), os vírus assumem o controle, sendo capazes de se multiplicar, danificar a função celular e destruir células essenciais, ocasionando infecção viral. As infecções virais podem se manifestar de forma aguda, indicando a produção rápida de vírus e a eliminação rápida da infecção pelo hospedeiro, e de modo persistente, quando as infecções não são eliminadas rapidamente e partículas virais podem continuar sendo produzidas por longos períodos, classificando-se em três tipos de infecções: crônica, de evolução lenta e latente. A transmissão viral ocorre de um hospedeiro para o outro através de uma única espécie ou de uma espécie à outra. De modo horizontal ou vertical, a transmissão ocorre por meio de diversas vias de penetração do vírus no organismo, como pele, mucosa do trato respiratório, mucosa do trato digestivo, mucosas da conjuntiva e do trato urogenital (ATLAS DA SAÚDE, 2019).

Embora a maioria das infecções virais possam ser assintomáticas, sugerindo que em muitos casos as defesas do hospedeiro são capazes de combater os vírus antes da manifestação dos sintomas das doenças (KAWAI; AKIRA, 2006), o surgimento de novas doenças infecciosas continua caracterizando as infecções virais como emergência de saúde pública de interesse internacional, enfatizando à busca por medicamentos antivirais e vacinas, visando a contenção de epidemias (CASTRO, 2021).

2.2 ARBOVIROSES

Condições climáticas e ambientais associadas à fatores sociais, como baixo nível de escolaridade, pobreza e saneamento escasso, contribuíram para a incidência de muitas doenças transmitidas por vetores nos últimos anos. Tais doenças correspondem à cerca de 17% da carga mundial de doenças infecciosas e são consideradas ameaças à saúde pública, pois mais de 80% da população mundial vive em áreas com risco de transmissão (AVENDANHO E SAID, 2019). Dentre os principais tipos de patologias virais que foram descritas como epidemias estão as infecções ocasionadas pelos vírus da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV),

arboviroses cujo modo de transmissão ocorre através do mesmo vetor, o mosquito *Aedes aegypti* (RODRIGUES et al., 2021).

No Brasil, até o início do ano de 2014 apenas a Dengue foi identificada como grave problema de saúde pública, apresentando números alarmantes de casos. Em setembro do mesmo ano e maio de 2015, respectivamente, os primeiros casos de Chikungunya e Zika foram confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). De acordo com o ministério da saúde, desde 2016 o Brasil tem passado por epidemias reincidentes de doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti*. Com base em dados epidemiológicos de 2021, até o dia 29 de maio foram registrados 348.508 mil casos prováveis de Dengue no país, representando uma taxa de incidência de 164,6 casos por 100 mil habitantes, seguidos de 36.242 mil casos prováveis de Chikungunya com taxa de incidência de 17,1 casos por 100 mil habitantes no país, onde a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência, e 2.006 mil casos prováveis de zika (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Além de fatores como evolução, adaptação de espécies e alterações gênicas, determinantes na produção de cepas mais virulentas, o clima é considerado um fator extremamente importante na distribuição geográfica dos artrópodes (CHRISTO, 2015). Por ser um país tropical repleto de ecossistemas naturais, além de possuir uma grande diversidade de fauna composta de muitos artrópodes, como, por exemplo, mosquitos, o Brasil possui temperaturas anuais médias, o que favorece a adequação ambiental para disseminação de arboviroses e consequentemente a produção de maiores epidemias (HUBER et al., 2018).

Atualmente, a Dengue é ocasionada por infecção através de um dos quatro sorotipos identificados (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) (ACHYAR et al., 2021), enquanto que Chikungunya e Zika são ocasionadas, respectivamente, pelos vírus CHIKV (HSU et al., 2019) e ZIKV (BROWN et al., 2019), e embora tais arboviroses possuam vírus distintos, elas apresentam sinais clínicos bem semelhantes como, febre, dores de cabeça, erupção cutânea e dores nas articulações (MARINHO et al., 2018). No entanto, manifestações distintas podem diferenciar seu diagnóstico, a dengue, por exemplo, pode ser caracterizada por febre alta e de início súbito variando entre 38,8° a 40,5°C, cefaleia frontal, dor atrás dos olhos, náusea, vômito (2 a 7 dias) e sinais hemorrágicos, em casos de dengue hemorrágica. Na Chikungunya, a febre é mais moderada, as dores articulares são de forte intensidade e são bem características, podendo durar cerca de dias, meses e até anos, ocorrendo o desenvolvimento de problemas articulares crônicos. A infecção por Zika possui diagnóstico diferencial desafiante, porém o sintoma mais comum são as intensas erupções pruriginosas seguidas do aparecimento de

conjuntivite, sintomas que duram cerca de 3 a 12 dias (BELTRÁN-SILVA et al., 2016) (**Figura 1**).

Figura 1. Diferenças entre Dengue, Chikungunya e Zika (Blasting News Brasil, 2016).



Além de manifestações típicas, essas arboviroses podem se manifestar de modo não comum e pouco conhecido, através de características neurológicas categorizadas como, encefalopatia, encefalite e complicações neuromusculares (DE FIGUEIREDO E FIGUEIREDO, 2018). Diversos dados tem relacionado arboviroses à casos graves de comprometimento do sistema nervoso central, como, por exemplo, casos de síndrome de Guillain-Barré (MANCERA-PÁEZ; ROMÁN; ANAYA, 2018) e microcefalia (VALDESPINO-VÁZQUEZ et al., 2018), doença caracterizada por condição neurológica em que o cérebro das crianças não se desenvolve de maneira adequada, apresentando um perímetro cefálico menor do que o normal em comparação à crianças com a mesma idade e sexo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2016).

O número de casos de manifestações neurológicas possivelmente associadas à arboviroses são cada vez mais frequentes no Brasil e em toda a América Latina. No boletim epidemiológico divulgado pelo Ministério da saúde em maio de 2016, 1.434 casos de bebês com microcefalia e/ou alterações no sistema nervoso central foram confirmados no Brasil. O Nordeste liderou o ranking do número de casos registrados, sendo o estado de Pernambuco a

unidade da federação que apresentou maior número de casos confirmados, com 354 casos. A infecção materna através do Zika vírus foi desde então a principal suspeita do aumento da incidência de neonatos com a microcefalia, devido a confirmação, por meio da análise de amostras de gestantes submetidas ao método reação em cadeia de polimerase (PCR), da presença viral no líquido amniótico, sendo o vírus capaz de atravessar a barreira placentária.

Embora o mecanismo fisiopatológico das infecções por arbovírus e a resposta imunológica materna desenvolvida contra essas doenças durante a gestação, não estejam completamente elucidados (RATHORE et al., 2019), estudos sugerem que durante a gravidez, alterações no sistema imunológico inato de gestantes, ocasionadas por infecções, como, por exemplo, mudanças na concentração de citocinas, podem causar mudanças na arquitetura e função do cérebro em desenvolvimento, aumentando a susceptibilidade dos bebês a distúrbios neurológicos (ESTES; MCALLISTER, 2016).

2.3 VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)

A febre Chikungunya, é uma doença reemergente ocasionada por um *Alphavirus*, vírus Chikungunya (CHIKV), pertencente à família *Togaviridae*, e devido a presença de sintomas altamente debilitantes causou grande impacto a saúde pública, resultando em morbidade e altos custos econômicos para as comunidades afetadas. Chikungunya é um termo derivado da língua Makonde, língua de um grupo étnico do sudeste da Tanzânia e norte de Moçambique, que significa “aqueles que se dobram”, pela aparência curva e fortes artralgias observadas nas pessoas infectadas (DÍAZ et al., 2019). Descrito pela primeira vez por Marion Robinson e RCQ Lumsden (LUMSDEN, 1955) após um surto em 1952 na atual Tanzânia, de acordo com a organização mundial de saúde, desde 2007 esse vírus infectou milhões de habitantes em diversos continentes, como África, Ásia, Europa e, mais recentemente, Américas (TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2016). Até o início do século XXI surtos de Chikungunya não eram frequentes. Em 2004, um surto da infecção teve início em algumas ilhas do Oceano Índico (BURT et al., 2012). Nos anos seguintes, a doença surgiu na Itália, França e Índia (DIAS et al., 2018); (GÉRARDIN et al., 2008), e em 2013 foi introduzida nas Américas atingindo mais de 40 países e causando uma epidemia de quase 2,6 milhões de casos, tornando-se uma ameaça global (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018).

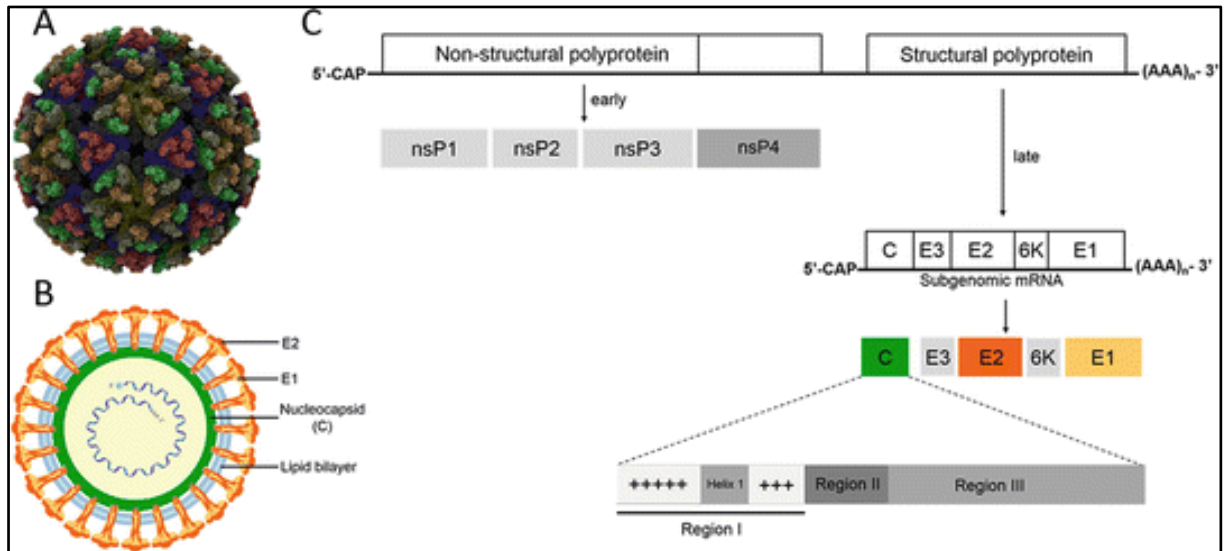
Ao emergir de progenitores enzoóticos, viajantes virêmicos, na África, juntamente com vetores *Aedes aegypti*, o vírus propagou a disseminação, dando início a surtos amplificados pelo homem na Ásia e nas Américas. Tais surtos foram aprimorados por mutações que

adaptaram o CHIKV para uma infecção mais eficiente através de um novo vetor urbano, *Aedes albopictus*. Substituições de glicoproteínas do envelope viral, bem como a capacidade do vírus de voltar a um ciclo enzoótico que envolve espécies de vetores de mosquitos arbóreos e primatas não humanos, facilitaram a disseminação e proporcionaram estabilidade endêmica ao vírus, permitindo expansão geográfica (TSETSARKIN; CHEN; WEAVER, 2016).

