

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

ISABELLA LUIZA RALPH DE OLIVEIRA



**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1, 2, 3 E 7 EM PACIENTES COM
FEBRE CHIKUNGUNYA**

RECIFE

2020

ISABELLA LUIZA RALPH DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1, 2, 3 E 7 EM PACIENTES COM
FEBRE CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de concentração Ciências Biológicas I, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em 21/02/2020

Orientador: Prof. Dra. Danyelly Brunaska Gondim Martins

RECIFE

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Oliveira, Isabella Luiza Ralph de
Análise de expressão das sirtuínas 1,2,3 e 7 em pacientes com febre chikungunya /
Isabella Luiza Ralph de Oliveira – 2020.

68 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Danyelly Brunaska Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à
Saúde, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Arboviroses 2. Chikungunya 3. Sirtuínas I. Martins, Danyelly Brunaska
Gondim (orient.) II. Título

616.91

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-205

ISABELLA LUIZA RALPH DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1, 2, 3 E 7 EM PACIENTES COM
FEBRE CHIKUNGUNYA**

Aprovada em: 21/02/2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de concentração Ciências Biológicas I, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Departamento de Bioquímica – UFPE/ Pesquisadora do LIKA-UFPE

Dr. Fabrício Oliveira Souto
Núcleo de Ciências da Vida -UFPE/ Pesquisador do LIKA-UFPE

Dra. Cláudia Diniz Lopes Marques
Departamento de Medicina Clínica-UFPE/ Reumatologista do Hospital das Clínicas

RECIFE

2020

A minha mãe, com muito amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sentido da minha existência e, por meio da sua graça, permitir a conclusão desta grande experiência em minha vida.

A minha mãe e ao meu irmão que sempre estão comigo independente das circunstâncias e tanto me estimularam durante esta fase. Sem eles não seria possível a conclusão do mestrado.

A minha cunhada, Karyne Barbosa, pela amizade e orações.

A minha orientadora, Danyelly Bruneska, um exemplo de profissional a quem eu tenho o privilégio de trabalhar. É impressionante a sua leveza. Agradeço a visão científica que ela me trouxe, por sua paciência, atenção e carinho durante todos esses anos.

Aos colegas do grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (Prospecmol) pela ajuda nos experimentos e momentos de distração.

A professora Maria da Paz Carvalho pelo apoio a entrada ao LIKA durante à minha iniciação científica.

As minhas amigas do LIKA Iasmim Lopes, Thaynara Oliveira e Tainá Santos por toda a ajuda e por compartilharem bons momentos.

A Raul Penaforte, pela sua atenção, carinho, apoio e orações.

Aos amigos que me acompanham desde a graduação, Érica Oliveira, Rafael Vinícius, Rayssa Pastick e Weverton Alves.

Aos meus irmãos em Cristo da Igreja Batista Firme Promessa.

A banca examinadora que se dispôs a contribuir com este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami pela infraestrutura.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

EPÍGRAFE

“Porque nele foram criadas todas as coisas que há nos céus e na terra, visíveis e invisíveis, sejam tronos, sejam dominações, sejam principados, sejam potestades. Tudo foi criado por ele e para ele”.

Colossenses 1:16

RESUMO

As arboviroses representam um problema mundial de saúde pública. Dentre elas, destacam-se pelos surtos ocorridos, Dengue, Zika e Chikungunya. No Brasil, o primeiro caso de infecção por chikungunya ocorreu em 2014, sendo notificados, posteriormente, 271.284 casos em 2016. A febre chikungunya, em sua fase aguda, tem como principais sintomas elevada temperatura corporal, artralgia, cefaleia e exantema, sua fase crônica é marcada por manifestações musculoesqueléticas persistentes. A fisiopatologia da doença ainda é pouco conhecida, principalmente em relação aos aspectos epigenéticos que envolvem proteínas do tipo histonas desacetilases (HDAC's). Elas são responsáveis pelo remodelamento da cromatina e expressão gênica e podem atuar na regulação da replicação viral. Dentre as classes de HDAC's, destacam-se as sirtuínas (SIRT), enzimas que apresentam sete isoformas (SIRT1-SIRT7) dependentes do NAD⁺ como cofator. **OBJETIVO:** Avaliar a expressão gênica da *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3* e *SIRT7* em pacientes portadores de febre chikungunya e sua associação com as características clínicas da doença. **METODOLOGIA:** Foram estudados 52 indivíduos divididos em três grupos: 38 com presença de IgM positivo para o vírus, cinco negativos para chikungunya, porém com histórico de dengue e/ou zika; e nove indivíduos saudáveis. As análises sorológicas foram realizadas por *ELISA*, enquanto a análise dos níveis de expressão gênica foi por PCR em tempo real. **RESULTADOS:** Nos pacientes que expressaram SIRT1 (16/38), nenhum se encontrou *up regulated*; enquanto para *SIRT2* (10/36), 27,77% dos que expressaram se apresentaram *up regulated*. A avaliação por idade demonstrou níveis aumentados na expressão de SIRT2 em pacientes com idades mais avançadas. Para *SIRT3* apenas três pacientes apresentaram expressão, sendo apenas um *up regulated* em relação ao grupo controle. A *SIRT7* apresentou todos os quatro pacientes em *down regulated*. **CONCLUSÃO:** A ausência ou baixa expressão dos genes SIRT3 e SIRT7 parecem caracterizar um perfil para a febre chikungunya relacionados a fisiopatologia da doença e podem sugerir potenciais propostas terapêuticas.

Palavras-chave: Arboviroses. Chikungunya. Sirtuínas.

ABSTRACT

Arboviruses represent a worldwide public health problem. Among them, stand out for the outbreaks, Dengue, Zika, and Chikungunya. In Brazil, the first case of Chikungunya infection occurred in 2014, with 271,284 cases being reported in 2016. The main symptoms of chikungunya fever are high fever, arthralgia, headache and exanthema, and its chronic phase is marked by intermittent arthralgia. The pathophysiology of the disease is still poorly known, especially concerning epigenetic aspects involving proteins such as histone deacetylases (HDACs). They are responsible for chromatin remodeling and gene expression and can act in the regulation of viral replication. Among the classes of HDAC`s, we highlight the Sirtuins (SIRT), enzymes that have seven isoforms (SIRT1-SIRT7) dependent on NAD + as a cofactor. **OBJECTIVE:** To evaluate the gene expression of SIRT1, SIRT2, SIRT3, and SIRT7 in patients with chikungunya fever and its association with the clinical characteristics of the disease. **METHODOLOGY:** A total of 52 individuals were studied and divided into three groups: 38 with IgM positive for the virus, five negative for chikungunya, but with a history of dengue and / or zika; and nine healthy individuals. Serological analysis were performed by ELISA, while analysis of gene expression levels was performed by real-time PCR. **RESULTS:** In patients who expressed SIRT1 (16/38), none were found to be up regulated; while for SIRT2; while for SIRT2 (26/36), 27.77% of those who expressed were up regulated. The age assessment demonstrated increased levels of SIRT2 expression in older patients. For SIRT3, only three patients showed expression, with only one up regulated, when compared to the control group. For SIRT7, all four patients were down regulated in the group of patients with IgM positive for chikungunya. **CONCLUSION:** The absence or low expression of the SIRT3 and SIRT7 genes seems to characterize a profile for chikungunya fever related to the pathophysiology of the disease and my suggest potential therapeutic proposals.

Keywords: Arboviruses. Chikungunya. Sirtuins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Continentes reportados com a ocorrência do vírus Chikungunya. Adaptado de Centro de Pesquisa U.S para Controle e Prevenção de Doenças. Disponível em https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html .	20
FIGURA 2	Organização genômica do vírus Chikungunya. Adaptado de NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019a.	22
FIGURA 3	Patogênese da infecção por Chikungunya. Adaptado de Ong et al., 2014.	24
FIGURA 4	Diagnóstico baseado no período da doença. Adaptado de TANABE et al., 2018.	27
FIGURA 5	Mecanismo de desacetilação das Sirtuínas. Adaptado de WANG et al., 2019.	30
FIGURA 6	Localização subcelular das Sirtuínas. Adaptado de MOSTOSLAVSKY; ESTELLER; VAQUERO, 2010.	31
FIGURA 7	Expressão relativa de SIRT1 nos grupos CHIKV IgM ⁺ e IgM ⁻ .	44
FIGURA 8	Expressão relativa de SIRT1 em pacientes CHIKV IgM ⁺ com e sem artralgia.	45
FIGURA 9	Expressão relativa de SIRT1 em pacientes CHIKV IgM ⁺ com e sem febre alta.	46
FIGURA 10	Expressão relativa de SIRT1 em pacientes CHIKV IgM ⁺ com fadiga e sem fadiga.	46
FIGURA 11	Expressão relativa de SIRT2 nos grupos CHIKV IgM ⁺ e CHIKV IgM ⁻ .	47
FIGURA 12	Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM ⁺ de acordo com os grupos etários.	48
FIGURA 13	Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM ⁺ com e sem artralgia.	48
FIGURA 14	Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM ⁺ com e sem febre alta.	49
FIGURA 15	Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM ⁺ com e sem fadiga.	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Fórmulas utilizadas para cálculo de ΔCT e $\Delta\Delta CT$.	40
TABELA 2	Grupo etário, sexo e clínica dos pacientes CHIKV IgM positivos.	42
TABELA 3	Dados clínicos e expressão gênica da SIRT1 e SIRT2.	43
TABELA 4	Dados clínicos e expressão gênica da SIRT3.	50
TABELA 5	Dados clínicos e expressão gênica da SIRT7.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6K- Proteína estrutural 6K
AINES-Anti-inflamatórios não esteróides
AR- Artrite reumatoide
ATP- Adenosina trifosfato
cDNA-DNA complementar
CHIKV-Vírus chikungunya
CT- Ciclo threshold
DAIC- Doença articular inflamatória crônica
DENV- Dengue vírus
DMARDS- Drogas anti-reumáticas modificadoras de doença
DNA- Ácido desoxirribonucléico
DNMT1- DNA metiltransferase 1
DNMTS- DNA metiltransfrase
E1- Proteína estrutural 1
E2- Proteína estrutural 2
E3- Proteína estrutural 3
ECSA- Leste, Central e Sul Africano
EEE-Vírus da Encefalite Equina Oriental
EEV-Vírus da Encefalite Venezuelana
ELISA- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPA- Espondiloartrites
ERO- Espécies reativas de oxigênio
EVA- Escala visual analógica
FOXO - Fator de transcrição FOXO
G-6-P-D- Glicose-6-fosfato desidrogenase
HATs- Histonas acetil transferases
HBV- Vírus da hepatite B
HC- Hospital das Clínicas
HCQ- Hidoxicloroquina

HDAC`s- Histonas desacetilases
HIF-2 α – Fator indutor de hipóxia 2 α
HIV- Vírus da imunodeficiência humana
IDH2- Isocitrato desidrogenase 2
IG- Imunoglobulina G
IGM- Imunoglobulina M
IL- Interleucina
IOL- Linhagem do Oceano Índico
KMTD- Lisina demetilases
KMTS- Lisina metiltransferases
LAMP- Amplificação isotérmica mediada por *loop*
MAYV- Mayaro vírus
MMP- Metaloproteinase
MTX- Metrotexato
NAD⁺- Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NADH- Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida
NF-K β - Fator nuclear kappa β
NLRP3- *Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat (NLR) 25 and Pyrin Domain Containing Receptor 3*
NR- Não respondeu
NS- Não sabe
NSP1- Proteína não estrutural 1
NSP2- Proteína não estrutural 2
NSP3- Proteína não estrutural 3
NSP4- Proteína não estrutural 4
ONVV- O' Nyong-Nyong vírus
ORF- Fase de leitura aberta
PAGM2- Fosfoglicerato mutase 2
pH- Potencial hidrogeniônico
PÓS CHIK- Pós chikungunya
PROTEÍNA C- Proteína do capsídeo C
qPCR- PCR quantitativa em tempo real
RNA- Ácido ribonucléico
ROS- Espécies reativas de oxigênio

RT- PCR reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia polimerase

RT- qPCR- reação de transcriptase reversa seguida da reação em cadeia polimerase quantitativa

SIRT- SIRTUÍNAS

SIRT1- SIRTUÍNA 1

SIRT2- SIRTUÍNA 2

SIRT3- SIRTUÍNA 3

SIRT4- SIRTUÍNA 4

SIRT7- SIRTUINA 7

SOD2- Superóxido dismutase 2

SSZ -Sulfasalazina

SUS- Sistema Único de Saúde

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

WEE- vírus da Encefalite Equina Ocidental

WNV- vírus do Nilo Ocidental

YFV- vírus da Febre Amarela

ZIKV- Zika vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	ARBOVÍRUS.....	19
2.2	VÍRUS CHIKUNGUNYA.....	20
2.2.1	Genoma do vírus Chikungunya.....	21
2.2.2	Fisiopatologia, clínica e fatores de risco da febre chikungunya....	23
2.2.3	Diagnóstico da febre chikungunya.....	26
2.2.4	Tratamento da febre chikungunya.....	27
2.3	EPIGENÉTICA.....	29
2.3.1	Desacetilação de Histonas.....	30
2.4	SIRTUÍNAS.....	31
2.4.1	Sirtuínas nucleares e citoplasmáticas.....	32
2.4.1.1	O papel da Sirtuína 1.....	32
2.4.1.2	O papel da Sirtuína 2.....	33
2.4.2	Sirtuína Mitocondrial.....	34
2.4.2.1	O papel da Sirtuína 3.....	34
2.4.2.2	Sirtuína Nucleolar.....	35
2.4.2.3	O papel da Sirtuína 7.....	35
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivos gerais.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	METODOLOGIA.....	38
4.1	AMOSTRAS.....	38
4.2	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática.....	38
4.3	Purificação do RNA.....	38
4.4	Confecção e quantificação do DNA complementar.....	39
4.5	Análise de expressão gênica.....	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41

5	RESULTADOS.....	42
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	42
5.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	43
5.2.1	Análise das Sirtuínas.....	43
5.2.1.1	Nucleares e citoplasmáticas.....	43
5.2.1.2	Sirtuína mitocondrial.....	49
5.2.1.3	Sirtuína nucleolar	51
5.2.2	REGRESSÃO LINEAR ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES	52
6	DISCUSSÃO.....	53
6.1	Sirtuínas nucleares e citoplasmáticas.....	53
6.2	Sirtuína mitocondrial.....	55
6.3	Sirtuína nucleolar.....	56
7	CONCLUSÃO.....	58
8	REFERÊNCIAS	59
	ANEXO A.....	68

1. INTRODUÇÃO

As arboviroses representam um problema mundial de saúde pública. São transmitidas por artrópodes e têm como principais representantes os gêneros *Alphavirus* e *Flavivirus*. Dentre as arboviroses, se destacam pelos surtos ocorridos o vírus da Dengue (DENV), o vírus Zika (ZIKV) e o vírus Chikungunya (CHIKV) (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017).