2.3.1 Genoma do vírus Chikungunya

O CHIKV compreende um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo, com aproximadamente 12kb de comprimento, sendo um vírus composto por proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), duas glicoproteínas que formam o envelope viral: E1 e E2, e proteínas acessórias (E3, 6K e a proteína transframe TF), e por proteínas não estruturais: nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, responsáveis pelo processo de replicação viral. A proteína C, importante para a construção do nucleocapsídeo, está organizada em três regiões (I, II e III). A região I apresenta resíduos carregados positivamente, como os aminoácidos Arg, Lys e Pro. A região II é responsável pela encapsidação do RNA genômico viral e a região III interage com a glicoproteína E2. O envelope esférico e icosaédrico mede cerca de 60 a 70 nm de diâmetro, e o nucleocapsídeo é envolto por membrana fosfolipídica derivada do hospedeiro. E1 e E2, são importantes para a formação de pontas heterodiméricas na superfície. A glicoproteína E1 contém um peptídeo de fusão e se dissocia de E2 quando expostos à acidez do endossomo presente em células eucarióticas, permitindo a fusão da membrana e a liberação dos núcleocapsídeos ao citoplasma para promover a infecção viral. A glicoproteína E2 é responsável por se ligar aos receptores celulares para entrar na célula hospedeira através de endocitose (METZ; PIJLMAN, 2016; WEASER et al., 2015). A proteína E3 é fundamental para a heterodimerização que ocorre entre E1 e E2 (SINGH et al., 2018), enquanto a proteína 6K não possui sua função bem elucidada (ONG; LUM; NG, 2014) (**Figura 2**).

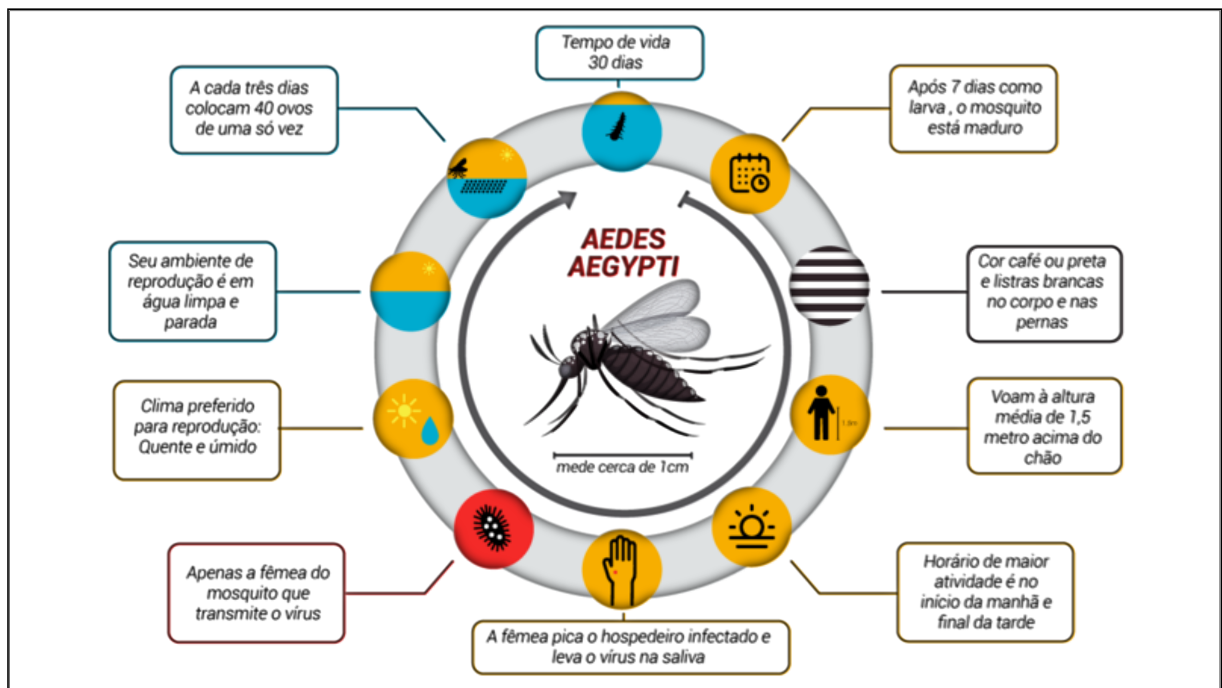
Figura 2. Estrutura e genoma do vírus Chikungunya. (A) vírus CHIKV. (B) Representação esquemática de partículas virais. (C) Representação esquemática do genoma viral (METZ; PIJLMAN, 2016).



2.3.2 Disseminação do vírus Chikungunya

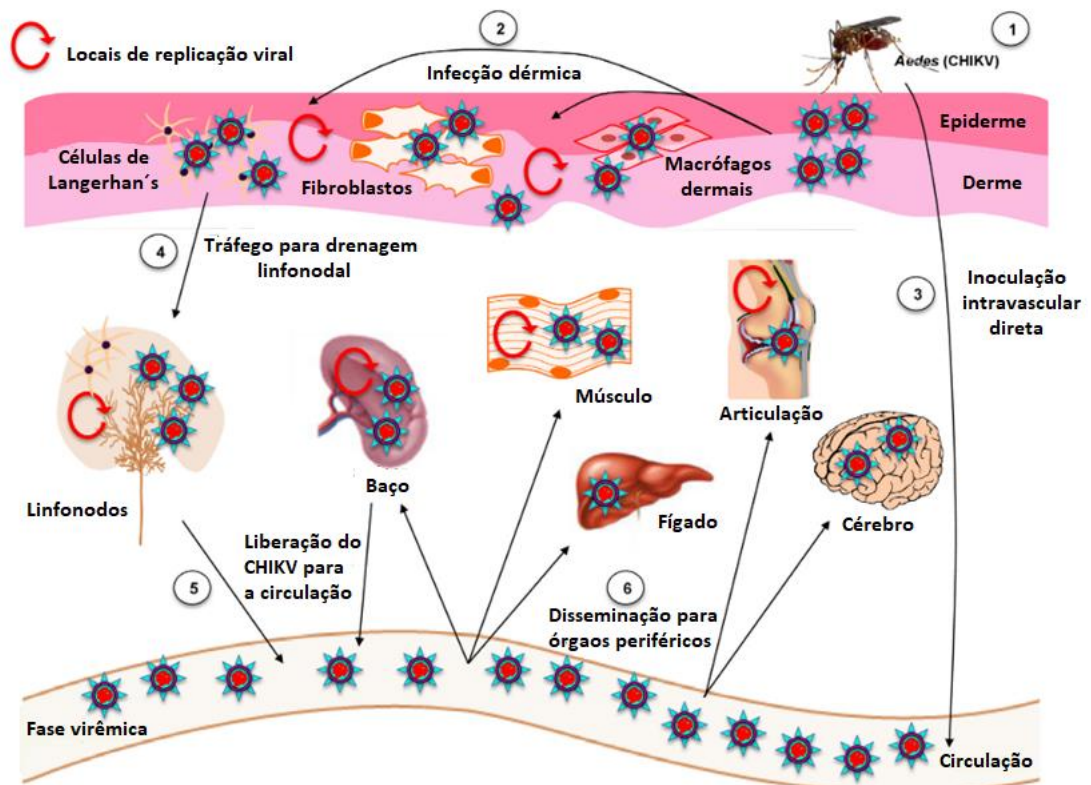
Mosquitos fêmeas que buscam hospedeiros são infectados ao se alimentarem de hospedeiros virêmicos. O CHIKV primeiro se replica no intestino médio das fêmeas e dissemina para glândulas salivares. O período de incubação é geralmente de 2 a 5 dias, e com o vírus disseminado em suas glândulas salivares as fêmeas podem transmitir injetando saliva infectada em hospedeiros durante alimentação sanguínea, causando a transmissão horizontal. O CHIKV é capaz de se espalhar nos ovários dos mosquitos, levando à óvulos infectados e permitindo a manutenção viral durante adversas condições quando o ciclo de desenvolvimento do vetor é interrompido. Após digestão do sangue do hospedeiro e maturação dos ovos, fêmeas grávidas buscam locais para oviposição (Weaver, Chen e Diallo, 2020) (**Figura 3**).

Figura 3. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020)



Durante processo de infecção a picada do mosquito rompe a pele do hospedeiro introduzindo o vírus no corpo, através da ligação do vírus à receptores presentes na superfície celular e junção do envelope viral com vesículas de endocitose da membrana (SAHOO, CHOWDARY, 2019). Após modificação conformacional do envelope viral, o vírus é capaz de se replicar em células epiteliais e endoteliais, fibroblastos e macrófagos derivados de monócitos. O vírus pode se dirigir aos linfonodos ou, através da circulação sanguínea, pode ser disseminado em órgãos e tecidos periféricos, como, baço, fígado, músculos, articulações, tecidos linfoides e cérebro, durando o período de incubação de 3 a 7 dias, onde os indivíduos infectados experimentam a fase aguda da infecção (MARTINEZ; GARZA; CUELLAR-BARBOZA, 2019) (**Figura 4**).

Figura 4. Disseminação do vírus Chikungunya em humanos (LUM; NG, 2015).



A fase aguda é caracterizada pelo aumento de partículas virais no sangue, que desencadeia a ativação da resposta imune inata, representada pelo aumento da concentração plasmática de interferons do tipo I (IFNs), proteínas produzidas por leucócitos e fibroblastos cuja função é interferir na replicação de vírus, estimulando a atividade de defesa de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (SCHWARTZ ; ALBERT, 2010). Em humanos essa fase dura menos que duas semanas (7 a 10 dias) e está presente em áreas onde os sintomas também estão presentes, como músculos esqueléticos e articulações (do tornozelo, pulso, dos pés e mãos) (NETNATURE, 2016), podendo ser detectada uma carga viral superior a 10^9 cópias do genoma viral por mililitros de sangue e a presença da Imunoglobulina M (IgM) para o vírus (WEAVER; LECUIT, 2015). Ainda durante a fase aguda, com base em parâmetros laboratoriais, para o diagnóstico da infecção, podem ser utilizadas técnicas de RT-PCR (Reação de Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia Polimerase) para detecção do RNA viral, testes

sorológicos para detecção do anticorpo IgM de fase aguda no 5º dia após sintomatologia e o IgG após duas semanas da infecção (ZANNOLI et al., 2018).

Durante a fase crônica, a presença de IgM e IgG caracteriza a permanência do vírus em células musculares. Ocorre incapacidade do corpo se libertar totalmente do vírus, contribuindo para dores articulares intensas e de longos períodos, podendo durar meses e anos (NETNATURE, 2016). Nessa fase, quadros de artrite, caracterizados pelo infiltrado de células T, e artralgia são comuns, sendo frequentes os casos de poli ou oligoartralgia em joelhos, tornozelos, mão e punhos (DRAHANSKY et al., 2016). Pacientes com diabetes, hipertensos e com manifestações de dores articulares anteriores, bem como, bebês, crianças e idosos, fazem parte do grupo de risco do desenvolvimento da fase crônica da febre Chikungunya (OKEOMA, 2016).

Embora a maioria das transmissões do vírus Chikungunya ocorra através de mosquitos, um modo de transmissão menos comum que ocorre regularmente, é a transmissão vertical, onde durante a gravidez ou no momento do nascimento a mãe transmite o vírus para o seu filho. Tal modo de transmissão pode ocasionar doenças graves no sistema nervoso central do bebê que podem ser fatais (WEAVER; CHEN; DIALLO, 2020);(BURT et al., 2012).

Atualmente ainda não existem terapias específicas e eficazes contra o CHIKV, bem como medicamentos ou vacinas aprovadas para sua prevenção. Seu tratamento é bastante limitado, incluindo drogas anti-inflamatórias direcionadas ao combate de sintomas ocasionados pela febre Chikungunya, sendo a fisiopatologia da doença e os mecanismos da resposta imune inata frente à infecção, analisados de modo incompleto (FATMA et al., 2020); (TOMAR et al., 2019).

2.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA

A imunidade inata funciona como primeiro mecanismo de defesa do organismo na atuação contra agentes infecciosos, tais como bactérias, fungos e vírus, sendo este mecanismo primordial para a consequente ativação da imunidade adaptativa (SORDI et al., 2020);(MCDONALD; LEVY, 2018). O sistema imune inato caracteriza-se pela rápida detecção destes patógenos através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e presentes em células fagocitárias, células dendríticas e células NK (Natural Killer) (TAGUCHI; MUKAI, 2019).

2.5 RECEPTORES TOLL-LIKE

Dentre os principais tipos de PRRs atuantes na imunidade inata estão os receptores Toll-like (TLRs), proteínas transmembranares responsáveis pelo reconhecimento de antígenos e pela ativação da resposta imune realizando o recrutamento de células imunitárias através da geração de sinais que produzem citocinas pró-inflamatórias (PORTOU et al., 2015).

Em humanos, foram reportados dez TLRs (TÖRMÄNEN et al., 2017), expressos em diversas células imunes, como, macrófagos, células dendríticas (GONG et al., 2018) e neutrófilos (TESELKIN et al., 2018), todos eles são sintetizados no retículo endoplasmático (MUTOH et al., 2018). De acordo com o local onde estão presentes os receptores Toll-Like classificam-se em duas subfamílias, os TLRs de superfície celular, incluindo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, e TLR10, e os TLRs intracelulares, localizados no endossomo como, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. Os TLRs expressos na superfície celular são responsáveis pelo reconhecimento de componentes da membrana microbiana como, lipídios, lipoproteínas e proteínas (TLR1, TLR2, TLR5 e TLR6) enquanto os TLRs intracelulares atuam no reconhecimento de ácidos nucleicos provenientes de bactérias e vírus (TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9) (MEKHEMAR et al., 2017).

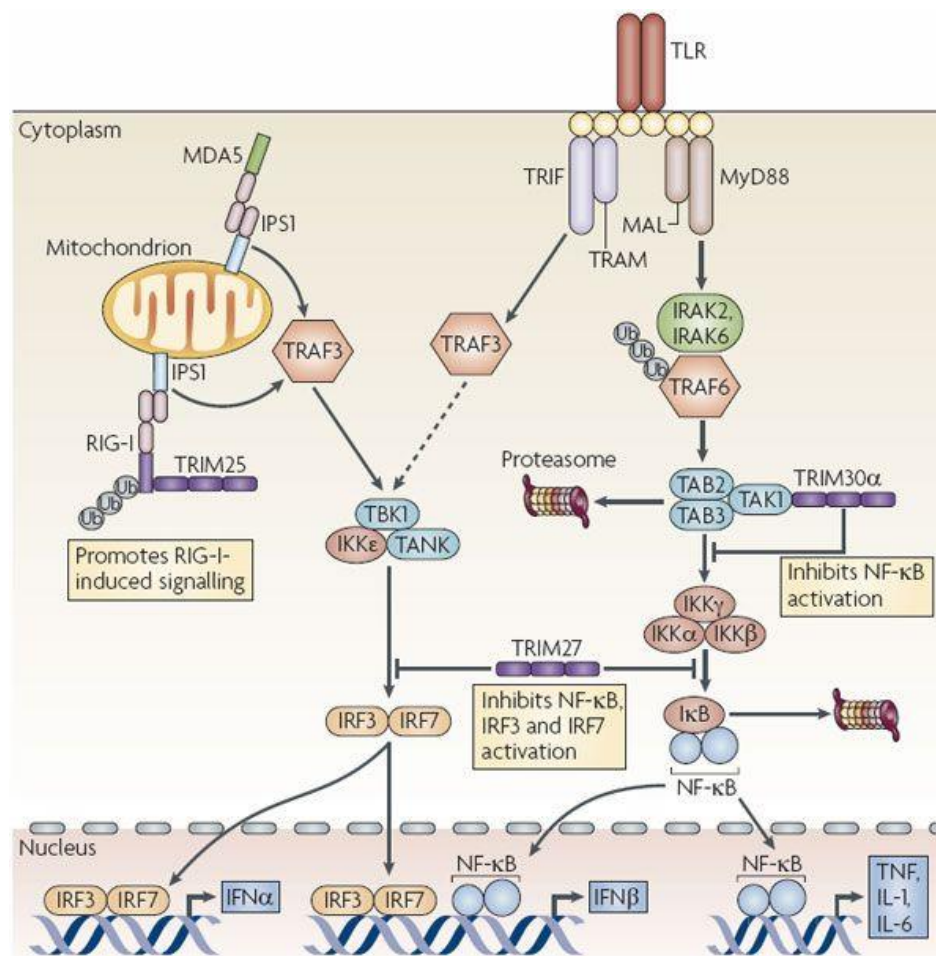
2.6 TLRs E VIA DE SINALIZAÇÃO

O reconhecimento de PAMPs promove a dimerização de TLRs intracelulares, esse processo resulta no recrutamento das principais proteínas adaptadoras, MyD88 (*fator de diferenciação mieloide 88*) e TRIF (proteína adaptadora contendo o domínio TIR induzindo interferon β). A via de sinalização que faz o recrutamento do adaptador MyD88 é conhecida como via de MyD88, enquanto a via que realiza o recrutamento de TRIF é descrita como via independente de MyD88 (JIMÉNEZ-DALMARONI, GERSWHIN E ADAMOPOULOS, 2016). TLRs 4, 7, 8 e 9 iniciam uma cascata de sinalização a partir do recrutamento do adaptador MyD88, enquanto TLR3 possui como via de sinalização a via independente de MyD88 ou via TRIF. Tal cascata de sinalização desencadeia na translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B e este consequentemente induz a transcrição de citocinas inflamatórias (VIDYA et al., 2018) (**Figura 5**).

O reconhecimento de componentes microbianos por meio de TLRs contribui para a produção de citocinas inflamatórias, como TNF α , IL-1, IL-12 (MEKHEMAR et al., 2017), IL-

6 (BHARGAVAN; KANMOGNE, 2018) e IL-8 (zhu et al., 2018). A liberação de citocinas como, interleucinas (IL-12 e IL-18), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas e interferons (IFN), levam ao processo inflamatório através do recrutamento de agentes atuantes da imunidade adquirida como, os linfócitos T CD4, T CD8, macrófagos e células dendríticas (JAIN et al., 2018).

Figura 5. Via de sinalização dos Receptores Toll-Like. TLRs expressos ativando vias de sinalizações que desencadeiam a translocação de fator nuclear κ B (NF- κ B) ao núcleo celular induzindo a expressão de de IFNs do tipo I e citocinas pró-inflamatórias (OZATO et al., 2008).



2.6.1 Citocinas

As citocinas são polipeptídeos considerados mediadores importantes do sistema imunológico, sendo essenciais na defesa do hospedeiro contra microorganismos. Secretadas por células imunes, como leucócitos, as citocinas também podem ser produzidas por uma ampla gama de células em resposta a diferentes tipos de infecções. Além de influenciarem a atividade, a diferenciação e o desenvolvimento de uma variedade de células imunológicas, as citocinas também são consideradas mediadores de doenças autoimunes e inflamatórias (SHEA; GADINA; SIEGEL, 2019).

Durante investigação de desempenho de citocinas em arboviroses foi possível verificar fases agudas da infecção caracterizadas por aumentos significativos nos níveis de expressão de IL-1 e IL-10 em pacientes infectados pelo vírus Zika (HALFMANN; HILL-BATORSKI; KAWAOKA, 2018), bem como o aumento da expressão de $TNF\alpha$, IL-6 e IL-10 em pacientes infectados pelo DENV (SEHRAWAT et al., 2018); PERDOMO-CELIS et al., 2018).

A interleucina IL-6, pode ser produzida por diversos tipos células durante processos infecciosos, inflamatórios e câncer. Após estimulação de TLRs através do reconhecimento de PAMPs, a IL-6 pode ser secretada por monócitos e macrófagos, bem como pode ser produzida por fibroblastos, queratinócitos, astrócitos e células endoteliais após estimulação de IL-1. Por apresentar função imunoreguladora esta citocina é capaz de regular a proliferação e diferenciação das células B e T, sendo importante por coordenar a atividade dos sistemas imunes inato e adaptativo (GARBERS et al., 2018). Quando produzida por macrófagos e linfócitos, a IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória e sua alta produção está associada ao enfrentamento de infecções bacterianas e virais (BRADLEY et al., 2018).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que exerce uma infinidade de funções imunomoduladoras durante processo inflamatório, sendo altamente expressa por células T CD4 durante infecções virais agudas (KIMBALL et al., 2019). Conhecida por ser fator inibitório da síntese de citocinas pró-inflamatórias e por reduzir a ativação e as funções estimuladoras de células T, como macrófagos e células dendríticas, a IL-10 é considerada um fator de crescimento e diferenciação para células B podendo promover também respostas de células T citotóxicas, sendo esta atividade imunogênica relevante nas respostas imunes antitumorais (GEGINAT et al., 2016).