No Brasil, o primeiro caso de infecção por CHIKV aconteceu ano de 2014, na Bahia. Passados dois anos, no país, foram notificados 271.284 casos (MAGALHAES et al., 2017). Entre 50 a 97% dos pacientes infectados pelo CHIKV manifestam características clínicas (GANESAN; DUAN; REID, 2017).

Dentre os principais sintomas na fase aguda da febre chikungunya, destacam-se: cefaleia, febre alta, exantema, fadiga, náusea, fotofobia e a poliartralgia que acomete cerca de 80%. No período subagudo, a doença é caracterizada pela permanência do processo inflamatório como artrite, artralgia e bursite. A fase crônica é definida como o período posterior a três meses da infecção, pode ter duração de anos, e tem como característica clínica a persistência dos sintomas da fase subaguda. É frequente a queixa de dor articular intensa onde o quadro é conhecido como de inflamação pós-chikungunya (VAIRO et al., 2019).

Em quadro de infecções virais ocorridas por: Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), Papilomavírus Humano (HPV), Vírus da Hepatite B (HBV), Vírus da Hepatite C (HCV) as proteínas do tipo histonas desacetilases (HDAC's) são responsáveis por remodelar a cromatina e, como consequência, a regulação da expressão gênica por meio do processo de transcrição. Dentre as classes de HDAC's, as enzimas conhecidas como sirtuínas (SIRT) onde, em humanos, existem sete isoformas (SIRT1-SIRT7) dependentes do NAD⁺ (NAD⁺ oxidado) como cofator (HERBEIN; WENDLING, 2010).

Foi descoberto que as SIRT1 e SIRT2 participam do processo transcricional do HBV (CHENG et al., 2018), enquanto a SIRT3 é responsável pela modulação de vias metabólicas em infecções virais. A SIRT3 também atua na oxidação dos ácido tricarbóxicos (Wu et al., 2019). Já a expressão da SIRT7 é regulada pela proteína viral HBx (PANDEY; KUMAR, 2015). Apesar da comprovação de que as sirtuínas atuam na fisiopatologia das infecções virais, sabe-se que as suas funções de estímulo ou limitação a infecção variam de acordo com o tipo da doença (HACKETT et al., 2019).

Assim, diante do conhecimento sobre o papel das Sirtuínas nas infecções virais, este trabalho tem como objetivo avaliar como os níveis de expressão gênica das SIRTs (SIRT1, SIRT2, SIRT3 e SIRT7) são capazes de modular a fisiopatologia da febre chikungunya e se comportam em pacientes com a doença, o que é extremamente necessário para o melhor entendimento da febre chikungunya.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARBOVÍRUS

De acordo com o sistema taxonômico, os *Arthropod-borne virus* (arbovírus) fazem parte de um amplo grupo de vírus que se replicam nas glândulas salivares do vetor hematófago e são transmitidos para hospedeiros vertebrados através da picada. Os arbovírus são responsáveis pela manutenção de mecanismos e transmissão por meio de ciclos que ocorrem de duas maneiras: vertical e horizontal. A primeira se dá pela passagem do vírus da mãe para os seus descendentes, enquanto a horizontal é realizada de forma sexual e oral entre o vetor artrópode e o hospedeiro durante o repasto sanguíneo (HANLEY; WEAVER, 2008).

O ciclo de transmissão pode ser dividido em: (i) silvestre, encontrado sobretudo na África, restrito a macacos, roedores e pássaros; (ii) urbano, que tem como vetor o homem, foi descoberto inicialmente na Ásia, e hoje é identificado na América (PAUL; SADANAND, 2018).

A maior parte dos arbovírus tem como material genético o RNA (ácido ribonucléico) e fazem parte dos gêneros: Orthobunyavirus, Orbivirus, Phlebovirus, Nairovirus, Thogotovirus, Vesiculovirus, Vesiculovirus, Flavivirus e Alphavirus (MAYER; TESH; VASILAKIS, 2017).

Baseado na localização geográfica, os alphavírus são divididos em duas formas: (i) do novo mundo, representado pelo vírus Sindbis, Vírus da encefalite equina oriental, ocidental e Venezuelana (EEE, WEE, EEV) e; do velho mundo, representado pelo Ross River virus (RRV), vírus da floresta Semiliki (SFV), O' Nyong-Nyong vírus (ONVV) e vírus Chikungunya (CHIKV) (CARRASCO; SANZ; GONZÁLEZ-ALMELA, 2018). Este gênero tem como característica causar doenças inflamatórias como artrite severa e encefalite, sendo o RRV, ONVV, Mayaro vírus (MAYV) e CHIKV são vírus de maiores potenciais artritogênicos (SONG et al., 2019).

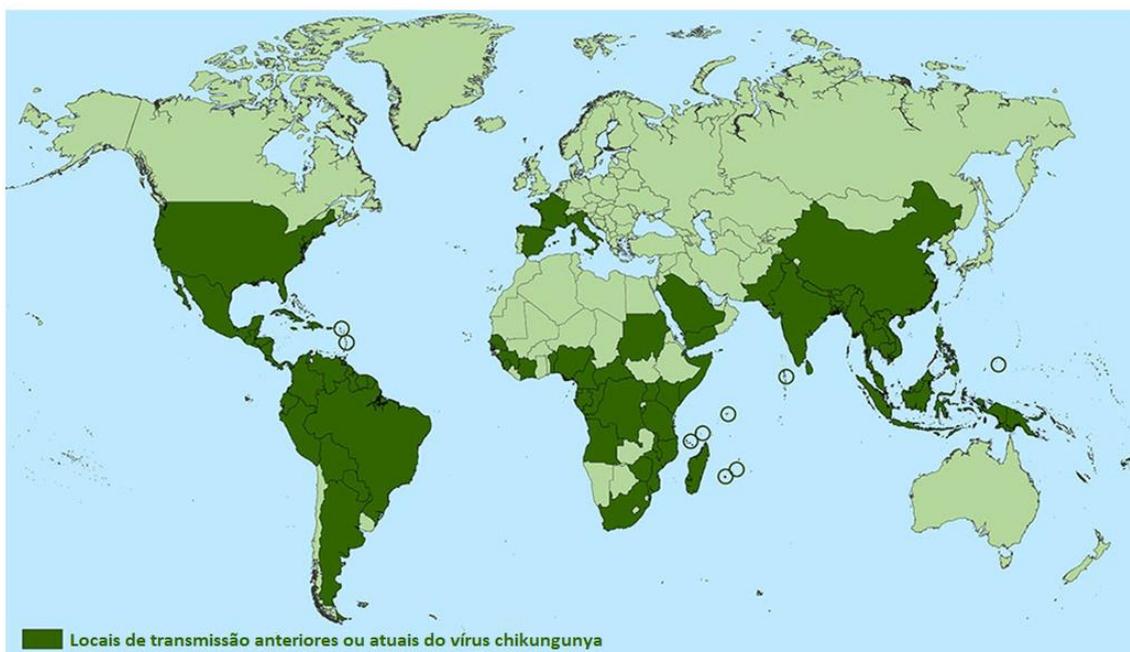
Consideradas um problema de saúde pública, as arboviroses correspondem a 30% das doenças infecciosas presentes na sociedade. Dentre os arbovírus mais encontrados no Brasil estão o DENV constatado em 2008, com quatro subtipos, além do ZIKV e CHIKV identificados entre os anos de 2013-2014 (MICHELL et al., 2018).

2.2 VÍRUS CHIKUNGUNYA

O CHIKV foi descoberto em 1952 diante da epidemia ocorrida na Tanzânia e, no ano seguinte, após ser isolado, começaram os primeiros estudos sobre o vírus (LUMSDEN, 1955). O termo “chikungunya” provém do dialeto *Kungunyala* que significa: “aquele que se dobra para frente” em decorrência da artralgia que acomete os pacientes (ROBINSON, 1955).

Após o primeiro caso, em 1952, as mais representativas epidemias ocorreram na Ásia, especialmente no Sudeste, e África; Paquistão, Índia, Sri Lanka, Birmânia, Tailândia, Mauritius, Ilha da Réunion (Oceano Índico), Madagascar, além de outras ilhas do Oceano Pacífico (BALA MURUGAN; SATHISHKUMAR, 2016). Na Índia, as mais severas epidemias oconteceram entre os anos de 1963 e 1973. O vírus foi responsável por causar diversos surtos continentais distintos (**Figura 1**) (CAVRINI et al., 2009).

Figura 1: Continentes reportados com a ocorrência do vírus Chikungunya.



Fonte: Centro de Pesquisa U.S para Controle e Prevenção de Doenças. Disponível em <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>. Adaptado pelo autor. Acesso 20 de agosto de 2019.

Baseado nas regiões geográficas, foram realizadas análises filogenéticas que demonstraram quatro genótipos distintos: O Oeste Africano, isolado no Senegal e Nigéria; o Leste, Central, e Sul Africano (ECSA) originado na própria região; o Asiático

e a Linhagem do Oceano Índico (IOL) que representa o genótipo descoberto mais recente (WAHID et al., 2017).

As epidemias mais relevantes ocorridas na África, Ásia e Américas têm como o principal vetor o *Aedes aegypti*, enquanto o surto acontecido no Oceano Índico foi causado por um segundo vetor o *Aedes albopictus*, que sofreu uma mutação A226V (substituição da alanina por valina na posição 226) na proteína do envelope viral E1 da cepa ECSA. A troca permitiu acentuada replicação no trato gastrointestinal, além de transmissão e disseminação através das glândulas salivares para a Europa, Sudeste Asiático e África Subsaariana (MATUSALI et al., 2019) (SINGH et al., 2012).

No Brasil, o primeiro caso autóctone da doença ocorreu em 2014 na cidade de Oiapoque, estado do Amapá e, após uma semana, em Feira de Santa, Bahia, tornando a infecção endêmica nas referidas regiões (Brasil, 2014). Na cidade de Feira de Santana, foi encontrado o genótipo ECSA, enquanto no município de Oiapoque a linhagem Asiática. De acordo com os dois diferentes genótipos que acometem o Brasil, fica claro que eles são de rotas distintas e não associados (SLAVOV et al., 2018). Entre o ano de 2014 e Setembro de 2018 foram notificados 697.564 casos, sendo 94.672 confirmados através de análises laboratoriais (PAWH, 2017).

2.2.1 GENOMA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA

O CHIKV é enquadrado no gênero alphavírus, com mais de 30 espécies, e pode ser transmitido ao homem, primatas, anfíbios, répteis, pássaros, roedores, porcos e equinos. Tem como família a *Togaviridae* e possui semelhança aos demais alphavírus artritogênicos de mesmo gênero (MAHALINGAM et al., 2017) (ELBEAINO et al., 2018).

O CHIKV contém o RNA como material genético com cerca de 12 kb nucleotídeos de sentido positivo, é envelopado e com partícula viral completa (vírion) esférica em torno de 70nm de diâmetro (WEAVER; LECUIT, 2015a) (BURT et al., 2017a).

Seu ciclo de replicação se completa com cerca de 4 horas (HORCADA; DÍAZ-CALDERÓN; GARRIDO, 2015).

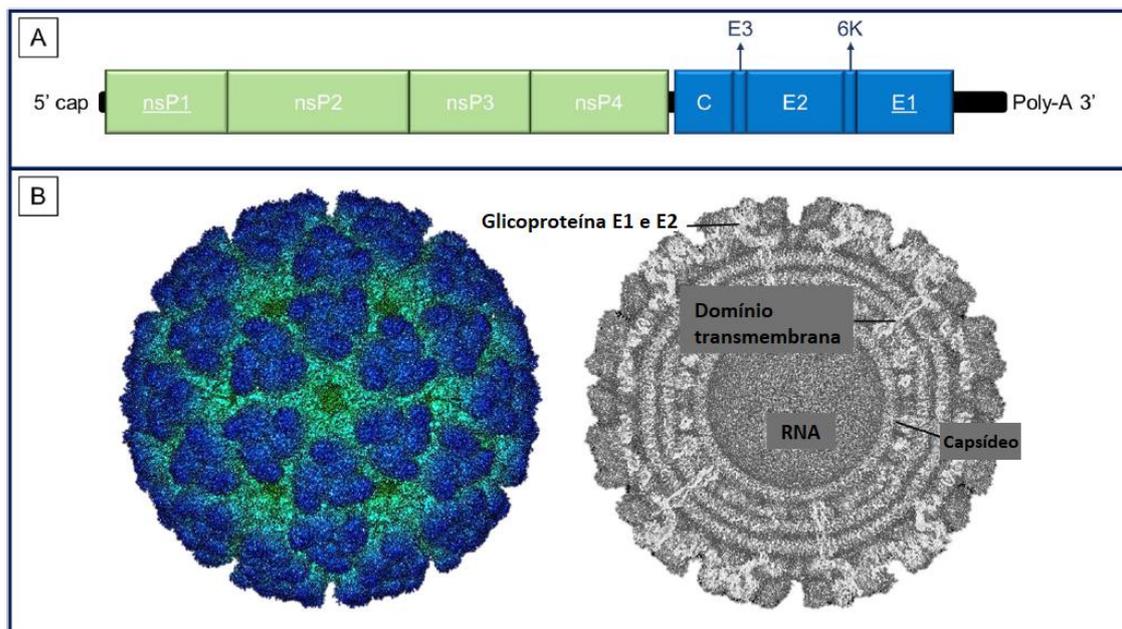
O genoma é formado por duas classes de proteínas, sendo cinco estruturais e quatro não estruturais. As proteínas estruturais são E1, E2, E3, 6K e C (proteína do capsídeo),

enquanto as não estruturais são nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4 (**Figura 2**) (HUANG; VANLANDINGHAM; HIGGS, 2018).