Interferons do tipo I ($IFN-\alpha$ e $IFN-\beta$) são proteínas, produzidas por leucócitos e fibroblastos, cuja ativação é induzida por PRRs. Tais moléculas desempenham papéis importantes no sistema imune inato, desencadeando respostas antivirais após reconhecimento

dos padrões moleculares associados à patógenos por meio dos PRRs, incluindo os TLRs (ZHU et al., 2019). IFNs tipo são capazes de induzir estados antimicrobianos em células infectadas e células vizinhas limitando a disseminação dos agentes infecciosos, e promovem aumento da atividade das células NK ao apresentar os antígenos, ativando assim o sistema imune adaptativo (GARCÍA-VALERO et al., 2019).

IL-1 β e IL-18, são citocinas que apresentam papel crucial na defesa do hospedeiro contra infecções virais, através do aumento de propriedades antimicrobianas e início de respostas imunes adaptativas (KUMAR; RAMACHANDRAN; WARIS, 2018). A citocina IL-1 β apresenta efeito pró-inflamatório em diversos tipos de células, atuando em vários tipos de doenças inflamatórias, como acidente vascular cerebral, diabetes e distúrbio auto-inflamatório genético (HONG et al., 2019); DINARELLO, 2009). Após ativação dos TLRs a IL-1 β pode ser transcrita por monócitos, macrófagos e células dendríticas (DINARELLO et al., 2013).

Expressa por macrófagos, células epiteliais, como queratinócitos, e células dendríticas, a citocina pró-inflamatória IL-18 é conhecida como fator indutor de interferon-gama (IFN- γ). A IL-18 atua como um importante regulador das respostas imunes inatas e adaptativas, sendo secretada mediante inflamação crônica, doenças autoimunes, variedade de cânceres e doenças infecciosas. Por ser um membro da família das citocinas IL-1, sua arquitetura lembra a IL-1 β (DINARELLO et al., 2013).

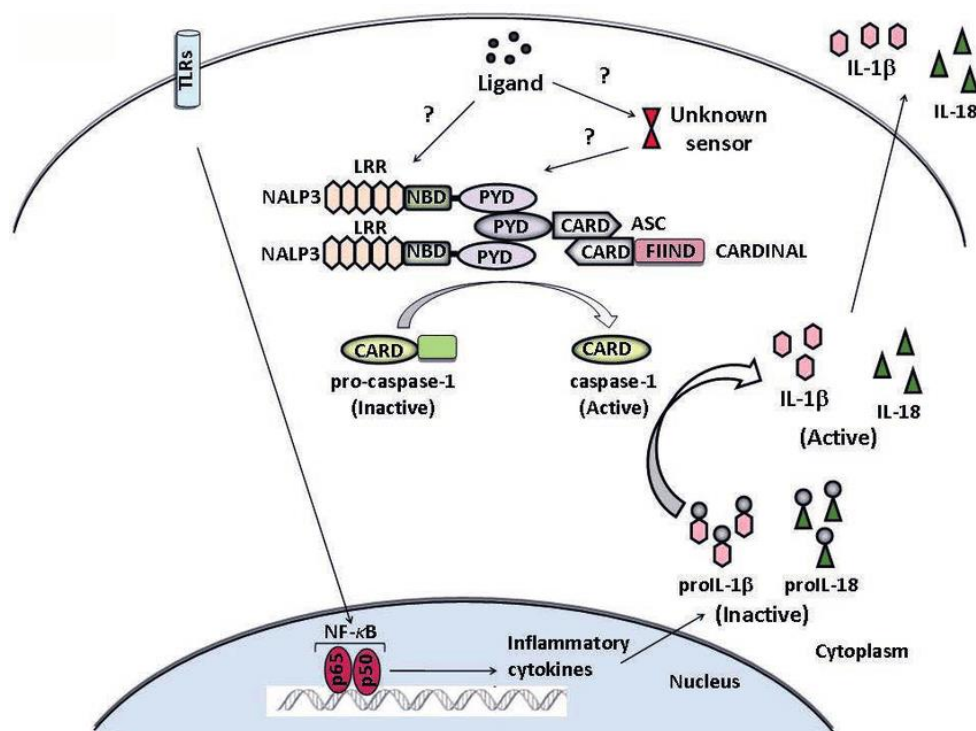
Dentre as principais citocinas transcritas durante a via de sinalização dos TLRs, podemos destacar as interleucinas IL-1 β e IL-18, por serem de fundamental importância para o funcionamento de inflamassomas, conjunto de multiproteínas que desempenham papel crítico durante progressões de infecções virais, como, por exemplo, a infecção pelo coronavírus (VORA; LIEBERMAN; WU, 2021).

2.6.2 Inflamassoma

Inflamassomas são complexos proteicos de alto peso molecular que atuam como mediadores da resposta imune inata e são formados estruturalmente por receptores do tipo Nod-Like (NLR), compostos pelos domínios LRR, NACHT e domínio efetor (CARD, PYD ou BIR), uma proteína adaptadora ASC e uma prócaspase-1 clivada em caspase-1 após junção de NLR e ASC. Para que o funcionamento da estrutura do inflamassoma ocorra é necessário que haja a expressão de todos os seus componentes, inclusive de pró-formas de IL-1 β e IL-18 transcritas através da via de sinalização de TLRs após o reconhecimento de PAMPs. Após reconhecimento

de PAMPs, ocorre a ativação de NLR, acoplamento da molécula adaptadora (ASC) por seu domínio efetor PYD, por exemplo, no domínio PYD existente também no NLR, e ligação do domínio CARD da ASC no mesmo domínio CARD pertencente a procaspase 1. Após ativação da procaspase 1 ela realiza a transformação dos precursores de IL-1 β e IL-18 em moléculas biodisponíveis através de clivagem (FENINI; CONTASSOT; FRENCH, 2017). De acordo com o tipo de composição do ácido nucléico presente no patógeno invasor, a infecção viral pode ocasionar a ativação de diferentes tipos de inflamassomas (KUMAR; RAMACHANDRAN; WARIS, 2018). Sendo a proteína NLRP3 considerada o inflamassoma mais estudado (HONG et al., 2019) (**Figura 6**).

Figura 6. Via de sinalização do inflamassoma. Esquema da NALP3, proteína codificada pelo gene NLRP3. A figura mostra a transcrição das proformas das citocinas IL-1 β e IL-18 através de TLRs e conversão destes em formas ativas através do inflamassoma NALP3 (PIETROCOLA et al., 2011).



De acordo com estudos, o processamento e a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18, através da ativação do inflamassoma, faz parte de uma das respostas imunes inatas fundamentais frente às infecções virais, bem como a infecção pelo vírus da Dengue, responsável

pelo aumento da ativação do inflamassoma NLRP3 em células endoteliais (SHRIVASTAVA et al., 2020).

2.7 TLRs E INFECÇÕES VIRAIS

Dentre os TLRs reportados na literatura em associação a vírus estão: TLR3, ativado após o reconhecimento de RNA de fita dupla (dsRNA), TLR4 atuando no reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS), TLR7 e TLR8, responsáveis pelo reconhecimento de RNA de fita simples (ssRNA), TLR9, ativado após reconhecer ilhas CpG-DNA não metiladas e TLR10, único que possui reconhecimento desconhecido (**Tabela 1**).

Tabela 1: Localização dos TLRs e padrões moleculares associados à patógenos reconhecidos por TLRs relatados na literatura em associação à infecções virais.

Receptor	PAMPs	Localização do receptor	Exemplos de associação viral
TLR3	RNA de fita dupla	Endossomo	Zika Virus (DANG et al., 2016)
TLR4	Lipopolissacarídeo	Superfície celular	Virus influenza (PERRIN-COCON et al., 2017)
TLR7	RNA de fita simples	Endossomo	Chikungunya vírus (DUTTA E TRIPATHI, 2017)
TLR8	RNA de fita simples	Endossomo	Chikungunya vírus (DUTTA E TRIPATHI, 2017)
TLR9	CpG-DNA não metiladas	Endossomo	HIV (VALVERDE-VILLEGAS et al., 2017)
TLR10	Desconhecido	Superfície celular	Vírus influenza (LEE et al., 2014)

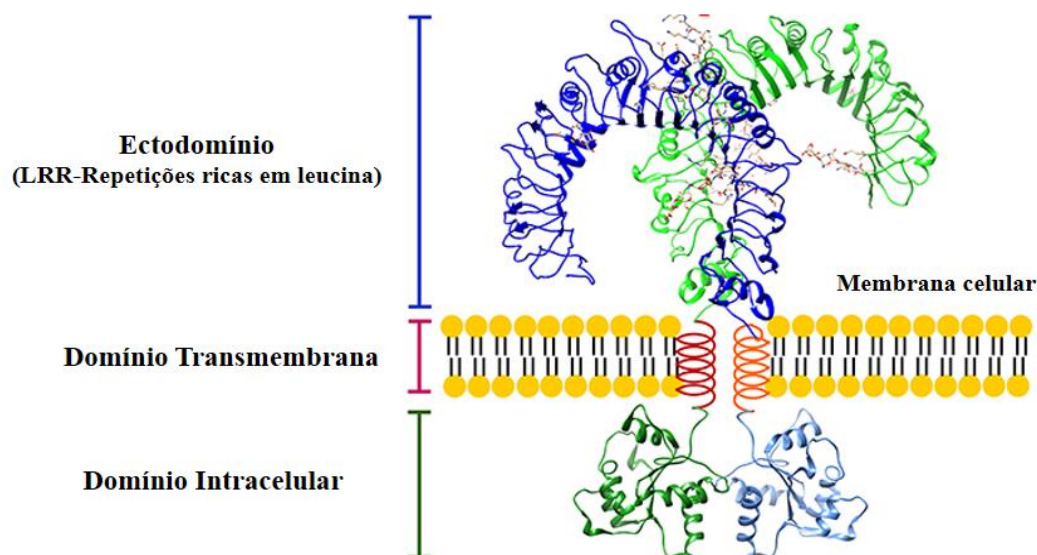
Mediante alterações estruturais, ocasionadas por variações genéticas em sequências de aminoácidos que codificam domínios de TLRs, respostas estabelecidas por TLRs

frente à doenças infecciosas podem ser alteradas, ocasionando aumento na susceptibilidade do hospedeiro à infecções virais (MUKHERJEE; HUDA; SINHA BABU, 2019); (DUTTA; TRIPATHI, 2017).

2.8 ESTRUTURA DOS TLRs

TLRs são evolutivamente conservados e caracterizados por possuírem domínios estruturais comuns, como, um ectodomínio composto por repetições ricas em leucina (Lrrs), um domínio transmembrana (TM) e um domínio intracelular, também conhecido como cauda citoplasmática composta por uma região conservada conhecida como, receptor IL-1 de domínio Toll (TIR) (MAEDA; AKIRA, 2016). O ectodomínio da proteína TLR se assemelha a uma estrutura solenóide curvada em forma de ferradura e contém um número variável de LRRs, desempenhando um papel crítico no reconhecimento de PAMPs através da interação entre LRRs e componentes da membrana microbiana e ácidos nucleotídicos de bactérias e vírus (XU et al., 2019)(**Figura 7**).

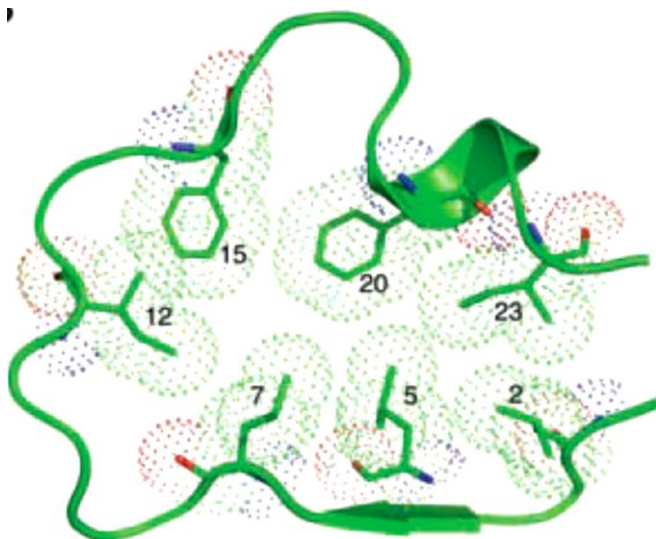
Figura 7. Estrutura do Receptor Toll-Like. A figura apresenta os domínios presentes nos TLRs. Adaptado de (GAO et al., 2017).



Repetições ricas em leucina (LRRs) são segmentos de 20 a 30 aminoácidos, com predominância do aminoácido hidrofóbico Leucina. Cada LRR possui um segmento variado e um segmento altamente conservado, este último é caracterizado pela

padronização de uma repetição de pelo menos 11-12 resíduos formando a sequência consenso $LxxLxLxxN(Cx)xL$, onde N representa uma asparagina conservada, podendo ser também treonina, Serina ou Cisteína, X simboliza qualquer aminoácido e L representa resíduos hidrofóbicos conservados incluindo não apenas Leucina como também Isoleucina, valina, metionina e fenilalanina, sendo a leucina o resíduo mais prevalente. Resíduos hidrofóbicos compõem um núcleo hidrofóbico e são de fundamental importância por fornecer estabilidade lateral aos LRRs presentes na estrutura (GONG et al., 2010); (WEI et al., 2008) (**Figura 8**).

Figura 8. Motivo LRR-TLR3. Núcleo hidrofóbico composto por resíduos que formam a sequência consenso $xL^2xxL^5xL^7xxN^{10}xL^{12}xxL^{15}xxxxF^{20}xxL^{23}x$ (CHOE; KELKER; WILSON, 2005).



Todos os domínios de LRRs encontrados em proteínas tendem a formar estrutura solenoide composta por face convexa e côncava. Cadeias beta compõem, em grande parte, a face côncava, formando o local onde ocorrerá a ligação entre ligantes patogênicos e a proteína. Resíduos variáveis (x), presentes na sequência consenso, são comumente expostos ao solvente, enquanto quando que os resíduos conservados, como a leucina e outros aminoácidos hidrofóbicos, são voltados para o interior, no núcleo da estrutura solenoide. A ocorrência de desvios em sequências consenso poderão gerar segmentos mediadores capazes de interromper tais regiões solenoides, a ponto de proporcionar flexibilidade estrutural a LRR (HELFT et al., 2011).

O domínio TIR é responsável pela propagação de sinais que iniciam a via de sinalização dos TLRs, recrutando proteínas adaptadoras presentes no citoplasma. Tal

domínio representa uma região citoplasmática conservada da proteína, composta de 135 a 160 aminoácidos, e facilita as interações que ocorrem entre proteínas-proteínas e proteínas-moléculas sinalizadoras, durante transdução de sinais. Bem como ocorre no ectodomínio, no domínio TIR a maioria dos resíduos conservados se encontram no núcleo hidrofóbico da estrutura, enquanto que resíduos variáveis, hidrofílicos, são expostos na superfície (BADRI; HYUN; PARK, 2015).

Atualmente diversos estudos tem associado polimorfismos em importantes domínios dos TLRs ao aumento na susceptibilidade à infecções virais, como por exemplo, a contribuição de polimorfismos não sinônimos (rs179008, rs3764880), respectivamente presentes em TLR7 e TLR8, para a susceptibilidade e gravidade da dengue em pacientes da Índia Oriental, onde os polimorfismos apresentaram associação significativamente positiva com a doença, podendo atuar como potenciais biomarcadores prognósticos (MUKHERJEE; TRIPATHI, 2019); bem como a associação significativa entre os polimorfismos rs3853839 (3'UTR) (RAUSEO; FERNÁNDEZ-MESTRE, 2019) e rs179010 (Intrônico) em TLR7 e rs764879 (Intrônico) em TLR8 e o aumento na susceptibilidade à infecção pelo vírus Chikungunya (DUTTA; TRIPATHI, 2017).

2.9 BIOINFORMÁTICA

Embora seja considerada frequentemente um subcampo independente da biologia, a bioinformática é uma ciência interdisciplinar entre biologia e informática, que consiste na aplicação de conhecimentos bioquímicos, biofísicos, matemáticos e estatísticos, desempenhando um papel indispensável e de várias aplicações na ciência (CHEN; KURGAN, 2012). Definida como desenvolvimento ou aplicação de ferramentas computacionais, a bioinformática é vista como um avanço tecnológico de alto rendimento que permite a geração, o acesso e a interpretação de grandes quantidades de dados biológicos através da comunidade científica (GREENE et al., 2014)(KORCSMAROS; SCHNEIDER; SUPERTI-FURGA, 2017).

A aplicação de métodos computacionais à ciência com o intuito de analisar, através da visualização da influência genotípica sobre o fenótipo, impactos estruturais e funcionais ocasionados por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em proteínas, prevendo efeitos moleculares em regiões codificadoras e não codificadoras, tem contribuído para o desenvolvimento de diversas ferramentas de bioinformática. Tais ferramentas estão sendo utilizadas como métodos desenvolvidos para contornar limitações apresentadas por métodos de

análises *in vitro* através da identificação de possíveis potenciais novos biomarcadores (Wagih *et al.*, 2018).

Em constante evolução, a bioinformática se refere a imenso campo de pesquisa que se baseia em milhões de algoritmos, caracterizados para vários bancos de dados (SOHAIL; ARIF, 2020). Algoritmos são designados como programas que permitem análises de grandes quantidades de dados de sequenciamento, oferecendo suporte para caracterização experimental de alelos associados a doenças em um curto espaço de tempo, a fim de economizar recursos humanos. Estes programas realizam suas análises através da utilização de diferentes parâmetros, como, por exemplo, a conservação da sequência única dos aminoácidos presentes no gene, através de alinhamentos de múltiplas sequências de genes homólogos em espécies diferentes, e características estruturais, que analisam alterações em propriedades físico-químicas (NG *et al.*, 2018).

2.9.1 Algoritmos de predição funcional

Algoritmos de predição funcionam como recursos on-line utilizados para previsão automatizada de estimar efeitos da substituição de aminoácidos, através de SNPs não sinônimos, na estrutura e funcionamento de proteínas. Tais variações podem ser classificadas como deletérias ou benignas de acordo com critérios e pontuações estabelecidas por cada algoritmo (DEHGHANPOOR *et al.*, 2018).

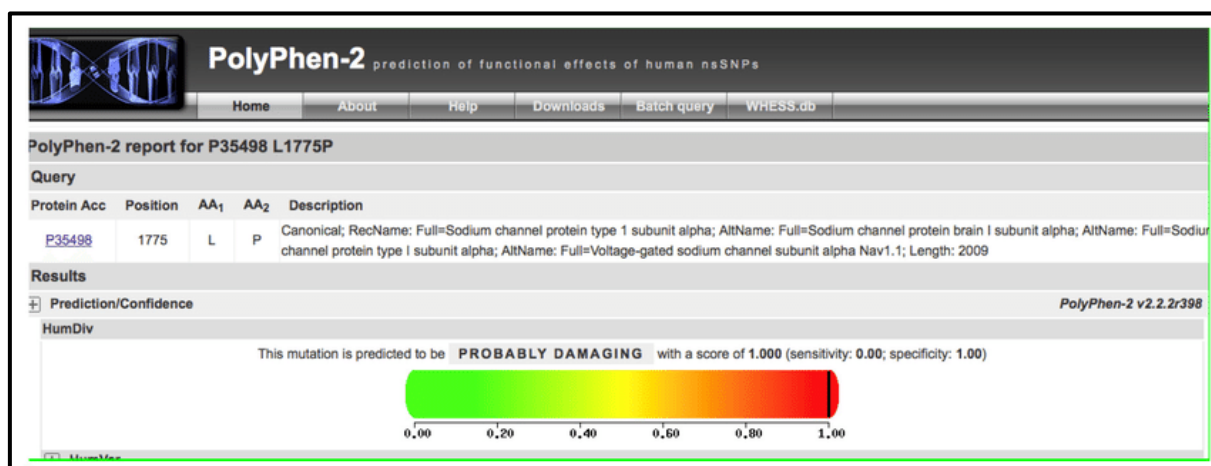
Algoritmos de predição funcional auxiliam no preenchimento de lacunas existentes entre mutações e variações fenotípicas, contribuindo para o estudo aprimorado de diversas doenças. Usuários de tais ferramentas podem obter informações sobre variantes de nucleotídeo único, prevendo se a substituição de aminoácidos pode ser prejudicial à função de proteínas presentes em organismos de interesse através da comparação em bancos de dados pré-computados com previsões genômicas disponíveis para diversos organismos (VASER *et al.*, 2016).