As proteínas não estruturais são responsáveis pelo processo de replicação viral, e as glicoproteínas E1 e E2 têm como função o transporte dos epítomos virais e o mecanismo de entrada viral à célula (TANABE et al., 2018). A glicoproteína E3 é fundamental para que ocorra a heterodimerização entre E1 e E2. Entretanto, a proteína C tem como principal função a construção do nucleocapsídeo que é capaz de realizar auto clivagem de poliproteínas estruturais que se ligam ao RNA, além de atuar na replicação viral e no controle da síntese de proteínas do hospedeiro e vírus (SINGH et al., 2018). A atividade da proteína estrutural 6K (6K) ainda não está muito clara, porém é possível que ela esteja relacionada ao mecanismo de brotamento do viral (ONG; LUM; NG, 2014).

O vírus possui duas fases de leitura aberta (ORF) que são codificadas pelas proteínas estruturais e não estruturais. Na superfície da partícula viral madura do CHIKV são encontradas três cópias do heterodímero E1-E2 que formam a estrutura da proteína s (*spike*) de 80 cópias (HUANG; VANLANDINGHAM; HIGGS, 2018).

Figura 2: Organização genômica do vírus Chikungunya.



Fonte: NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019a. Adaptado pelo autor.

2.2.2 FISIOPATOLOGIA, CLÍNICA E FATORES DE RISCO DA FEBRE CHIKUNGUNYA

O mecanismo de entrada do CHIKV na célula ocorre em duas fases. Inicialmente, há ligação do vírus com os receptores presentes na superfície celular, posteriormente, endocitose seguida da junção do envelope viral com as vesículas de endocitose da membrana que são responsáveis pela formação dos poros de fusão (SAHOO; CHOWDARY, 2019). A passagem efetiva do vírus à célula ocorre por meio de receptores celulares, em condições de baixo pH (potencial hidrogeniônico), sendo condicionada a modificação conformacional do envelope glicoproteico viral permitindo que o capsídeo e a informação genética sejam inseridas no citoplasma (SCHNIERLE, 2019).

Após a acidificação endossomal e alterações conformacionais no envelope, decorrentes da entrada do vírus na célula através da picada do vetor infectado, a infecção tem início nos macrófagos e fibroblastos que representam a primeira barreira imunológica. O CHIKV se propaga por duas rotas distintas: pode ser lançado diretamente no sistema circulatório ou se dirige aos linfonodos com a perspectiva de replicação acentuada, de onde segue através da circulação, sendo disseminado para órgãos e tecidos periféricos como músculos, fígado, baço, cérebro e articulações, locais onde a replicação ocorre, acarretando a fase de viremia (LUM; NG, 2015) (**Figura 3**).

A febre chikungunya evolui e pode ser subdividida em três fases: aguda, subaguda e crônica. O processo infeccioso agudo é caracterizado como as três primeiras semanas iniciais dos sinais e sintomas da doença. A fase normalmente dura de 7-10 dias com período de incubação 3-7 dias. As principais manifestações clínicas são: hiperpigmentação macular, poliartralgia bilateral e simétrica principalmente no tornozelo, punhos e exantema maculopapular em 40-75% dos pacientes, que também pode acontecer na sola dos pés, palma das mãos e face (MARTINEZ; GARZA; CUELLAR-BARBOZA, 2019).

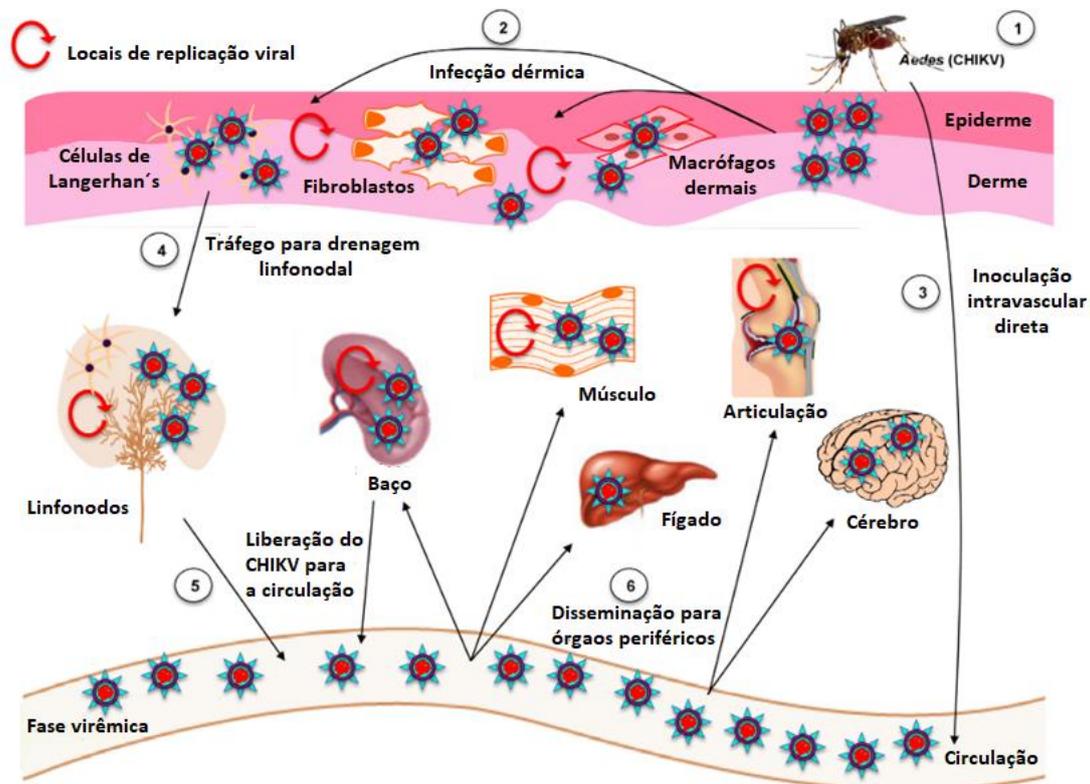
A viremia primária acontece na fase aguda da infecção através da replicação em células satélites e fibroblastos acarretando a lesão das fibras musculares e, como resultado, mialgia (BOUQUILLARD et al., 2018).

O período agudo apresenta características clínicas mais típicas da doença em jovens, se comparados aos idosos. Apesar do período de viremia ter duração entre 7 a 14 dias, a sintomatologia pode variar entre dias a semanas e, em alguns casos, as

manifestações articulares podem permanecer por meses a anos (BOUQUILLARD et al., 2018).

A febre ($>39^{\circ}\text{C}$), que tem início súbito, dura em média 4 a 5 dias, que normalmente acontece durante a artralgia. Essa fase varia de acordo com a carga viral, que pode ser superior a 10^9 cópias do genoma viral por mililitros de sangue, sendo detectada a presença da IgM (Imunoglobulina M) para o vírus (WEAVER; LECUIT, 2015b).

Figura 3: Patogênese da infecção por Chikungunya.



Fonte: Ong et al., 2014. Adaptado pelo autor.

Através do reconhecimento do CHIKV durante a fase aguda com artralgia recorrente, assim como suas proteínas nos fluidos e tecidos sinoviais, foi demonstrado que macrófagos e fibroblastos dos sinóvios são sensíveis a ação do CHIKV. Em relação ao sistema muscular, sabe-se que a necrose é consequência da infecção em células progenitoras onde o vírus permanece o que pode acarretar a miopatia (MATUSALI et al., 2019).

Quando a fase aguda descompensa e atinge órgãos e sistemas como cardiovascular, respiratório, renal, sistema nervoso e pele a doença é classificada como fase aguda atípica que acomete principalmente pacientes com idade acima de 65 anos, porque é associada a outras comorbidades como diabetes, hipertensão arterial e coinfeções como o vírus influenza, DENV e o vírus do Nilo Ocidental (WNV) (SUHRBIER, 2019a).

Na fase subaguda, 50-90% dos pacientes permanecem com artralgia persistente sendo a maioria mulheres com mais de 40 anos. Uma pequena parcela dos pacientes permanecem assintomáticos. Além da artralgia persistente, são frequentes a astenia, rigidez matinal, bursite e tenossinovite (DRAHANSKY et al., 2016).

Nesta fase, a resposta inflamatória é mais intensa, a doença se agrava com miosite e sorologia para IgM onde pode haver evolução para a fase crônica com a presença do IgG e IgM, o que sinaliza a manutenção do vírus nas células musculares que recebem o infiltrado celular e ocasionam necrose (AMDEKAR; PARASHAR; ALAGARASU, 2017).

Durante o período crônico de infecção, superior a três meses, são comuns quadros de artrite e/ou artralgia em pacientes que apresentaram elevada viremia durante a fase aguda, depressão e alopecia. São frequentes os casos de poli ou oligoartralgia, principalmente nos joelhos, tornozelos, mãos e punhos, edema articular somados a rigidez matinal (DRAHANSKY et al., 2016) (MARQUES et al., 2017a).

Bebês, crianças e pessoas de idade avançada são consideradas grupos de riscos para o desenvolvimento da cronicidade na febre chikungunya. Pacientes com diabetes, hipertensos e com a presença de manifestações articulares anteriores também são mais propícios para a evolução da doença (OKEOMA, 2016).

Muitos trabalhos avaliam o papel do sistema imunológico no período agudo de infecção e a progressão para a fase crônica. Há aumento das células do tipo T, citocinas e quimiocinas nos pacientes que evoluem para a cronicidade. O mecanismo crônico pode ser devido a constância da infecção, manutenção da resposta inflamatória pela presença do material genético viral e ação do sistema imune mesmo após a infecção. Porém, ainda não há comprovação de nenhuma dessas hipóteses (BURT et al., 2017b).

Apesar da artropatia causada pela infecção por CHIKV não estar completamente estabelecida, foram realizados diversos estudos com vírus que possuem características artritogênicas. Nestes, a resposta imune do hospedeiro é responsável pela lesão tissular nas articulações e alguns pacientes em fase crônica foram classificados com diagnóstico

de espondiloartrites (EpA) e artrite reumatoide (AR). Os pacientes que apresentam artrite inflamatória indiferenciada não foram considerados como acometidos por EpA e AR, assim, foi feita a distinção dos inflamatórios e não inflamatórios. O diagnóstico sugestivo de doença articular inflamatória crônica (DAIC) pós-chikungunya (pós-chik) é realizado depois de três meses da infecção aguda recorrente por CHIKV com clínica de quadro poliarticular inflamatório (MARQUES et al., 2017a).

2.2.3 DIAGNÓSTICO DA FEBRE CHIKUNGUNYA

O diagnóstico é realizado de acordo com o quadro clínico do paciente somado as características epidemiológicas da região geográfica afetada pela presença do vetor e confirmado por meio de análises laboratoriais (MALINOSKI, 2017). De acordo com os parâmetros laboratoriais durante a fase aguda da infecção, podem ser utilizados: isolamento do CHIKV em amostras clínicas, detecção do RNA viral pela técnica de RT-PCR (Reação de Transcriptase Reversa seguida da Reação em Cadeia Polimerase), detecção do anticorpo IgM de fase aguda no quinto dia após a sintomatologia e o IgG (Imunoglobulina G) depois de duas semanas da infecção (ZANNOLI et al., 2018).

As análises moleculares representam estratégias para o diagnóstico do CHIKV uma vez que possuem alta sensibilidade na identificação do RNA viral. Para tanto, podem ser utilizados o método conhecido como Amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP), ensaio Multiplex, RT-PCR e RT-qPCR (Reação de Transcriptase Reversa seguida Reação em Cadeia Polimerase Quantitativa) onde se tem como objetivo a detecção da proteína do envelope (E) ou a proteína não estrutural (*nsp1*) por meio das metodologias da sonda *Taqman* o *SYBR green* (BURT et al., 2012).

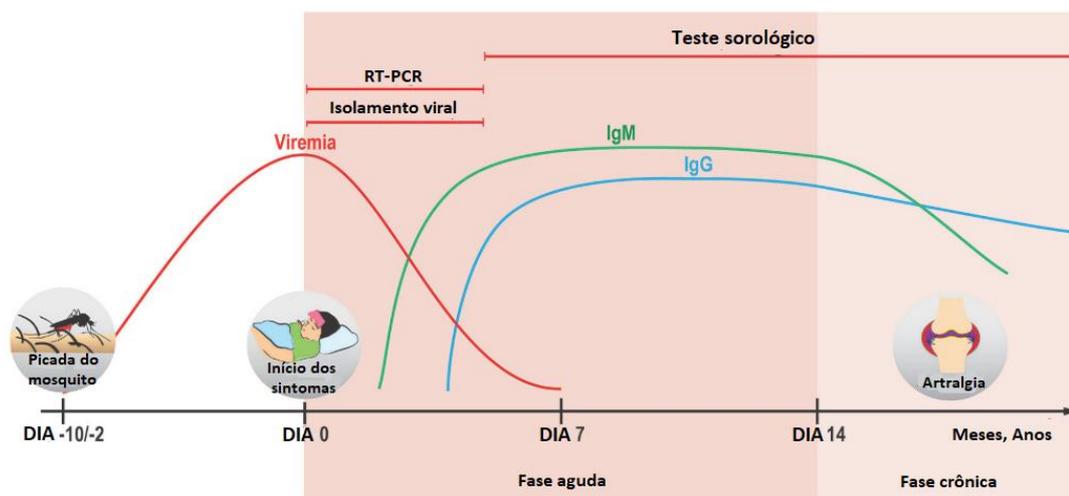
Por outro lado, os testes sorológicos têm como objetivo a detecção dos anticorpos dos tipos IgM e IgG representando a fase aguda e crônica, respectivamente. O IgM pode ser detectado no quinto dia após o começo da clínica, enquanto o IgG após poucos dias atingindo o pico máximo no 15º dia (Simon et al., 2015). A imunoglobulina de fase aguda pode ser encontrada no soro em um período superior a dois anos (ZAID et al., 2018).

Kits de metodologias distintas conhecidos como *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) *in house* e comerciais podem ser utilizados para identificação do anticorpo correspondente ao antígeno alvo. Dentre os kits comerciais, destacam-se o

InBios, IBL, Abcam e o EuroImmuno (NATRAJAN; ROJAS; WAGGONER, 2019b) (BURT et al., 2012).

A escolha da metodologia mais efetiva de diagnóstico utilizada é baseada no período em que a amostra foi coletada e identificação dos vírus na corrente sanguínea (**Figura 4**) (TANABE et al., 2018).

Figura 4: Diagnóstico baseado no período da doença.



Fonte: TANABE et al., 2018. Adaptado pelo autor.

Em relação aos achados laboratoriais durante o período agudo de infecção, destacam-se: pequena elevação nos níveis de aminotransferases, moderada trombocitopenia, leucopenia e linfopenia. Na fase subaguda, é necessário diagnóstico diferencial com doenças que possuem acometimento autoimunes, reumatológicos, desregulação na tireoide, hepatite e gota. Com a evolução para a cronicidade da doença, exames radiológicos de imagens, principalmente em pés, mãos e pulsos são importantes para o seguimento da febre chikungunya (MEJÍA; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018).

2.2.4 TRATAMENTO DA FEBRE CHIKUNGUNYA

A proposta inicial de tratamento segue o uso de analgésicos como o paracetamol e a dipirona. A prescrição de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), como a aspirina deve ser limitada, pois a sua utilização predispõe ao sangramento como ocorre na dengue. Os corticoides não devem ser realizados por conta das reações após o tratamento, portanto

seu uso é limitado em casos de encefalopatia e neurite (SIMON et al., 2015) (DA CUNHA; TRINTA, 2017).

Quando o período agudo se estende por meses, alguns pacientes podem beneficiados com o uso de corticoides e AINEs nos casos de artralgia e tendinite, na fase subaguda decorrente da infecção por CHIKV. Se a doença evoluir, pode acarretar a artrite crônica causada pelo vírus que dá nome a fase conhecida como reumatismo inflamatório crônico pós-CHIKV onde o tratamento tem como alvo evitar a destruição óssea e a dor. As escolhas medicamentosas são corticoides, AINES, sulfasalazina (SSZ), leflunomida, hidroxicloroquina (HCQ), metotrexato (MTX) e biológicos (SUTARIA; AMARAL; SCHOEN, 2018).

O MTX é utilizado normalmente na artrite persistente por mais de três meses. Atua no bloqueio do metabolismo das purinas e pirimidinas e diminui a ação inflamatória dos linfócitos, neutrófilos, células dendríticas e macrófagos/monócitos. Assim, apesar de não estar completamente estabelecido seu papel, parece ter efeito anti-inflamatório, tendo como alvos TNF- α , (IL)-1, IL-2, IL-6 e IL-8. Sabe-se que IF- α , IL-1-IL-6 e IL-17 são consideradas marcadores da doença erosiva e osteoclastogênese, tanto na CHIKV quanto na AR (KENNEDY AMARAL PEREIRA; SCHOEN, 2017).

Durante o período crônico, em casos de sinovite e tenossinovite, a terapêutica é composta por drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs) como MTX, HCQ e a SSZ (PATHAK; MOHAN; RAVINDRAN, 2019). Adalimumab, infliximab e etanercept são indicados no tratamento da AR. Estes medicamentos fazem parte da terapia biológica que tem como objetivo inibir o TNF- α e diminuir a atividade da doença (KIEVIT et al., 2007).

Apesar da febre chikungunya ser uma patologia distinta da AR e EpA, o seu comportamento é semelhante, então os agentes biológicos utilizados na AR e EpA podem servir como escolha terapêutica durante o tratamento no estágio crônico da febre chikungunya. Hoje, o Sistema Único de Saúde (SUS) libera o uso dos inibidores de TNF- α para EpA, AR, artrite juvenil idiopática, artrite psoriática e nas doenças inflamatórias intestinais (MARQUES et al., 2017b).

2.3 EPIGENÉTICA

O primeiro conceito de epigenética foi descrito por Conrad Waddington no ano de 1942 e teve como definição “Ferramentas moleculares que eram capazes de transmitir a informação genética culminando em características fenotípicas” (TRONICK; HUNTER, 2016). Mais recentemente, o termo foi conceituado como “Alterações no fenótipo que não modificam a sequência do DNA” (PORTELA; ESTELLER, 2010).

Em cada célula humana, o DNA tem 2m de extensão sendo empacotado com proteínas conhecidas como histonas e compactada em, aproximadamente, 2 milhões de vezes. As histonas ditas como essenciais, ou os suas variantes, são do tipo H1, H2A, H2B, H3 e H4. O nucleossomo, subunidade fundamental da cromatina, é formado por meio do DNA envolto em um octâmero com dois tipos ou variantes de histonas (H2A, H2B, H3 e H4) fixado na H1 e representa a unidade de formação da cromatina (DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009).

A informação genética propriamente dita pode ficar isenta de modificações, porém, quando surgem alterações químicas no DNA, em proteínas fundamentais para duplicação e nas histonas, pode haver alteração na expressão gênica (O'DONNELL; LANGSTON; STILLMAN, 2013) (SU; PILLUS, 2013).

As modificações ocorridas devido a epigenética são responsáveis pelo controle e regulação estrutural da cromatina. Podem facilitar o processo de transcrição na cromatina descondensada, também conhecido como eucromatina, e dificultar a transcrição na heterocromatina, quando ela se encontra no seu estado mais condensado (WARREN; MACIVER, 2019).

Dentre as enzimas responsáveis pela inclusão ou retirada dos grupamentos acetil e metil nos resíduos de histona estão: histonas desacetilases (HDACs), histonas acetil transferases (HATs), lisina demetilases (KMDs) e lisina metiltransferases (KMTs) as quais podem alterar o domínio central das histonas (H3, H4, H2Ae H2B) e os aminoácidos encontrados na região amino terminal (-NH₂) (FAROOQI et al., 2019).

As alterações epigenéticas pós-transcricionais reversíveis que ocorrem na cromatina como desacetilação e acetilação podem modificar a expressão gênica e comprometer o funcionamento e homeostase do organismo. Essas modificações podem ser causadas devido as infecções por arbovírus e, como consequência, alterar a patogenicidade da doença (DE AGUIAR et al., 2019).

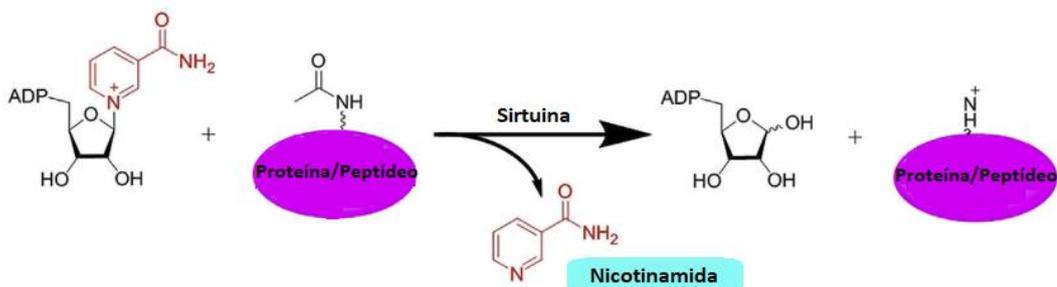
2.3.1 DESACETILAÇÃO DE HISTONAS

As HDACs possuem função de retirada do grupamento acetil de proteínas do tipo histonas ou não-histonas alterando o estado de acetilação. A desacetilação de proteínas é considerada uma modificação pós-translacional que acarreta mudança na carga de superfície proteica, regulação ou interação entre proteínas. São classificadas em quatro tipos: as classes I, II e IV são dependentes de zinco e classe III as quais pertencem às sirtuínas que têm o NAD⁺ (Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina Oxidada) como cofator (WANG et al., 2019a).

HDACs atuam em complexos proteicos promotores impedindo o processo de transcrição, assim ocorre a compactação da cromatina e, como resultado, o silenciamento gênico (WANG et al., 2018b). Para efetuar a desacetilação, dependem do zinco como cofator onde produzem acetato através da reação de hidrólise do acetil modificado. As SIRTs atuam com o NAD⁺ associado ao nicotinamina ribosil, realizam a clivagem e passagem do grupamento acetil, encontrado nas proteínas, para o seu cosubstrato com produção de nicotinamida (SACCONNAY; CARRUPT; NURISSO, 2012) (**Figura 5**).

A hiperacetilação tem como consequência o aumento da transcrição, enquanto na diminuição da acetilação de histonas o DNA (ácido desoxirribonucleico) se mantém compactado dificultando o acesso aos fatores de transcrição. Nos resíduos básicos de histonas de carga positiva, a presença do grupamento acetil neutraliza a carga, ocorrendo quebra da ligação as histonas entre o grupamento fosfato negativo do DNA (SELVARAJ; KRISHNASWAMY; DEVASHYA, 2013).

Figura 5: Mecanismo de desacetilação das Sirtuínas.



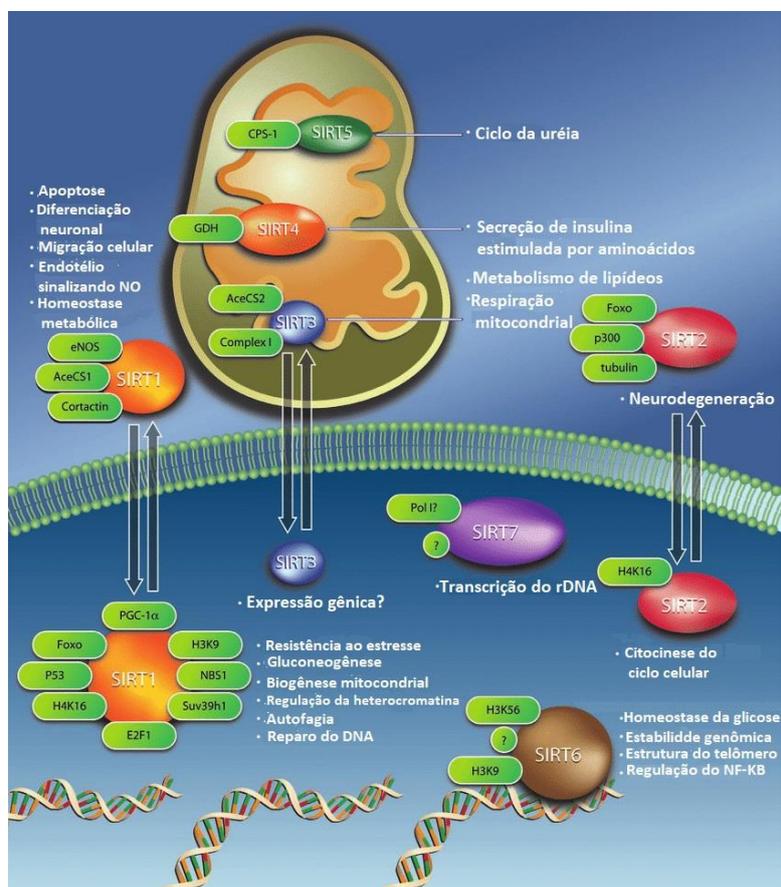
Fonte: WANG et al., 2019. Adaptado pelo autor.

2.4 SIRTUÍNAS

As sirtuínas são enzimas descobertas por meio da homologia que possuem com o gene da informação regulatória 2 (Sir2) presente no *Saccharomyces cerevisiae*, têm função de histona desacetilases sendo responsáveis por causar silenciamento gênico, são dependentes do NAD⁺ e também foram encontradas em *Caenorhabditis elegans* *Drosophila melanogaster*, ratos e humanos (NOGUEIRAS et al., 2012).

São consideradas enzimas com alto grau de conservação que atuam contra vírus de RNA e DNA. Possuem atividade histonas desacetilases, onde o radical acetil é retirado do resíduo de lisina. Até os dias de hoje, em mamíferos, foram descritas sete isoformas de sirtuínas (SIRT1 a SIRT7) e apresentam localizações subcelulares: SIRT1 e SIRT2 são consideradas nucleares e citoplasmáticas, enquanto a SIRT3, SIRT4 e SIRT5 são mitocondriais, a SIRT6 é encontrada no núcleo e a SIRT7 é nucleolar (**Figura 6**) (HALL et al., 2013) (MOSTOSLAVSKY; ESTELLER; VAQUERO, 2010).

Figura 6: Localização subcelular das Sirtuínas.



Fonte: MOSTOSLAVSKY; ESTELLER; VAQUERO, 2010. Adaptado pelo autor.

Existem mais de 100 estruturas descritas para as SIRT1s. Elas possuem muitos substratos, ligantes e produtos. Do ponto de vista viral, as sirtuínas têm um papel fundamental no controle da expressão gênica viral e do hospedeiro. Foi descrita a ação de desacetilação da SIRT1 na proteína Tat para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ocasionando a transativação do vírus (BUDAYEVA; ROWLAND; CRISTEA, 2015).

2.4.1 SIRTUÍNAS NUCLEARES E CITOPLASMÁTICAS

2.4.1.1 O PAPEL DA SIRTUÍNA 1

Dentre todas as sirtuínas descritas, a SIRT1 é a mais estudada. Em humanos, possui um total de 747 aminoácidos, com um domínio catalítico central que compreende aproximadamente 240 aminoácidos. A SIRT1 já foi identificada no núcleo e citoplasma celular (CANTÓ; AUWERX, 2012), sendo responsável por desacetilar mais de 50 proteínas do tipo não histonas, além das histonas H3, H4 e H1, tais como fatores de transcrição, DNMT1 (DNA metiltransferase 1) e proteínas envolvidas no reparo do DNA. Assim, a diminuição da expressão de SIRT1 pode levar à elevação do dano ao DNA (LEE et al., 2019).

Isso explica sua atuação em diversos mecanismos celulares como: proliferação, resposta ao estresse, carcinogênese, apoptose e reparo. A SIRT1 desacetila genes como NF- κ B (Fator Nuclear Kappa β), Ku70, p53 e o FOXO (Fator de transcrição FOXO). E também está envolvida no controle na replicação por meio da ativação do fator de transcrição AP-1 do HBV (REN et al., 2014).

Foi visto que a SIRT1 possui um papel na osteoartrite, a principal causa de dor em adultos, que é resultante da destruição da cartilagem e de estruturas que participam da sua constituição como os ligamentos, cápsula, músculos, articulação, sinóvia e menisco. Na cartilagem, existem células conhecidas como condrócitos que têm como função produção e direcionamento da matriz extracelular. A diminuição da expressão de SIRT1 em paciente com osteoartrite parece levar a evolução da doença, enquanto o aumento eleva a produção de agregam e colágeno do tipo II. O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é

responsável pela clivagem da SIRT1 que também tem expressão em condrócitos (DENG et al., 2019).

Na artrite reumatoide (AR), a SIRT1 se destaca em relação aos níveis de IL-6 (Interleucina 6) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) (GABAY; CLOUSE, 2016). Nas viroses com características artritogênicas, como na febre chikungunya, também há aumento da citocinas inflamatórias TNF- α , IL-6 IL-1 β favorecendo a inflamação e destruição tecidual (KENNEDY AMARAL PEREIRA; SCHOEN, 2017).