Para processamento dos resultados a maioria dessas ferramentas necessita de informações prévias, arquivos de entrada complementares, como, por exemplo, substituições de aminoácidos e sequência das proteínas no formato FASTA. Além disso, alguns algoritmos baseiam-se em cálculos matemáticos que comparam nsSNPs com bancos de dados que contêm polimorfismos com efeitos deletérios descritos. Tal mecanismo é conhecido como método de aprendizado supervisionado que analisa dados reconhecendo padrões através de treinamento. Dentre as principais metodologias estatísticas utilizadas através dos algoritmos de predição, capazes de realizar a técnica de aprendizado de máquina estão, *support vector machine* (SVM),

Random Forest (RF) e *Artificial Neural Network* (ANN) (DEHGHANPOOR et al., 2018). SVM funciona como uma técnica estatística de métodos de aprendizado supervisionado, necessitando de um conjunto de dados de treinamento como entrada para, após o reconhecimento de padrões, ser capaz de classificar cada entrada em duas possíveis categorias, sendo o SVM um classificador linear binário não probabilístico usado para classificação e regressão (GUENTHER; SCHONLAU, 2016). Assim como o SVM, o RF é um método de classificação e regressão linear que utiliza um conjunto de amostras e variáveis de treinamento selecionadas aleatoriamente. RF torna-se um método diferente por construir diversas árvores de decisão randomizadas e por ter seu resultado baseado em uma média dos resultados independentes de cada árvore (BELGIU; DRĂGU, 2016). O método *Artificial Neural Network*, ou redes neurais é um sistema inspirado na estrutura e funcionamento das redes neurais biológicas. As redes neurais aprendem a executar tarefas com base em dados observacionais fornecidos para treinamento, processando informações de modo análogo ao cérebro humano (GERVEN; BOHTE, 2017).

Dentre os principais algoritmos funcionais descritos na literatura estão, SIFT, algoritmo frequentemente utilizado para priorizar a predição de variantes não sinônimas ou sem sentido, classificando a alteração de aminoácido como tolerante ou prejudicial, levando em consideração a conservação de sequências homólogas de proteínas (VASER et al., 2016); PolyPhen-2, algoritmo que realiza anotações funcionais de polimorfismos de nucleotídeo único se baseando em considerações evolutivas estruturais e alinhamento de sequência múltiplas de proteínas, estimando a probabilidade da mutações não sinônimas serem benignas ou prejudiciais (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013) (**Figura 9**); e Mutation Assessor, algoritmo que baseia sua previsão apenas na conservação de sequências, utilizando alinhamento de sequências e empregando modelos matemáticos para alcançar seus resultados, não sendo influenciado pela seleção de um conjunto de dados em treinamento (FROUSIOS et al., 2013).

Figura 9. Resultado detalhado da análise do algoritmo PolyPhen-2 para consulta de variante única (ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013).



2.9.2 Algoritmos de predição estrutural

O funcionamento e a regulação proteica são fatores importantes que podem ser afetados por alterações na estabilidade e estrutura da proteína. Efeitos de variantes não sinônimas podem prejudicar alterações conformacionais necessárias para o bom funcionamento de muitas proteínas, como, por exemplo, o dobramento de proteínas, bem como podem prejudicar a interação que ocorre entre as moléculas da proteína, as interfaces de interação de proteínas, a solubilidade e a estabilidade das moléculas. Com base na visualização de estrutura tridimensional, nos múltiplos alinhamentos de sequências homólogas e em análises através de simulações de dinâmica molecular (SDM), tais efeitos estruturais provocados por alterações mutacionais podem ser examinados *in silico* (SEIFI; WALTER, 2018).

Através da bioinformática, ferramentas podem ser desenvolvidas e utilizadas para modelar uma estrutura estatisticamente válida para diversas macromoléculas. A identificação e a construção hipotética de um modelo estrutural podem contribuir para a compreensão de aspectos da função bioquímica molecular, apoiando-a experimentalmente, reduzindo o tempo de pesquisa e o uso de recursos de modo econômico (PATEL; SINGH; PATEL, 2019).

A partir da modelagem computacional de estruturas moleculares, algumas ferramentas foram propostas para análise de impactos que variações podem ocasionar a estrutura e por consequência, ao funcionamento de proteínas. Algoritmos de predição estrutural são ferramentas utilizadas para previsões automatizadas de efeitos de mutações em estruturas proteicas (YANG; ZHANG, 2015), relatando a correlação entre mutações de base única e

diversas doenças, e classificando tais variantes como deletérias ou neutras (ALNUMAIR; MARTIN, 2013). Além disso, algumas dessas ferramentas são capazes de prever mudanças sobre a estabilidade das proteínas, ocasionadas por variantes, com base na interação entre os aminoácidos e na variação da energia livre de Gibbs, designando as mutações como estabilizantes ou desestabilizantes. Tais métodos necessitam da estrutura 3D da proteína e/ou abordagens baseadas em sequências, e alguns destes atribuem aos seus resultados benefícios que possam contribuir para uma melhor precisão. Entre os algoritmos estruturais descritos na literatura (I-Mutant 2.0 (CAPRIOTTI et al., 2013); PoPMuSiC (DEHOUCK et al., 2009)), o MAESTRO tem se destacado por apresentar precisão melhor que os métodos concorrentes, oferecendo valores de confiança de predição aos seus resultados, bem como, atuação em proteínas multiméricas e avaliação de possíveis pontes dissulfeto (LAIMER et al., 2016).

2.9.3 Modelagem por homologia

Modelagem por homologia é um método computacional amplamente utilizado para identificar características estruturais da proteína através de sua sequência de aminoácidos. Através da estrutura gerada muitas ferramentas são capazes de definir as interações moleculares por meio de programas de visualização de estruturas tridimensionais (MUHAMMED, 2019).

Há mais de 25 anos o servidor SWISS-MODEL foi o pioneiro no campo da modelagem de proteínas totalmente automatizado, sendo um dos servidores mais utilizados no mundo. Neste servidor o fluxo de modelagem por homologia consiste em várias etapas fáceis de aplicar, mas o primeiro passo da modelagem é a seleção de uma proteína 3D estruturalmente conhecida, determinada pela sua sequência de aminoácidos, que servirá como modelo para a estrutura alvo. Os dados de entrada fornecidos na primeira etapa servem para a busca de estruturas que estão relacionadas a evolução (WATERHOUSE et al., 2018).

Apesar da estrutura da proteína ser mais conservada, de modo que a mudança na sequência ocorra de forma mais lenta durante a evolução, na prática é difícil encontrar modelos completos que apresentem 100% de identidade de sequência para a proteína alvo repetitiva, devido a diferentes números repetidos e arranjos variados (SIKOSEK, 2019).

Embora seja considerado o método mais preciso de predição computacional da estrutura proteica, com menor tempo e maior custo-benefício, esta técnica apresenta ressalvas fundamentais atreladas a funcionalidade do modelo. Tal funcionalidade

depende totalmente da qualidade da estrutura 3D gerada, sendo de fundamental importância maximizar a qualidade da modelagem. A importância biológica que os resultados da modelagem possibilitam, através da visualização do funcionamento proteico a nível molecular, está diretamente relacionada ao aumento no número de complexos depositados por ano no Banco de dados de Proteína (PDB) (WATERHOUSE et al., 2018).

Alguns estudos descrevem a importância da modelagem por homologia no direcionamento de terapias para o tratamento de infecções virais, contribuindo na busca por medicamentos ainda inexistentes. Assim como o desenvolvimento de uma representação tridimensional da estrutura da proteína do envelope do vírus zika (ZVEP) (FERNANDO et al., 2016), para analisar os locais nos quais os ligantes e as moléculas semelhantes a drogas interagem, afim de avaliar se a proteína alvo é susceptível à inibição por meio de drogas e assim encontrar um ponto de partida para a descoberta de medicamentos direcionados ao vírus Zika e outros patógenos emergentes (EKINS et al., 2016).

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país tropical que favorece a propagação do mosquito *Aedes aegypti*, e consequentemente de arboviroses que utilizam este mosquito como vetor. Desde de 2015, o número de casos de síndromes neurológicas, possivelmente relacionadas à arboviroses, cresceu significativamente no Brasil, como, por exemplo, a correlação entre a infecção por ZIKV em grávidas e casos de bebês com microcefalia, dentre outras sequelas, e a correlação entre a infecção por CHIKV e o nascimento de bebês com graves doenças no sistema nervoso central. A imunidade inata materna exerce um papel relevante no desenvolvimento da imunidade inata do feto. Além deste fato, a recidiva de infecções por Arboviroses podem levar ao comprometimento do sistema imunológico dos pacientes. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar potenciais variantes genéticas em receptores Toll-Like e alterações no perfil de expressão de moléculas em amostras de pacientes infectados por Chikungunya, de modo a esclarecer os mecanismos utilizados pelo sistema imune inato em resposta a infecção.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar polimorfismos em TLRs associados às infecções virais e o perfil de expressão gênica de citocinas em amostras de pacientes portadores da febre Chikungunya.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar através de ferramentas de bioinformática, o impacto de variantes genéticas na estrutura e função dos genes TLR3, 4, 7, 8, 9, 10, reportados na literatura em associação às infecções virais
- Determinar o perfil de expressão das citocinas IL-1 β , IL-10, IL-18 e IFN- β em pacientes portadores de febre Chikungunya

5 MANUSCRIPT 1**COMPUTATIONAL ANALYSIS OF DELETERIOUS IMPACT OF NON-SYNONYMOUS SNVs IN TOLL-LIKE RECEPTORS GENES ASSOCIATED WITH VIRAL INFECTIONS**

Manuscript to be submitted for publication in the BBA General Subject (IF: 3.681)

Gisnayle Ana da Silva Pereira¹, Ananda Cristina Fernandes de Aguiar¹, Isabella Luiza Ralph de Oliveira¹, Antônio Marinho da Silva Neto¹, Carlos Henrique de Madeiros Castelletti^{1,2}, Andrew Martin⁴, José Luiz de Lima Filho^{1,3}, Danyelly Bruneska Gondim Martins^{1,3}

¹Molecular Prospecting and Bioinformatics Group (ProspecMol), Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE)

²Agronomic Institute of Pernambuco (IPA)

³Biochemistry Department, Biosciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE)

⁴Structural & Molecular Biology, Darwin Building, UCL

Correspondence: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Recife, Brasil.
Phone: + 55 81 2126 8484.

E-mail: bruneska@prospecmol.org

Abstract

The Toll Like Receptors (TLRs) are the principal modulators of innate immune system performing a central role in identification of foreign infection in mammals. Many viruses are reported to activate the immune response through TLRs, and subsequently mutations in this receptor can interfere with individual susceptibility. Therefore, the detection of TLR variants that functionally and structurally affect the protein, and all the downstream pathways, may indicate a predisposition of a population for a given viral infection. Materials and methods: A total of 16 prediction algorithms were used for functional evaluation of non-synonymous variants (nsSNV) in TLR3, TLR4, TLR5, TLR8, TLR9 and TLR10. Through a binary system (BScore), the outputs were converted into a rank of absolute numbers according to the concordance of deleterious effects of each variant. Template-based modeling was performed to evaluate the changes in the protein structure and to predict the Gibbs free energy, which can disturb the receptor-ligand interaction, as well as different characteristics of the mutant protein. Results: A total of 2,337 nsSNVs were identified in the seven TLRs evaluated, more than 70% located at the ectodomains. After the evaluation by the algorithms, we selected 13 nsSNVs that may impair the function of six TLRs involved in virus recognition. The most consistent results were observed for TLR3 p.Leu532Pro, identified as deleterious in all algorithms, and TLR4 p.Leu452Arg, evaluated as neutral in only one (FATHMM). On the other hand, TLR8 p.Asp663Tyr, was the most contradictory variant studied, showing the lowest BScore for functional prediction, together with conflicting evaluation in the structural prediction algorithms. Conclusions: the computational analysis of TLRs can provide insights about the populational susceptibility in episodes of viral infection with modified / new strains. Clinical and laboratory evidence will support how these variants can impact in viral epidemiology in different populations.