2.4.1.2 O PAPEL DA SIRTUÍNA 2

A SIRT2 pode ser encontrada no núcleo ou no citoplasma celular e possui uma unidade catalítica do domínio central formada por 304 aminoácidos (FINNIN; DONIGIAN; PAVLETICH, 2001). Tem como função primária desacetilar o resíduo H4 e, posteriormente, o H3 (VAQUERO et al., 2006). A ação de desacetilação foi estudada em genes como o NF- κ B na subunidade p65 e com a proteína de interação do receptor 1 (RIP-1). Esta molécula tem sido relacionada com a regulação do ciclo celular, dano ao DNA, resistência celular, câncer e infecção (MENDES; LELIS; SANTOS, 2017).

Estudos demonstram a ação da SIRT2 no estresse oxidativo por meio do equilíbrio homeostático do NADH que tem sua produção regulada pela fosfoglicerato mutase 2 (PAGM2). A reação acontece pela via das pentoses que tem como principal enzima a glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). Assim, é sabido que o mecanismo de desacetilação da SIRT2 eleva os valores de NADPH (Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida) sob condições de maior estresse oxidativo, através do mecanismo de ativação da G-6PD e PAGM2 (WANG et al., 2019b).

O controle da inflamação da artrite tem sido correlacionado com os níveis de expressão gênica da SIRT2 através da desacetilação ocorrida na subunidade p65 do NF- κ B. Desta forma, a elevação da SIRT2 leva à diminuição dos valores de TNF- α , ativado pela via do NF- κ B, e de genes que estão envolvidos o desencadeamento da artrite como MCP-1, MMP-9, MMP-13, IL-6 e IL-1 β (SU; PILLUS, 2013).

Na infecção pelo CHIKV, o sistema inflamatório é responsável pela expulsão do vírus, sendo a carga viral relacionada as concentrações de IL-1RA, IL-2, IL-6, IL-12, IL-

18, IL-18P, IF- α , MCP-1/CCL-2 e IP-10/CXCL-10 (DUPUIS-MAGUIRAGA et al., 2012).

2.4.2 SIRTUINA MITOCONDRIAL

2.4.2.1 O PAPEL DA SIRTUÍNA 3

Possui localização mitocondrial e representa a maior atividade desacetilase dentre as demais SIRTIS mitocondriais, SIRT4 e SIRT5, e tem impacto no controle do metabolismo (SACCONNAY; CARRUPT; NURISSO, 2012) através da desacetilação dos resíduos acetil-lisina 9 e acetil lisina-16 das histonas H3 e H4, respectivamente (CHENG et al., 2018).

Níveis reduzidos de SIRT3 influenciam doenças cardiovasculares, neurológicas, perda auditiva em idade avançada, e câncer. A SIRT3 é relacionada a biologia e dinâmica mitocondrial, oxidação da glicose e ácidos graxos e efeitos antioxidantes, pois a SIRT3 desacetila o isocitrato desidrogenase 2 (IDH2), enzima pertencente ao ciclo do ácido tricarboxílico, que tem como função produção do NADH. Assim, através da desacetilação na IDH2, a SIRT3 eleva os níveis de NADH permitindo o escape das espécies reativas de oxigênio (WU et al., 2019).

Em condições mitocondriais diminuídas, a SIRT3 contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina, doenças neurodegenerativas e câncer, situações que elevam os níveis de ROS. Há modificação da homeostase celular por meio da desacetilação da superóxido desmutase 3 e da cadeia transportadora de elétrons, visando aumento da produção do ATP e diminuição das espécies reativas de oxigênio (ROS) além de impulsionar a transcrição do antioxidante do FOXA3 (VAN DE VEN; SANTOS; HAIGIS, 2017).

Os níveis de ROS e da lesão celular estão elevados em pacientes portadores do HBV onde a replicação do vírus, por meio da proteína viral HBx, é responsável pelo estímulo ao estresse oxidativo, e diminuição dos níveis de expressão da SIRT3, que tem papel reverso. Desta forma, foi possível estabelecer que a SIRT3 influencia na instabilidade gênica, morte celular, taxa de mutações no DNA e alterações epigenéticas (REN et al., 2016).

Em condições inflamatórias e dano biomecânico, ocorre a produção ROS principalmente nas mitocôndrias. Essa deve ser a dinâmica na osteoartrite, uma vez que os níveis de ROS se elevam, enquanto a SIRT3 presente na cartilagem deveria reverter este processo através da sua ação antioxidante. No entanto, a SIRT 3 estando diminuída durante o estresse metabólico, propicia o desequilíbrio energético e da homeostase. O trabalho em ratos observou que a superóxido dismutase 2 (SOD2), uma enzima com potencial oxidante influenciada pela interleucina 1β , NF- $\kappa\beta$ e pelo fator 2α indutor de hipóxia 2α (HIF- 2α) é controlada pela SIRT3 e quando a SOD2 se encontra em condições elevadas, estimula o desenvolvimento da osteoartrite (FU et al., 2016).

2.4.2.2 SIRTUÍNA NUCLEOLAR

2.4.2.3 O PAPEL DA SIRTUÍNA 7

Esta sirtuína é encontrada no nucléolo e tem controle na expressão gênica uma vez que desacetila a H3K18, diminuindo o processo de transcrição. Alguns trabalhos avaliaram o seu papel na resposta ao estresse celular, controle do metabolismo lipídico, glicolítico, biogênese ribossomal e mitocondrial e dano ao DNA (YAN et al., 2018).

Estudos *in vitro* demonstraram que a SIRT7 retira os ácidos graxos de cadeia longa dos grupos acil de forma mais efetiva, se comparado ao grupo acetil, e que o RNA representa um estímulo para que a SIRT7 atue (TONG et al., 2017).

Além de controlar o metabolismo hepático lipídico através da via ubiquitina proteossoma. A SIRT 7 pode atuar na transcrição da RNA polimerase I através da sua ativação, sendo a inibição do gene responsável por bloquear a apoptose e proliferação celular (Z, 2015).

O mecanismo epigenético de desacetilação da SIRT7 no resíduo 18 de lisina na histona H3 está envolvido na biologia do câncer. No carcinoma hepatocelular, a expressão de SIRT7 se apresenta aumentada, estando sob regulação de microRNAs como miR-125a-5p (responsável por diminuir a formação de novos vasos, proliferação celular e progressão para metástase) e miR-125b (impede a proliferação celular e não possui relação com prognóstico) que controlam os níveis de expressão gênica da SIRT7 (KIM et al., 2013).

Assim, de acordo o conhecimento do papel das SIRTs em infecções virais e a ausência de estudos dos genes na febre chikungunya, é necessário o entendimento para a compreensão mais efetiva da doença.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o perfil de expressão gênica das SIRT1, SIRT2, SIRT3 e SIRT7 e as suas relações com a fisiopatologia em pacientes com febre chikungunya.

3.2 Objetivos Específicos

1. Analisar a expressão dos genes SIRT1, SIRT2, SIRT3 e SIRT7 em amostras de sangue periférico em pacientes com febre chikungunya;
2. Selecionar os pacientes com e sem sintomatologia para febre chikungunya e analisar a expressão da SIRT1, SIRT2, SIRT3 e SIRT7;
3. Investigar a relação dos níveis de expressão das SIRTs com dados clínicos obtidos nos pacientes com febre chikungunya.

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS

Um total de cinquenta e duas amostras de sangue periférico foram avaliadas no estudo. Quarenta e três amostras foram coletadas no ano de 2016 durante o surto ocorrido na cidade de Arara, Paraíba. Dentre as quais 38 amostras eram de pacientes IgM positivos para o CHIKV, enquanto cinco amostras eram IgM negativas para o vírus. Nove amostras saudáveis coletadas no setor de neurologia do Hospital das Clínicas (HC-UFPE), sem sorologia para CHIKV, foram utilizadas como controles negativos e calibradores para as análises de expressão gênica.

Todas as amostras avaliadas se encontravam de acordo com o controle de qualidade estabelecido por meio dos valores obtidos da β -actina. As amostras foram coletadas em tubos de EDTA 4mL K3 EDTA (BD Vacuette®) com adição de RNA later para preservação do material genético. Para coleta, foi realizado um questionário com as informações clínicas.

O projeto possui Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco aprovado sob nº 1.815. 581. Todos os participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido concordando com os objetivos do estudo (**ANEXO A**).

4.2 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA

O teste sorológico *ELISA* para pesquisa de IgM e IgG foi realizado para os seguintes arbovírus: Dengue, ZIKA e Chikungunya pela equipe do laboratório de virologia do LIKA através do kit da EUROIMMUM.

4.3 PURIFICAÇÃO DO RNA

A extração do RNA foi realizada através do kit Maxwell 16 LEV simplyRNA Blood Kit (Promega). Para cada extração foi utilizada uma alíquota de 500 μ L, sendo metade do volume contendo RNA later. Em cada alíquota foram adicionados 1500 μ L da

solução de lise celular, em seguida foram incubadas a temperatura ambiente durante 10 minutos e homogeneizadas de 2 a 5 vezes.

Posteriormente, centrifugadas por 300g durante 15 minutos à temperatura de 20°C, após a centrifugação o sobrenadante foi retirado minuciosamente sem destruição do pellet. Foram adicionados ao sobrenadante 200µL da solução de homogeneização 1-thioglycerol e homogeneizadas em vórtex com o objetivo da completa ressuspensão do pellet. Na etapa seguinte, foram adicionados 200µL do tampão de lise celular e 25µL da proteinase K com passagem no vórtex por 20 segundos. As amostras foram incubadas novamente em temperatura ambiente por 10 minutos. Enquanto isso, os cartuchos foram preparados com 10µl da solução de DNase I, 50µL de *RNase-free water* no tubo eluente e adição do lisado.

Após a conclusão da etapa de extração, foi realizada a pureza e concentração do material através da quantificação no NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, DE*) onde 1µL de água foi usada como branco no espectrofotômetro e 1µL de cada amostra. Os parâmetros utilizados para a quantificação foram as razões 260/280 com valores próximos de 2,0; enquanto 260/230 apresentavam resultados entre 2,0-2,2. As amostras de RNA foram armazenadas em ultra-freezer até a realização da técnica de qPCR.

4.4 CONFECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA COMPLEMENTAR

O processo reverso de RNA para síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizado através do *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (QIAGEN). Na primeira etapa da reação foram utilizados 3µL do RNA e 0,5 µL *gDNA Wipeout Buffer* para eliminação do DNA genômico. Após a mistura, o tubo foi incubado por 2 minutos à 42°C no termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, foi realizada a segunda etapa de reagentes com 0,25µL de *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 1µL de *Quantiscript RT Buffer* e 0,25µL de *RT Primer Mix*, obtendo o volume final de 5µL e incubação por 15 minutos à 42° e 3 minutos à 95°C.

O cDNA foi diluído em 45 µL de água e quantificado através do NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, DE Scientific*). Os parâmetros utilizados para a quantificação foram 260/280 aproximadamente 1,8; enquanto 260/230 valores entre 2,0-2,2. A concentração do cDNA estabelecida para as análises foi de 100ng, se superiores, foram diluídas.

4.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

A reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi realizada pelo sistema StepOne Real-Time PCR-System (Applied Biosystems, Foster City, CA) com o kit *GoTaq® qPCR Master Mix* (PROMEGA). Foram utilizados com volumes fixos, 5µL SYBR e 1µL de CXR (Carboxy-X-Rhodamine). A quantidade primer utilizado dependia das condições. Nos primers do tipo *forward/reverse* eram usados 0,1µL ou 0,1µL de cada se estiverem em tubos separados, totalizando 0,2µL. Assim, o volume de água varia em 2,7µL e 2,8µL para completar o volume de 9µL de reagentes. Por fim, 1µL da amostra de cDNA é adicionada totalizando o volume final da reação com 10µL. Para ciclagem foi utilizado o protocolo *fast* com 1 ciclo inicial de 95°C por 2 minutos para ativação da *Taq DNA polimerase*, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 3 segundos) e anelamento (60°C por 30 segundos). Após esses ciclos, foi realizada a curva de *melting* para análise dos produtos inespecíficos. O gene β-actina foi utilizado como referência para a normalização da quantificação dos dados de expressão e como controle de qualidade nas amostras selecionadas. A sequência do primer de β-actina utilizado é CCTGGCACCCAGCACAAT/GCCGATCCACACGGAGTACT. Os números de identificação dos primers são: SIRT1(Hs.PT.58.40790669), SIRT2 (Hs.PT.58.38760683), SIRT3 (Hs.PT.58.22633153.g) e SIRT7 (Hs.PT.58.223299).

As análises de cada amostra foram realizadas em duplicatas e a água ultrapura usada como controle negativo. Os desvios entre as diferenças dos Cts (ciclo *threshold*) foram considerados até 0,5. Os cálculos de expressão gênica em cada amostra foram realizados pela metodologia de ΔCt e ΔΔCT (**Tabela 1**). Para o cálculo de expressão relativa, foi possível utilizar a metodologia do $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1: Fórmulas utilizadas para cálculo de ΔCT e ΔΔCT.

ΔCT=	Ct médio gene de estudo – Ct médio gene de referência
ΔΔCt =	ΔCt grupo doente - ΔCt grupo saudável

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos dados foram realizadas através do software *Graph Pad Prism* versão 8.0.1 (GraphPad). Foi efetuada a normalidade para determinar o padrão amostral através do *Shapiro-Wilk*. O teste ANOVA foi utilizado para analisar as diferenças entre os níveis de expressão entre os grupos em relação ao grupo controle (ΔCt , $\Delta\Delta\text{Ct}$ e $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$), nas análises paramétricas. O teste-T, também paramétrico, avaliou os determinados grupos. Quando havia comportamento amostral não paramétrico, foi aplicado o Kruskal-Wallis para comparar os grupos e Mann-Whitney para as análises determinadas.

Os valores de $p < 0.005$ foram considerados significativos. O $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ foi calculado com o grupo controle tratando-se do grupo saudável. O coeficiente de correlação (r) foi calculado entre a expressão dos genes, considerando a correlação fraca quando $0 < r > 0,3$; regular quando $0,3 < r > 0,7$; e forte quando $0,7 < r > 1$. Também foram realizadas análises de regressão linear para avaliar a correlação entre a expressão dos genes e o valor do coeficiente de determinação (R^2) foi determinado a fim de avaliar o relacionamento entre os genes avaliados.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Duas amostras do grupo IgM⁺ que apresentaram curva de *melting* fora do padrão estabelecido na expressão de SIRT2 foram excluídas do estudo. A categoria idade não foi avaliada em todos os pacientes, pois essa informação não se encontrava na ficha clínica de um paciente.

Dos 38 pacientes da pesquisa com febre chikungunya, 32 são do sexo feminino (84,21%) e 6 do sexo masculino (15,78%). A mediana de idade foi 64 anos. Para o grupo controle, formado por nove pacientes, o valor da mediana foi 22 e cinco pacientes pertenciam ao sexo feminino.

Para a análise de acordo com os grupos etários, os pacientes CHIKV IgM positivos foram divididos em três grupos. O grupo A (0 a 39 anos,) grupo B (40 a 59 anos) e o grupo C representado pacientes com 60 ou mais (**Tabela 2**).

Tabela 2: Grupo etário, sexo e clínica dos pacientes CHIKV IgM positivos.

Grupo etário	Grupo A (0 a 39 anos) (n=10)	Grupo B (40 a 59 anos) (n=13)	Grupo C (60 ou mais) (n=14)
Sexo			
Feminino	7 (70%)	11 (84,61%)	13 (92,85%)
Masculino	3 (30%)	2 (15,38%)	1 (7,14%)
Clínica			
Febre alta	7 (70%)	13 (100%)	9 (64,28%)
Artralgia	9 (90%)	12 (92,30%)	13 (92,85%)
Edema	5 (50%)	9 (69,23%)	11 (78,57%)
Exantema	5 (50%)	3 (23,07%)	3 (21,42%)
Cefaleia	6 (60%)	10 (76,92%)	9 (64,28%)

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

5.2.1 Análises das Sirtuínas

5.2.1.1 Nucleares e citoplasmáticas

Os dados descritos abaixo (**Tabela 3**) apresentam informações clínicas e resultados de expressão da SIRT1 e SIRT2. Em um paciente não foi possível estabelecer a idade.

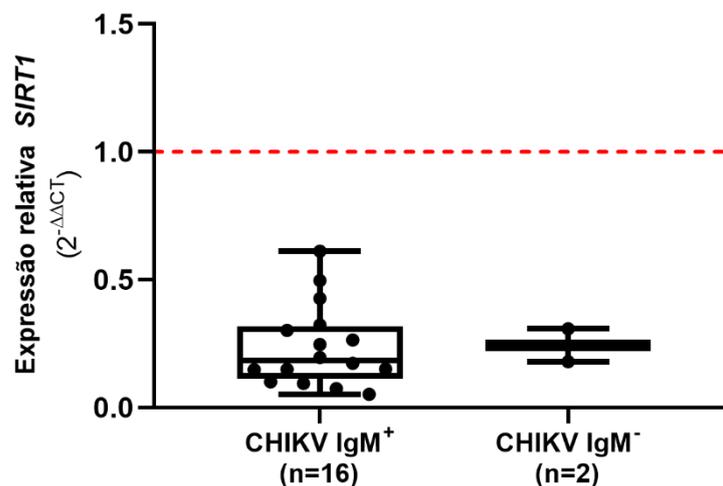
Tabela 3: Dados clínicos e expressão gênica da SIRT1 e SIRT2.

Gene expresso	SIRT1	SIRT2
	16/38 (42,10%)	26/36 (72,22%)
Sexo		
Feminino	14/32 (43,75%)	22/30 (73,33%)
Masculino	02/06 (33,33%)	04/06 (66,66%)
Faixa etária		
0 a 39 anos	04/10 (40%)	06/10 (60%)
40 a 59 anos	07/13 (53,84%)	09/12 (75%)
60 ou mais	04/14 (28,57%)	10/13 (76,92)
NS/NR	0/01	0/01
Clínica		
Febre alta		
Sim	14/30 (46,66%)	22/29 (75,86%)
Não	02/08 (25%)	04/07 (57,14%)
Artralgia		
Sim	14/34 (41,17%)	22/32 (68,75%)
Não	02/04 (50%)	04/04 (100%)
Exantema		
Sim	04/11 (36,36%)	06/11 (54,54%)

Não	12/27 (44,44%)	20/25 (80%)
Cefaleia		
Sim	11/25 (44%)	18/24 (75%)
Não	05/13 (38,43%)	08/12 (66,66%)
Edema		
Sim	10/25 (40%)	16/23 (69,56%)
Não	06/13 (46,15%)	10/13 (76,92%)

No grupo de pacientes com febre chikungunya 42,10% expressou o gene SIRT1. Para o grupo dos pacientes CHIKV IgM positivos, 16 pacientes apresentaram a expressão de SIRT1, enquanto no grupo CHIKV IgM negativos e com histórico de arboviroses apenas dois pacientes expressaram expressão. Não houve diferença estatística significativa $p=0,9633$ entre os grupos. Os dois grupos, CHIKV IgM positivos e CHIKV IgM negativos, se encontram em *down regulated* (**Figura 7**). O grupo controle foi formado por nove pacientes onde todos apresentaram a expressão do gene.

Figura 7: Expressão relativa de SIRT1 nos grupos CHIKV IgM⁺ e IgM⁻.



Legenda: O tracejado em vermelho representa o limiar para o estabelecimento da regulação gênica (*up regulated* ou *down regulated*).

De acordo com as características clínicas de cada doente, no grupo de pacientes com febre CHIKV o fator idade não obteve diferença significativa $p=0,8360$. Em relação ao sexo, também não houve diferença significativa entre os níveis de expressão ($p=0,0987$). Porém, dentre os 14 pacientes (87,5%) pertencem ao sexo feminino e dois ao sexo masculino. Das 14 pacientes do sexo feminino, 6 (42,85%) têm como sintomas em comuns artralgia, febre alta e fadiga. Enquanto os dois possuem clínica de febre alta, dor no corpo, cefaleia, artralgia, edema e formigamento.

Os sintomas como artralgia (**Figura 8**), febre alta (**Figura 9**), fadiga (**Figura 10**), não apresentaram diferença significativa.

Figura 8: Expressão relativa de SIRT1 em pacientes CHIKV IgM⁺ com e sem artralgia.

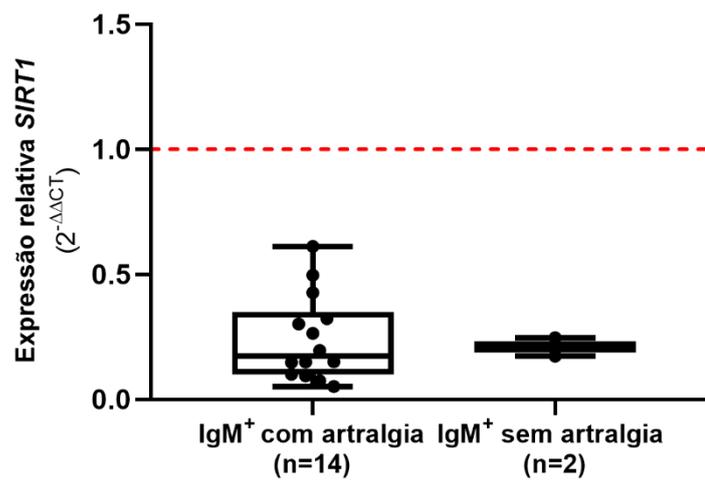


Figura 9: Expressão relativa de SIRT1 em pacientes CHIKV IgM⁺ com e sem febre alta.

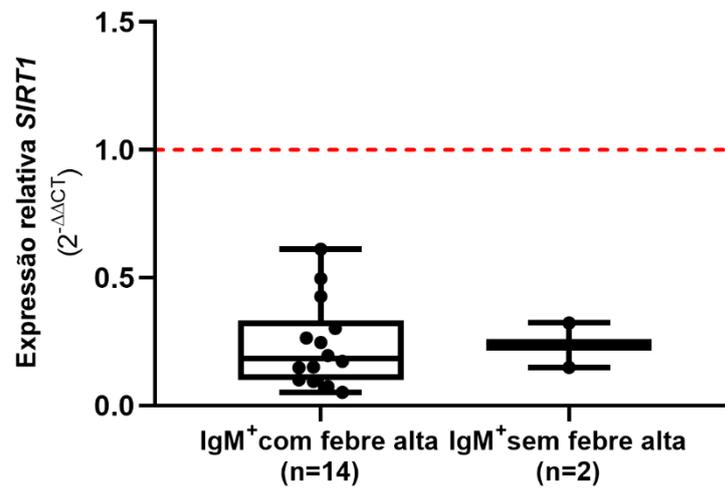
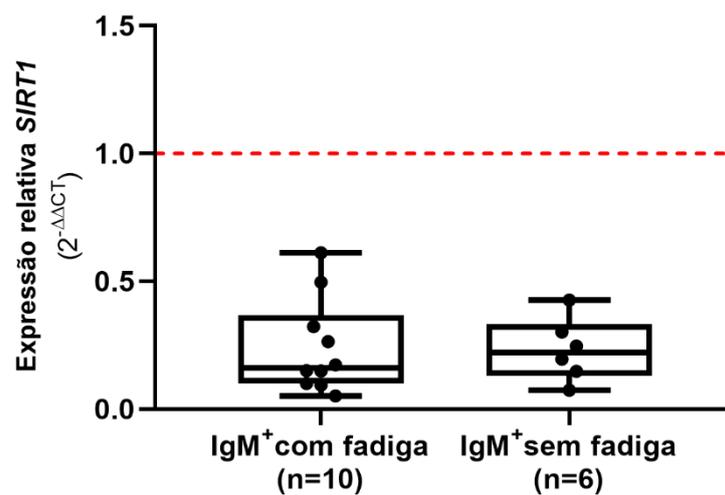


Figura 10: Expressão relativa de SIRT1 em pacientes CHIKV IgM⁺ com fadiga e sem fadiga.

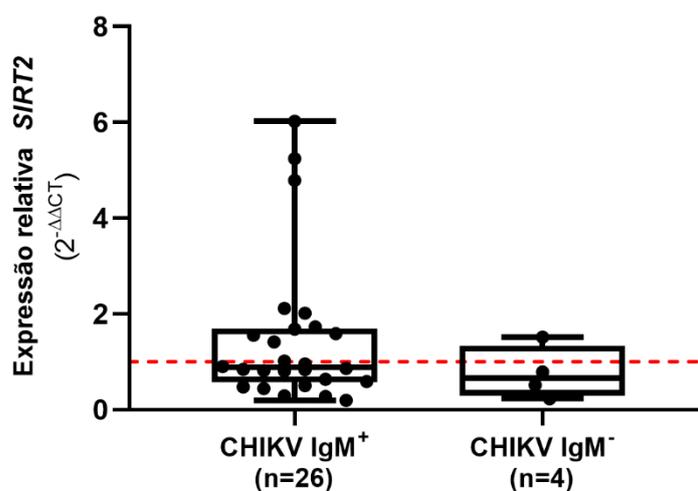


No grupo de pacientes CHIKV IgM positivos para SIRT2 foram avaliados 36 pacientes, onde dois foram excluídos por seus dados serem inconsistentes (curva de *melting* fora do valor estabelecido). Houve expressão em 72,22% do grupo SIRT2.

No grupo de pacientes CHIKV IgM negativos e com histórico de arboviroses, quatro expressaram a SIRT2, porém não houve significância estatística entre os grupos os dois grupos ($p=0,2448$) (**Figura 11**). O grupo controle foi formado por nove pacientes e todos eles apresentaram a expressão do gene.

Nos pacientes CHIKV IgM positivos, dez pacientes se encontram *up regulated*, enquanto no grupo CHIKV IgM negativos apenas um paciente. Assim, o grupo de pacientes com febre chikungunya pode apresentar aumento da expressão de até seis vezes maior do que grupo sem a doença. Dos dez pacientes do grupo CHIKV IgM positivos que se encontram em *up regulated*, 80% apresentam artralgia e fadiga. Três dos dez se destacam como *outliers* onde todos apresentam febre alta e fadiga.

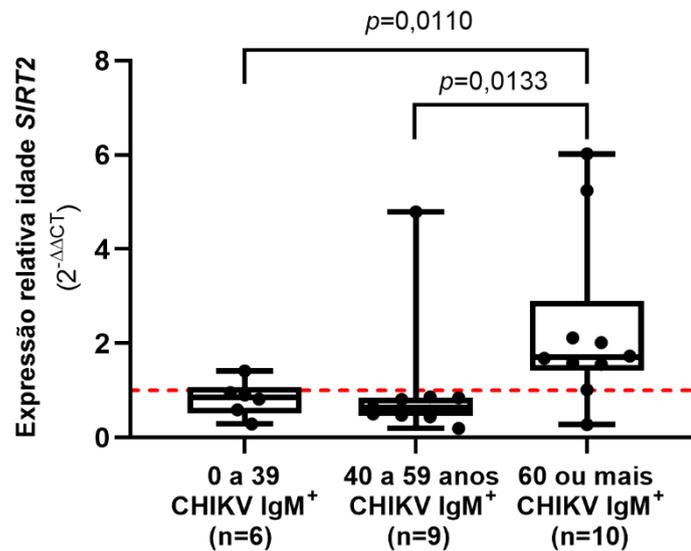
Figura 11: Expressão relativa de SIRT2 nos grupos CHIKV IgM⁺ e CHIKV IgM⁻.



O fator idade obteve estatística significativa entre os grupos de 0 a 39 anos e ≥ 60 anos sendo o valor de $p=0,0110$; e nos grupos de pacientes com 40 a 59 anos e ≥ 60 anos com $p=0,0133$ (**Figura 12**). No primeiro grupo (0 a 39 anos) um paciente se encontrou em *up regulated*, enquanto no grupo etário ≥ 60 anos oito pacientes são *up regulated*. Os grupos têm como sintomatologia em comum a artralgia.

Em relação ao grupo enquadrado na faixa etária entre 40 a 59 anos, apenas um paciente se encontra em *up regulated*. Houve diferença significativa entre os três grupos etários ($p=0,0120$).

Figura 12: Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM⁺ de acordo com os grupos etários.



Em relação ao sexo, no grupo CHIKV IgM positivos com o total de 26 pacientes, eram 22 mulheres (84,61%) expressaram a SIRT2, porém não houve significância estatística entre os sexos ($p=0,1501$). Através dos achados clínicos não foi observada diferença significativa na artralgia (**Figura 13**), febre alta (**Figura 14**), fadiga (**Figura 15**).