Keywords: algorithms • bioinformatics • polymorphism • Toll-Like Receptors (TLR)

6 MANUSCRIPT 2**ANALYSIS OF IL-1B AND IL-18 INVOLVED IN THE INNATE IMMUNE
RESPONSE IN PATIENTS WITH ACUTE CHIKUNGUNYA FEVER****Manuscript to be submitted for publication in the Acta Tropica (IF: 3.112)**

Gisnayle Ana da Silva Pereira¹, Isabella Luiza Ralph de Oliveira¹, Carlos Henrique de
Madeiros Castelletti^{1,2}, Danyelly Bruneska Gondim Martins^{1,3}, José Luiz de Lima Filho^{1,3}

¹Molecular Prospecting and Bioinformatics Group – ProspecMol; Laboratory of
Immunopathology Keizo Asami – LIKA; Federal University of Pernambuco

²Agronomic Institute of Pernambuco – IPA

³Biochemistry Department – Biosciences Center – Federal University of Pernambuco

Correspondence: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco
(UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901,
Recife, Brasil. Phone: + 55 81 2126 8484.

E-mail: bruneska@prospecmol.org

ABSTRACT

Chikungunya fever is a viral disease caused by the Chikungunya virus (CHIKV). Among the most common symptoms are fever and, in some patients, inflammation in the joints that can last for months or years, causing severe pain, swelling and movement limitation. The mechanism related to the chikungunya inflammation is not well understood. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the expression of cytokines in patients infected by CHIKV. Materials and methods: A total of 43 blood samples from individuals in the acute phase of CHIKV infection and 13 healthy individuals (IS), uninfected and used as a control group, were included in the study, to evaluate the expression of cytokines IL-1 β , IL-10, IL-18 and IFN- β using the real-time PCR technique. Results: IL-18 mRNA expression levels were downregulated in all infected patients, while was not observed a single expression pattern for IL-1 β . There is a positive correlation between IL-1 β and IL-18 genes. IL-1 β levels are lower while IL-18 levels are higher in women. Lower levels of IL-1 β mRNA expression and higher levels of IL-18 mRNA expression were associated with aging. Conclusion: IL-1 β and IL-18 may have a role in Chikungunya fever, and further studies could being highlight these genes as good markers for therapeutical approach.

Keywords: Chikungunya, Innate Immunity, Cytokines

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho as expressões de IL-1 β e de IL-18 foram as mais frequentes, sugerindo que tais genes foram identificados como possíveis potenciais biomarcadores. Os valores mais altos de expressão de IL-1 β parecem estar mais relacionados com a infecção pelo CHIKV. Tais valores poderiam contribuir com alterações nos níveis de expressão de Receptores Toll-Like e inflamassomas, moléculas importantes no reconhecimento de PAMPs e que atuam em infecções virais agudas.

Embora mais frequente nos pacientes, a IL-18 apresentou nível de expressão mais baixo em todos os grupos, quando comparado a IL-1 β , estando todos os pacientes *downregulated*. Não foi possível observar perfis para IL-10 e IFN- β , já que tais citocinas apresentaram baixa expressão em pacientes infectado por CHIKV, não havendo diferença estatísticas entre os grupos.

Através das análises por ferramentas de bioinformática conseguimos encontrar polimorfismos com elevado potencial deletério, como, por exemplo, TLR3 p.Leu532Pro, previsto como prejudicial funcional por todos os algoritmos de predição, apresentando efeito de desestabilização por algoritmos de predição estrutural; TLR4 p.Leu452Arg e TLR7 p.Leu179Arg, que além de serem previstos como deletérios pela maioria dos algoritmos, foram os nsSNPs que resultaram em maior variação na hidrofobicidade (0,943). Análises nas estruturas tridimensionais disponíveis corroboraram com os resultados dos algoritmos, devido à presença e ao impacto que tais mutações ocasionam, por ocorrem em regiões altamente conservadas.

REFERÊNCIAS

- ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. [s.l: s.n.].
- AHMAD, Z.; POH, C. L. The Conserved Molecular Determinants of Virulence in Dengue Virus. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 355–365, 2019.
- ATLAS DA SAÚDE. As infecções virais podem se manifestar sob duas formas : Períodos da infecção : Período de incubação. p. 3–5, 2019.
- BADRI, K.; HYUN, N.; PARK, H. Toll / interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. p. 196–209, 2015.
- BELGIU, M.; DRĂGU, L. Random forest in remote sensing: A review of applications and future directions. **ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing**, v. 114, p. 24–31, 2016.
- BELTRÁN-SILVA, S. L. et al. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 81, n. 3, p. 146–153, 2016.
- BHARGAVAN, B.; KANMOGNE, G. D. Toll-Like Receptor-3 Mediates HIV-1-Induced Interleukin-6 Expression in the Human Brain Endothelium via TAK1 and JNK Pathways: Implications for Viral Neuropathogenesis. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 7, p. 5976–5992, 2018.
- BRADLEY, J. H. et al. Ebola virus secreted glycoprotein decreases the anti-viral immunity of macrophages in early inflammatory responses. **Cellular Immunology**, v. 324, n. November 2017, p. 24–32, 2018.
- BROWN, J. A. et al. Dengue Virus Immunity Increases Zika Virus-Induced Damage during Pregnancy. **Immunity**, v. 50, n. 3, p. 751- 762.e5, 2019.
- BURT, F. J. et al. Chikungunya: A re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012.
- CAPRIOTTI, E. et al. WS-SNPs & GO : a web server for predicting the deleterious effect of human protein variants using functional annotation. **BMC Genomics**, v. 14, n. Suppl 3, p. S6, 2013.
- CHOE, J.; KELKER, M. S.; WILSON, I. A. Structure of Human Toll-like Receptor 3 (TLR3) Ligand- binding Domain. **Current Opinion in Immunology**, v. 3, n. September, 2005.
- DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2016.
- DEHGHANPOOR, R. et al. Predicting the effect of single and multiple mutations on protein structural stability. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 1–18, 2018.
- DIAS, J. P. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus in 2 urban areas of Brazil 1 year after emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 617–624, 2018.
- DINARELLO, C. A. et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. v. 4, n. October, p. 1–11, 2013.

DUTTA, S. K.; TRIPATHI, A. Association of toll-like receptor polymorphisms with susceptibility to chikungunya virus infection. **Virology**, v. 511, n. September, p. 207–213, 2017.

EKINS, S. et al. Illustrating and homology modeling the proteins of the Zika virus [version 1; referees: 2 approved with reservations]. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 1–22, 2016.

ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 772–777, 2016.

FATMA, B. et al. Alphavirus capsid protease inhibitors as potential antiviral agents for Chikungunya infection. **Antiviral Research**, v. 179, n. April, p. 104808, 2020.

FENINI, G.; CONTASSOT, E.; FRENCH, L. E. Potential of IL-1 , IL-18 and Inflammasome Inhibition for the Treatment of Inflammatory Skin Diseases. v. 8, n. May, p. 1–20, 2017.

FERNANDO, S. et al. An Approach for Zika Virus Inhibition Using Homology Structure of the Envelope Protein. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 12, p. 801–806, 2016.

FISCHER, J. et al. Polymorphisms in the Toll- like receptor 3 (TLR3) gene are associated with the natural course of hepatitis B virus infection in Caucasian population. n. May, p. 4–11, 2018.

FROUSIOS, K. et al. Predicting the functional consequences of non-synonymous DNA sequence variants - evaluation of bioinformatics tools and development of a consensus strategy. **Genomics**, v. 102, n. 4, p. 223–228, 2013.

GAO, W. et al. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A journey from molecular to nano therapeutics. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. JUL, 2017.

GARBERS, C. et al. Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. **Nature Publishing Group**, v. 6, 2018.

EGINAT, J. et al. Cytokine & Growth Factor Reviews The light and the dark sides of Interleukin-10 in immune-mediated diseases and cancer . **Cytokine and Growth Factor Reviews**, n. 2015, 2016.

GÉRARDIN, P. et al. Estimating Chikungunya prevalence in La Réunion Island outbreak by serosurveys: Two methods for two critical times of the epidemic. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 1–9, 2008.

GERVEN E BOHTE, 2017. Deep learning. **Nature**, v. 521, n. 7553, p. 436–444, 2015.

GONG, J. et al. TollML: A database of toll-like receptor structural motifs. **Journal of Molecular Modeling**, v. 16, n. 7, p. 1283–1289, 2010.

GONG, W. et al. Toll-like receptor-2 regulates macrophage polarization induced by excretory-secretory antigens from *Schistosoma japonicum* eggs and promotes liver pathology in murine schistosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1–16, 2018.

GREENE, C. S. et al. Big data bioinformatics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 12, p. 1896–1900, 2014.

GUENTHER, N.; SCHONLAU, M. Support-Vector Networks. **Machine learning**, v. 20, n. 3, p. 273–297, 1995.