Figura 13: Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM⁺ com e sem artralgia.

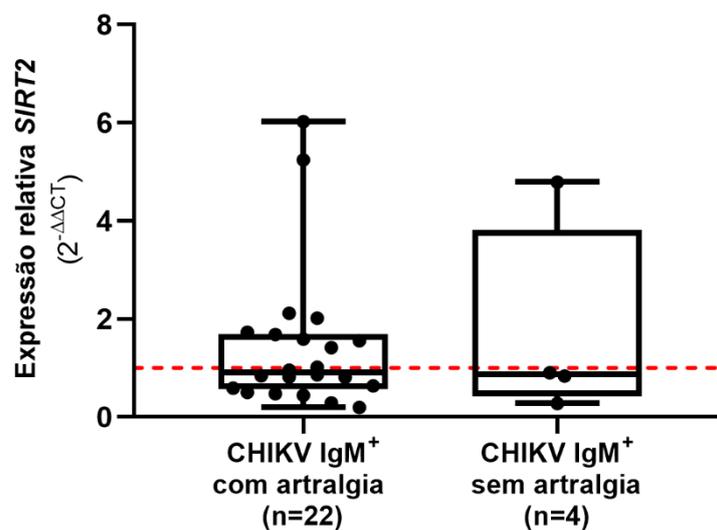


Figura 14: Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM⁺ com e sem febre alta.

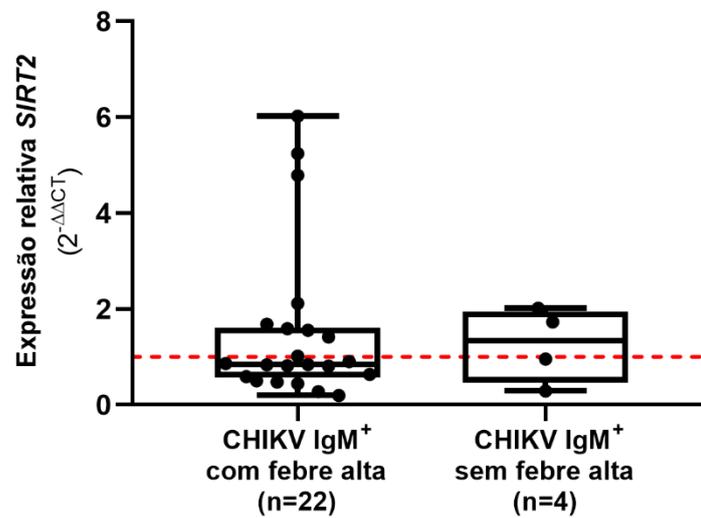
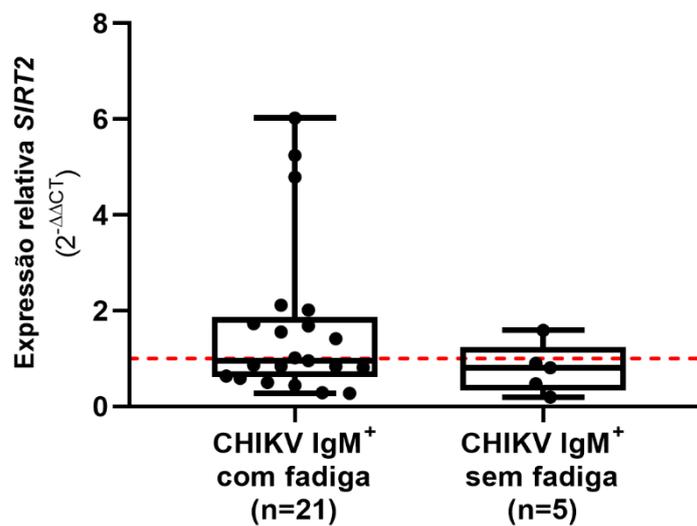


Figura 15: Expressão relativa de SIRT2 em pacientes CHIKV IgM⁺ com e sem fadiga.



5.2.1.2 Sirtuína mitocondrial

Para a análise da SIRT3 não foi possível realizar a análise de expressão relativa, pois apenas três amostras CHIKV IgM positivos (7,89%) expressaram. Um paciente se encontrava em *up regulated*. As três amostras que expressaram são do sexo feminino, duas com idade ≥ 60 anos e uma na faixa etária entre 40 a 59 anos.

Em relação a sintomatologia, 100% dos pacientes apresentaram febre alta com artralgia e fadiga, a presença do exantema ocorreu em um paciente e o edema em dois doentes. Um paciente apresentou exantema e artralgia. O grupo IgM positivo que não expressou SIRT3 é representado por 35 pacientes dos quais 31 (88,57%) foram acometidos com artralgia. O grupo controle foi formado por nove pacientes onde seis apresentaram expressão do gene. As informações abaixo (**Tabela 4**) descrevem o número de amostras expressas e suas relações clínicas.

Tabela 4: Dados clínicos e expressão gênica da SIRT3.

Gene expresso	SIRT3
	03/38 (7,89%)
Sexo	
Feminino	03/32 (9,375%)
Masculino	0/6
Faixa etária	
0 a 39 anos	0/10
40 a 59 anos	1/13 (7,69%)
60 ou mais	2/14 (14,28%)
NS/NR	0/01
Clínica	
Febre alta	
Sim	3/30 (10%)
Não	0/08
Artralgia	
Sim	3/34 (8,82%)
Não	0/04
Exantema	
Sim	01/11 (9,09%)
Não	02/27 (7,40%)
Cefaleia	
Sim	03/25 (12%)
Não	0/13

Edema	
Sim	2/25 (8%)
Não	01/13 (7,69%)

5.2.1.3 Sirtuína nucleolar

No grupo de CHIKV IgM positivos, quatro pacientes (10,52%) expressaram a SIRT7, todos do sexo feminino. Três estão na faixa etária entre 40 a 59 anos.

As características clínicas demonstraram que a artralgia ocorria em 100%, febre alta, fadiga e edema em três pacientes e não houve presença de exantema. Os pacientes que expressaram apresentaram valores baixos que variaram entre 0,00001 e 0,00021.

O grupo com febre chikungunya obteve valores de expressão em *down regulated* em relação ao grupo controle. O grupo controle foi composto por sete pacientes onde quatro expressaram o gene. Os dados abaixo (**Tabela 5**) descrevem o número de amostras expressas e suas relações com a sintomatologia.

Tabela 5: Dados clínicos e expressão gênica da SIRT7.

Gene expresso	SIRT7
	4/38 (10,52%)
Sexo	
Feminino	4/32 (12,5%)
Masculino	0/06
Faixa etária	
0 a 39 anos	1/10 (10%)
40 a 59 anos	03/13 (23,07%)
60 ou mais	0/14
NS/NR	0/01
Clínica	
Febre alta	
Sim	03/30 (10%)

Não	01/08 (12,5%)
Artralgia	
Sim	04/34 (11,76%)
Não	0/04
Exantema	
Sim	0/11
Não	04/27 (14,81%)
Cefaleia	
Sim	03/25 (12%)
Não	01/13 (7,69%)
Edema	
Sim	03/25 (12%)
Não	01/13 (7,69%)

5.2.2 REGRESSÃO LINEAR ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES

A análise de regressão linear entre as SIRTs citoplasmáticas SIRT1 e SIRT2, realizada em treze amostras, demonstrou ($r=0,06374$; $R^2=0,03884$) que a correlação entre as variáveis é fraca não significativa ($p=0,8319$). Enquanto nas SIRT1 e SIRT7 houve correlação forte com quatro amostras ($r=0,9667$; $R^2=0,9344$) sendo positiva significativa ($p=0,0333$).

Nas SIRT2 e SIRT3, verificou-se correlação positiva regular ($r=0,5029$; $R^2=0,2529$) não significativa em três amostras ($p=0,6645$). Entre as SIRT2 e SIRT7 houve correlação fraca negativa ($r=-0,04378$; $R^2=0,001917$) não significativa com quatro amostras ($p=0,9562$). Dentre as SIRT1 e SIRT3 não foi possível estabelecer correções pelo baixo número de amostras expressas, o mesmo aconteceu para as análises da SIRT3 com SIRT7.

6. DISCUSSÃO

6.1 Sirtuínas nucleares e citoplasmáticas

As citocinas do tipo IL-1, IL-6, IL-17 e TNF- α foram associadas com a severidade da artrite induzida pelo CHIKV e também são responsáveis pelo processo inflamatório na artrite reumatoide (AR), ocasionando a doença erosiva e osteoclastogênese (KENNEDY AMARAL PEREIRA; SCHOEN, 2017). Um trabalho feito com células mononucleares do sangue periférico avaliou o papel da SIRT1 em pacientes controles e portadores da AR, não apresentando correlação. No entanto, houve significância entre SIRT1 e os níveis de TNF e IL-6 em ambos os grupos (WENDLING et al., 2014).

No nosso estudo, entre os pacientes que expressaram SIRT1 as principais queixas foram artralgia e febre alta, mas não encontramos um padrão de expressão gênica da SIRT1 que caracterize o grupo de pacientes com febre chikungunya. Uma proposta interessante seria realização de testes com citocinas entre o grupo com febre chikungunya e os que não apresentam a doença.

A degradação do IRE1 α , o aumento da expressão mTOR, e a autofagia durante o início da infecção pelo CHIKV são prováveis mecanismo para alteração nas vias do estresse celular (JOUBERT et al., 2012). Em cultura de células do condrócitos humanos com osteoartrite, tratados com a homocisteína, estimulou-se a geração de espécies reativas de oxigênio e super óxido dismutase, porém houve elevação da expressão de AMPK, PGC-1 α e SIRT1 o que acarretou a diminuição do estresse oxidativo (MA et al., 2018).

Neste caso, a SIRT1 teria um papel anti-oxidante. Assim, seus níveis diminuídos na febre chikungunya podem favorecer a oxidação ocasionando o aumento da resposta inflamatória.

Metaloproteinases dos tipos 1 e 3 (MMP-1) e (MMP-3) e IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 e TNF- α são consideradas marcadores moleculares ativados no status inflamatório da artrite recorrente da infecção por CHIKV (NINLA-AESONG; MITARNUN; NOIPHA, 2019). Ainda com papel anti-inflamatório, análises moleculares informaram que maiores expressões de SIRT1 em condrócitos tratados com TNF- α diminuem a expressão de MMP1, MMP3 e metaloproteinase 13 (MMP13). Nos condrócitos infectados com adenovírus que tinham maiores expressões de SIRT1, observou-se diminuição da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) (MOON et al., 2013).

O bloqueio da COX-2 é realizado por drogas que exercem efeitos analgésico, anti-pirético e anti-inflamatório na AR, osteoartrite e dor aguda (CURTIS et al., 2019).

Assim, a baixa expressão de SIRT1, como ocorreu no nosso estudo, pode contribuir para a elevação do processo inflamatório através das interleucinas como também o aumento da artralgia, sintoma característico da febre chikungunya.

De acordo com os nossos dados clínicos (**Tabela 2**), a artralgia foi a sintomatologia mais prevalente seguido de: febre alta, cefaleia, edema e exantema. Um estudo na Ilha da Réunion avaliou 307 pacientes que continham características clínicas reumatológicas decorrentes da infecção por CHIKV. A idade média foi de 54 anos e 83,1% dos pacientes estudados são representados pelo sexo feminino. Durante a fase aguda da doença, as principais queixas foram: artralgia (98%), mialgia (41,6%), febre (98%), exantema (66%), edema articular (30%) e cefaleia (17,8%) (BOUQUILLARD et al., 2018). Portanto, artralgia e febre alta são os sintomas mais frequentes nos dois estudos ocorridos entre duas populações completamente distintas.

Em algumas situações, a presença do IgM positivo para o CHIKV pode perdurar por mais de dois anos em pacientes crônicos (ZAID et al., 2018). De acordo do nosso estudo (**Figura 7**), a baixa expressão de SIRT1 nos pacientes IgM positivos não caracteriza a doença na fase ativa, entretanto, é possível que o mesmo perfil de expressão perdure durante a fase crônica por meio da manutenção dos níveis da imunoglobulina de fase aguda.

Na infecção pelo CHIKV, os níveis do MCP-1 produzidos previamente nos macrófagos por meio da IFN- β encontram-se elevados e têm como função o recrutamento monocitário (RUIZ SILVA et al., 2016). Um estudo em ratos avaliou que níveis deficientes de SIRT2 estimulam não apenas a promoção da artrite induzida por colágeno, mas também o grau da doença articular. O trabalho também avaliou por meio das técnicas de ELISA e qPCR, onde ambas concordaram, que na condição patológica referida são aumentados os níveis de citocinas pró-inflamatórias como MCP-1, IL-1 β e TNF- α (LIN et al., 2013).

De acordo com as nossas análises, a expressão aumentada de SIRT2 parece contribuir com a artralgia decorrente da febre chikungunya, onde os grupos de pacientes que apresentaram níveis mais elevados fizeram artralgia como sintoma em comum.

Outro trabalho verificou que a expressão gênica da SIRT2 se encontrava mais elevada em pacientes com AR, porém não havia grandes diferenças entre o grupo controle (KARA et al., 2017a).

Nos nossos resultados não houve diferença estatística significativa entre os níveis de expressão da SIRT2 no grupo de pacientes com febre chikungunya e grupo IgM negativo.

A chikungunya pode ser mais agressiva e chegar a ser letal em grupos de riscos como idade avançada ou pacientes jovens que apresentam doença crônica (DA SILVA JUNIOR et al., 2019). Nas nossas análises de SIRT2 houve diferença significativa com os três grupos etários. Nas análises entre os grupos A (0 a 39 anos) e C (60 ou mais), 14 (16) apresentaram artralgia. Os que pertencem ao grupo B (49 a 59 anos) e C (60 ou mais), 17 (19) fizeram a mesma manifestação clínica. Assim, nossos resultados pioneiros na avaliação da idade e a expressão gênica de SIRT2 em pacientes com febre chikungunya, sugerem que a SIRT2 pode funcionar como um possível marcador molecular entre as faixas etárias referidas acima.

Sabe-se que em recém nascidos e crianças jovens com CHIKV representam um grupo de risco para a progressão de doenças no sistema nervoso central (OKEOMA, 2016). Um trabalho recente avaliou que o bloqueio prévio da SIRT2 poderá ser uma nova proposta de tratamento em pacientes acometidos com doenças neurodegenerativas e de declínio cognitivo relacionada à idade, principalmente o Alzheimer, por meio da neuroinflamação e regulação do receptores do glutamato (DIAZ-PERDIGON et al., 2019).