- HALFMANN, P.; HILL-BATORSKI, L.; KAWAOKA, Y. The Induction of IL-1 β Secretion Through the NLRP3 Inflammasome during Ebola Virus Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. Suppl 5, p. S504–S507, 2018.
- HELFT, L. et al. LRR conservation mapping to predict functional sites within protein leucine-rich repeat domains. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, 2011.
- HONG, P. et al. NLRP3 inflammasome as a potential treatment in ischemic stroke concomitant with diabetes. v. 0, p. 1–13, 2019.
- HSU, C. H. et al. Risk factors for hospitalization of patients with chikungunya virus infection at sentinel hospitals in Puerto Rico. p. 1–18, 2019.
- HUANG, J. et al. Molecular dynamics simulations using the drude polarizable force field on GPUs with OpenMM: Implementation, validation, and benchmarks. **Journal of Computational Chemistry**, p. 1–8, 2018.
- HUBER, J. H. et al. Seasonal temperature variation influences climate suitability for dengue , chikungunya , and Zika transmission. p. 1–20, 2018.
- JAIN, A. et al. T cell-intrinsic IL-1R signaling licenses effector cytokine production by memory CD4 T cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.
- JIMÉNEZ-DALMARONI, M. J.; GERSWHIN, M. E.; ADAMOPOULOS, I. E. The critical role of toll-like receptors - From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2016.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nature Immunology**, v. 7, n. 2, p. 131–137, 2006.
- KIMBALL, A. K. et al. High-Dimensional Characterization of IL-10 Production and IL-10 – Dependent Regulation during Primary Gammaherpesvirus Infection High-Dimensional Characterization of IL-10 Production and IL-10 – Dependent Regulation during Primary Gammaherpesvirus Infection. v. 3, n. 3, p. 94–109, 2019.
- KORCSMAROS, T.; SCHNEIDER, M. V.; SUPERTI-FURGA, G. Next generation of network medicine: interdisciplinary signaling approaches. **Integrative Biology (United Kingdom)**, v. 9, n. 2, p. 97–108, 2017.
- KUMAR, R. E W. We are IntechOpen , the world ’ s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. [s.d.].
- LAIMER, J. et al. MAESTROweb: A web server for structure-based protein stability prediction. **Bioinformatics**, v. 32, n. 9, p. 1414–1416, 2016.
- LEE, S. M. Y. et al. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 10, p. 3793–3798, 2014.
- LUNDBORG, M. et al. NU. **Journal of Controlled Release**, n. 2017, p. #pagerange#, 2018.
- Lum FM, Ng LF. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res.* 2015;120:165-174. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.009
- MAEDA, K.; AKIRA, S. Previews TLR7 Structure : Cut in Z-Loop. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 705–707, 2016.

- MANCERA-PÁEZ, O.; ROMÁN, G. C.; ANAYA, J. Journal of the Neurological Sciences Concurrent Guillain-Barré syndrome , transverse myelitis and encephalitis post-Zika : A case report and review of the pathogenic role of multiple arboviral immunity. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 395, n. February, p. 47–53, 2018.
- MARINHO, P. et al. The Challenges Imposed by Dengue , Zika , and Chikungunya to Brazil. v. 9, n. August, p. 1–6, 2018.
- MARTINEZ, J. D.; GARZA, J. A. C. DE LA; CUELLAR-BARBOZA, A. Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 1, p. 95–105, 2019.
- MARTINS, D. O. S. et al. Antivirals against chikungunya virus: Is the solution in nature? **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 1–17, 2020.
- MCDONALD, D. R.; LEVY, O. <3-s2.0-B978070206896600003X.pdf>. Fifth Edit ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2018.
- MEKHEMAR, M. K. et al. TLR-induced immunomodulatory cytokine expression by human gingival stem / progenitor cells. **Cellular Immunology**, p. 3–10, 2017.
- Metz, SW e Pijlman, GP (2016). Função das proteínas estruturais do vírus chikungunya . Em CM Okeoma (Ed.), Vírus Chikungunya: Avanços em Biologia, Patogênese e Tratamento (pp. 63-74). Cham: **Springer International Publishing**.
- MUHAMMED, M. T. Homology modeling in drug discovery : Overview , current applications , and future perspectives. n. May 2018, p. 12–20, 2019.
- MUKHERJEE, S.; HUDA, S.; SINHA BABU, S. P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 90, n. 1, p. 1–18, 2019.
- MUKHERJEE, S.; TRIPATHI, A. Contribution of Toll like receptor polymorphisms to dengue susceptibility and clinical outcome among eastern Indian patients. **Immunobiology**, v. 224, n. 6, p. 774–785, 2019.
- MUTOH, H. et al. Biallelic Variants in CNPY3 , Encoding an Endoplasmic Reticulum Chaperone , Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. **The American Journal of Human Genetics**, v. 102, n. 2, p. 321–329, 2018.
- NARULA, A. et al. Excavating chikungunya genome to design B and T cell multi-epitope subunit vaccine using comprehensive immunoinformatics approach to control chikungunya infection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, p. 4–15, 2018.
- OKEOMA, C. M. Chikungunya virus: Advances in biology, pathogenesis, and treatment. **Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment**, p. 1–197, 2016.
- OZATO, K. et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 11, p. 849–860, 2008.
- PARTHASARATHY, D. et al. Expression analysis of toll-like receptors of Dengue-infected cornea by real-time polymerase chain reaction. **Inflammation Research**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018.
- PERDOMO-CELIS, F. et al. Ac c ep te us cr ip t Ac c ep te d us cr t. [s.d.].
- PERRIN-COCON, L. et al. TLR4 antagonist FP7 inhibits LPS-induced cytokine production and glycolytic reprogramming in dendritic cells, and protects mice from lethal influenza

infection. **Scientific Reports**, v. 7, n. July 2016, p. 1–13, 2017.

PIETROCOLA, G. et al. Toll-like receptors (TLRs) in innate immune defense against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 799–810, 2011.

PORTOU, M. J. et al. The innate immune system , toll-like receptors and dermal wound healing : A review ☆. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 31–36, 2015.

RATHORE, A. P. S. et al. Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus – induced microcephaly in fetuses. n. February, p. 1–12, 2019.

RAUSEO, D.; FERNÁNDEZ-MESTRE, M. X-linked Toll-like receptor 7 polymorphism associated with susceptibility to Chikungunya Fever. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 12, n. 3, p. 137–141, 2019.

Sahoo B, Chowdary TK. Conformational changes in Chikungunya virus E2 protein upon heparan sulfate receptor binding explain mechanism of E2-E1 dissociation during viral entry. *Biosci Rep*. 2019;39(6):BSR20191077. Published 2019 Jun 28. doi:10.1042/BSR20191077

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 5 de 2019. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 5, p. 1–13, 2019.

SEHRAWAT, P. et al. Role of Cytokines as Molecular Marker of Dengue Severity. p. 2–6, 2018.

SEIFI, M.; WALTER, M. A. Accurate prediction of functional , structural , and stability changes in PITX2 mutations using in silico bioinformatics algorithms. v. 1, p. 1–23, 2018.

SHEA, J. J. O.; GADINA, M.; SIEGEL, R. M. **9 - Cytokines and Cytokine Receptors**. Fifth Edit ed. [s.l.] Elsevier Ltd, [s.d.]. v. 1

SHEN, P. et al. Binding mode of chitin and TLR2 via molecular docking and dynamics simulation. **Molecular Simulation**, v. 42, n. 11, p. 936–941, 2016.

SIKOSEK, T. **Computational Methods in Protein Evolution**. [s.l.: s.n.]. v. 1851

SOHAIL, A.; ARIF, F. Supervised and unsupervised algorithms for bioinformatics and data science. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 151, p. 14–22, 2020.

TAGUCHI, T.; MUKAI, K. ScienceDirect Innate immunity signalling and membrane trafficking. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 59, p. 1–7, 2019.

TESELKIN, Y. O. et al. TLR-Mediated Production of Reactive Oxygen Species and Tumor Necrosis Factor Alpha by Human Peripheral Blood Neutrophils. v. 63, n. 2, p. 187–192, 2018.

TÖRMÄNEN, S. et al. Polymorphism in the gene encoding toll-like receptor 10 may be associated with asthma after bronchiolitis. n. April, p. 1–7, 2017.

TSETSARKIN, K. A.; CHEN, R.; WEAVER, S. C. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. **Current Opinion in Virology**, v. 16, p. 143–150, 2016.

- VALVERDE-VILLEGAS, J. M. et al. Endosomal toll-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to HIV and HCV co-infection – Differential influence in individuals with distinct ethnic background. **Human Immunology**, v. 78, n. 2, p. 221–226, 2017.
- VASER, R. et al. SIFT missense predictions for genomes. **Nature protocols**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.
- VENTURA, D. DE F. L. et al. Desafios da pandemia de COVID-19: por uma agenda brasileira de pesquisa em saúde global e sustentabilidade. **Cadernos de saúde publica**, v. 36, n. 4, p. e00040620, 2020.
- VIDYA, M. K. et al. International Reviews of Immunology Toll-like receptors : Significance , ligands , signaling pathways , and functions in mammals. v. 0185, 2018.
- WAGIH, O. et al. A resource of variant effect predictions of single nucleotide variants in model organisms. p. 1–16, 2018.
- WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL : homology modelling of protein structures and complexes. n. May, p. 1–8, 2018.
- WEAVER, S. C.; CHEN, R.; DIALLO, M. Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. **Annual Review of Entomology**, v. 65, n. 1, p. 313–332, 2020.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 2015.
- WEI, T. et al. BMC Structural Biology. v. 9, p. 1–9, 2008.
- XU, S. et al. Widespread positive selection on cetacean TLR extracellular domain. **Molecular Immunology**, v. 106, n. August 2018, p. 135–142, 2019.
- YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W174–W181, 2015.
- ZHANG, L. et al. ARTICLE HIV infection modulates IL-1 ? response to LPS stimulation through a TLR4-NLRP3 pathway in human liver macrophages. n. January, p. 1–13, 2019.
- ZHU, K. et al. Association of RAGE gene polymorphisms with sporadic Parkinson’s disease in Chinese Han population. **Neuroscience Letters**, v. 559, n. November, p. 158–162, 2014.

ANEXO A

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--	--	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES EM INFECÇÕES POR ARBOVÍRUS E DOENÇAS CORRELATAS

Pesquisador: José Luiz de Lima Filho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61603316.7.0000.5208

Instituição Proponente: LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEISO ASAMI

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.815.581

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa do Professor José Luiz de Lima Filho. O projeto consiste na identificação de alvos moleculares das infecções por arbovírus e doenças correlatas. Para tanto serão coletadas amostras de pacientes com suspeita clínica de infecção por arbovírus além de serem utilizadas amostras já disponíveis no banco de amostras do LIKA (amostras controle anteriores aos surtos). Testes moleculares e sorológicos para diagnóstico diferencial de arboviroses serão realizados e utilizados como parâmetro para análise dos resultados obtidos em dispositivos point-of-care desenvolvidos no LIKA, assim como comparados com outras metodologias diagnósticas. Análises computacionais e moleculares serão realizadas buscando determinar marcadores da infecção que possam ser considerados de susceptibilidade/resistência e/ou alvos moleculares para terapias. Para tanto, amostras biológicas e informações clínicas serão coletadas de 1000 pacientes suspeitos de infecção por Zika. As amostras de sangue e urina serão coletadas nas unidades de saúde e processadas no LIKA. Os pacientes participantes terão os resultados moleculares para infecção por ZIKV, DENV ou CHIKV anexados aos seus prontuários para permitir um acompanhamento adequado pela equipe médica. Os dados obtidos serão publicados mantendo a sigilo em relação à identidade dos pacientes. Dissertações de mestrado e teses de doutorado estão vinculadas ao desenvolvimento deste projeto, que já conta com recursos

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