Baseado nos nossos resultados entre os grupos etários em que houve diferença significativa e se encontram na faixa etária de risco, de acordo com o estudo citado acima, é possível, que em condições de *up regulated*, a SIRT2 possa contribuir para o dano ao sistema nervoso em pacientes com febre chikungunya.

6.2 Sirtuína mitocondrial

Na infecção por CHIKV a artralgia é a clínica que mais se destaca durante a fase aguda, e a sua persistência se torna o sintoma mais característico no período crônico da doença. A artralgia é causada pelo infiltrado inflamatório decorrente do alphavírus. A citocina do tipo IL-6 foi relatada nas duas fases da doença, aguda e crônica, e o seu bloqueio é utilizado no combate a dor e fadiga no tratamento da artrite reumatoide (AR) (SUHRBIER, 2019).

Um trabalho comparou pacientes com AR com o grupo saudável e houve diferença significativa. Os pacientes com AR tiveram as maiores expressões gênicas da

SIRT3 (KARA et al., 2017b). Um estudo avaliou *in vivo* e *in vitro*, o papel da SIRT3 na osteoartrite e grupo controle. Na cultura de condrócitos com osteoartrite houve diminuição da SIRT3 em comparação ao grupo saudável, o que também ocorreu no modelo de osteoartrite em ratos (WANG et al., 2018a).

De acordo com os nossos resultados inéditos no estudo sobre SIRT3 e arboviroses, a expressão de SIRT3 foi diminuída em pacientes com febre chikungunya assim, a expressão em *down regulated* da SIRT3 consegue caracterizar um perfil para a doença.

A resposta inflamatória, em ratos e humanos, decorrente da infecção por CHIKV estimula o *Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat 25 and Pyrin Domain Containing Receptor 3* (NLRP3). O estudo demonstrou que a expressão do NLRP3 em pacientes com CHIKV é 100 vezes superior ao grupo saudável e a IL-1 β obteve maior expressão de mRNA em pacientes com sinais de doença aguda; enquanto a IL-18 foi cinco vezes superior ao grupo controle. Além disso, os animais tratados com um inibidor do NLRP3 apresentaram diminuição da perda óssea decorrente dos osteoclastos (CHEN et al., 2017).

Sabe-se que a ativação do NLRP3 é diminuída quando as espécies reativas de oxigênio (ERO) decaem e a atividade mitocondrial é preservada pelo aumento da SIRT3 (TRABA et al., 2015). As nossas análises concordam com os dois estudos referidos acima e podem sugerir que na febre chikungunya o perfil *down regulated* da SIRT3 consegue modular a infecção via NLRP3, o que pode ocasionar artralgia presente em 88,57% do grupo que não expressou SIRT3.

Desta maneira, os nossos resultados extremamente relevantes estão de acordo com os estudos e sugerem que os níveis diminuídos de SIRT3 conseguem caracterizar um perfil não apenas na osteoartrite, mas também na artralgia causada pela febre chikungunya.

6.3 Sirtuína nucleolar

Os danos neurológicos como neuroretinite, encefalite, neuropatia óptica e Síndrome de Guillain Barré podem ser consequências da febre chikungunya (CERNY et al., 2017). Um estudo realizado com modelo em ratos com encefalomielite autoimune demonstrou que a diminuição da expressão da proteína Sirt7 levou à redução de IFN- γ proveniente de células T CD8, comparados ao grupo saudável, com a porcentagem de

células T CD4⁺ FOXP3⁺ também reduzida (BURG; BITTNER; ELLWARDT, 2018). Estes dados sugerem um papel inflamatório da SIRT7.

Um estudo em ratos observou que os animais com cardiomiócitos deficientes em SIRT7 demonstraram elevação da inflamação e uma acentuada redução da resistência ao estresse oxidativo (VAKHRUSHEVA et al., 2008).

Outro trabalho em ratos geneticamente modificados que exerceram exercícios forçados relatou que a SIRT7 é responsável por diminuir a degradação da cartilagem, portanto, a SIRT7 dificulta o desencadeamento da osteoartrite. Assim, a expressão de genes envolvidos na degradação da matriz extracelular é aumentada se a SIRT7 estiver diminuída (KOROGI et al., 2018).

De acordo com as nossas análises, o perfil da SIRT7 foi encontrado em *down regulated* na febre chikungunya em relação ao grupo controle. O nosso estudo avaliou que a SIRT7 em condições de *down regulated* não parece ter um efeito protetor em relação a artralgia, pois 88,23% dos pacientes que não expressaram apresentaram artralgia e pode indicar uma possível predisposição ao aumento da degradação da cartilagem em pacientes que cronificam.

Assim, nossos resultados concordam com dados apresentados na literatura, onde é possível que os níveis diminuídos de SIRT7 possam contribuir para o desenvolvimento do processo inflamatório na artralgia decorrente a febre chikungunya.

7. CONCLUSÃO

De acordo com as análises de expressão gênica da SIRT1, não foi possível observado um padrão que caracterize o grupo de pacientes portadores de febre chikungunya, assim como para a SIRT2. No entanto, a SIRT2 apresentou um perfil *up regulated* em pacientes com idade a partir de 60 anos, diferentemente do observado para indivíduos mais jovens.

Em relação às SIRT3 e SIRT7, a ausência ou baixos níveis de expressão observados nos pacientes com febre chikungunya indicam que estas sirtuínas podem estar envolvidas na fisiopatologia da infecção, além de sugerirem potenciais propostas terapêuticas. O presente trabalho representa o primeiro estudo que avalia a expressão gênica das SIRT1, SIRT2, SIRT3 e SIRT7 em pacientes com febre chikungunya.

8. REFERÊNCIAS

AMDEKAR, S.; PARASHAR, D.; ALAGARASU, K. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. **Viral Immunology**, v. 30, n. 10, p. 691–702, dez. 2017.

ARAGÃO, C. F. et al. Circulation of Chikungunya virus in *Aedes aegypti* in Maranhão, Northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 186, n. April, p. 1–4, 2018.

BALA MURUGAN, S.; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 933–937, 2016.

BOUQUILLARD, E. et al. Rheumatic manifestations associated with Chikungunya virus infection: A study of 307 patients with 32-month follow-up (RHUMATOCHIK study). **Joint Bone Spine**, v. 85, n. 2, p. 207–210, 2018.

Brasil. Ministério da Saúde (MS), 2014. Monitoramento dos casos de dengue até a Semana Epidemiológica (SE) 37 e febre de chikungunya até a SE 38 de 2014. Boletim Epidemiológico 45(22). Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em 20 de Agosto de 2019.

BUDAYEVA, H. G.; ROWLAND, E. A.; CRISTEA, I. M. Intricate Roles of Mammalian Sirtuins in Defense against Viral Pathogens. **Journal of Virology**, v. 90, n. 1, p. 5–8, 2015.

BURG, N.; BITTNER, S.; ELLWARDT, E. Role of the epigenetic factor Sirt7 in neuroinflammation and neurogenesis. **Neuroscience Research**, v. 131, p. 1–9, 2018.

BURT, F. J. et al. Chikungunya: A re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, 2017a.

BURT, F. J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, 2017b.

CANTÓ, C.; AUWERX, J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: All you need is NAD +? **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 1, p. 166–187, 2012.

CARRASCO, L.; SANZ, M. A.; GONZÁLEZ-ALMELA, E. The regulation of translation in alphavirus-infected cells. **Viruses**, v. 10, n. 2, p. 1–28, 2018.

CAVRINI, F. et al. **Chikungunya: An emerging and spreading arthropod-borne viral disease** *Journal of Infection in Developing Countries* *Journal of Infection in Developing Countries*, , 2009.

Centro de Pesquisa U.S para Controle e Prevenção de Doenças. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>>. Acesso 20 de agosto de 2019.

CERNY, T. et al. The Range of Neurological Complications in Chikungunya Fever. **Neurocritical Care**, v. 27, n. 3, p. 447–457, 2017.

CHEN, W. et al. Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 1435–1445, 2017.

CHENG, S. T. et al. HBx-elevated SIRT2 promotes HBV replication and hepatocarcinogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 496, n. 3, p. 904–910, 2018.

CURTIS, E. et al. Safety of Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Osteoarthritis: Outcomes of a Systematic Review and Meta-Analysis. **Drugs and Aging**, v. 36, n. s1, p. 25–44, 2019.

DA CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: Clinical aspects and treatment. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017.

DA SILVA JUNIOR, G. B. et al. Risk factors for death among patients with Chikungunya virus infection during the outbreak in northeast Brazil, 2016-2017. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 4, p. 221–226, 2019.

DE AGUIAR, G. P. C. G. et al. Evidence for host epigenetic signatures arising from arbovirus infections: A systematic review. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. MAY, p. 1–14, 2019.

DENG, Z. et al. The role of sirtuin 1 and its activator, resveratrol in osteoarthritis. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 5, p. 1–11, 2019.

DIAZ-PERDIGON, T. et al. Early sirtuin 2 inhibition prevents age-related cognitive decline in a senescence-accelerated mouse model. **Neuropsychopharmacology**, n. August, p. 1–11, 2019.

DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, v. 51, p. 30, 2017.

DRAHANSKY, M. et al. We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %. **Intech**, v. i, n. tourism, p. 13, 2016.

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. **Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective** *Seminars in Reproductive Medicine*, set. 2009.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected**

Tropical Diseases, v. 6, n. 3, 2012.

ELBEAINO, T. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Fimoviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 11, p. 1478–1479, 1 nov. 2018.

FAROOQI, A. A. et al. Interplay between epigenetic abnormalities and deregulated expression of microRNAs in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, n. February, p. 0–1, 2019.

FINNIN, M. S.; DONIGIAN, J. R.; PAVLETICH, N. P. Structure of the histone deacetylase SIRT2. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 7, p. 621–625, 2001.

FU, Y. et al. Aging Promotes Sirtuin 3–Dependent Cartilage Superoxide Dismutase 2 Acetylation and Osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 68, n. 8, p. 1887–1898, 2016.

GABAY, O.; CLOUSE, K. A. Epigenetics of cartilage diseases. **Joint Bone Spine**, v. 83, n. 5, p. 491–494, 2016.

GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. Chikungunya virus: Pathophysiology, mechanism, and modeling. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 1–14, 2017.

HACKETT, B. A. et al. Sirtuin inhibitors are broadly antiviral against arboviruses. **mBio**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2019.

HALL, J. A. et al. The sirtuin family ' s role in aging and age- associated pathologies Find the latest version : Review series The sirtuin family ' s role in aging and age- associated pathologies. **J Clin Invest.**, v. 123, n. 3, p. 973–979, 2013.

HANLEY, K. A.; WEAVER, S. C. **Arbovirus Evolution**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Ltd, 2008.

HERBEIN, G.; WENDLING, D. Histone deacetylases in viral infections. **Clinical Epigenetics**, v. 1, n. 1–2, p. 13–24, 2010.

HORCADA, M. L.; DÍAZ-CALDERÓN, C.; GARRIDO, L. Chikungunya fever. Rheumatic manifestations of an emerging disease in Europe. **Reumatologia Clinica**, v. 11, n. 3, p. 161–164, 2015.

HUANG, Y.-J. S.; VANLANDINGHAM, D. L.; HIGGS, S. **Viral Genetics of Chikungunya Virus and Zika Virus and Its Influence in Their Emergence and Application for Public Health Control Strategies**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

JOUBERT, P. E. et al. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 5, p. 1029–1047, 2012.

KARA, M. et al. Changes in sirtuin 2 and sirtuin 3 mRNA expressions in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, **27, 3, 5 2015**, n. November 2016, p. 83–86, 2017a.

KARA, M. et al. Changes in sirtuin 2 and sirtuin 3 mRNA expressions in rheumatoid

arthritis. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, n. 2, p. 83–86, 12 jun. 2017b.

KENNEDY AMARAL PEREIRA, J.; SCHOEN, R. T. Management of chikungunya arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 36, n. 10, p. 2179–2186, 2017.

KIEVIT, W. et al. The efficacy of anti-TNF in rheumatoid arthritis, a comparison between randomised controlled trials and clinical practice. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 11, p. 1473–1478, 2007.

KIM, J. K. et al. Sirtuin7 oncogenic potential in human hepatocellular carcinoma and its regulation by the tumor suppressors MiR-125a-5p and MiR-125b. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 1055–1067, 2013.

KOROGI, W. et al. SIRT7 is an important regulator of cartilage homeostasis and osteoarthritis development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 496, n. 3, p. 891–897, 2018.

LEE, S. H. et al. Sirtuin signaling in cellular senescence and aging. **BMB Reports**, v. 52, n. 1, p. 24–34, 2019.

LIN, J. et al. Sirt2 suppresses inflammatory responses in collagen-induced arthritis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 4, p. 897–903, 2013.

LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, p. 165–174, 2015.

LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33–57, 1955.

MA, C. H. et al. Homocysteine causes dysfunction of chondrocytes and oxidative stress through repression of SIRT1/AMPK pathway: A possible link between hyperhomocysteinemia and osteoarthritis. **Redox Biology**, v. 15, n. February, p. 504–512, 2018.

MAGALHAES, T. et al. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–25, 2017.

MAHALINGAM, S. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107–e117, 2017.

MALINOSKI, F. J. Chikungunya fever. **Handbook of Zoonoses, Second Edition, Section B: Viral Zoonoses**, v. 23, n. 4, p. 101–109, 2017.

MARQUES, C. D. L. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 – Diagnóstico e situações especiais. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. S 2, p. 421–437, 2017a.

MARQUES, C. D. L. et al. Recommendations of the Brazilian Society of

- Rheumatology for the diagnosis and treatment of chikungunya fever. Part 2 – Treatment. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 57, n. S 2, p. 438–451, 2017b.
- 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.
- MATUSALI, G. et al. Tropism of the chikungunya virus. **Viruses**, v. 11, n. 2, 2019.
- MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Tropica**, v. 166, p. 155–163, 2017.
- MEJÍA, C.-R.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Tropical Arthritogenic Alphaviruses. **Reumatología Clínica (English Edition)**, v. 14, n. 2, p. 97–105, 2018.
- MENDES, K. L.; LELIS, D. DE F.; SANTOS, S. H. S. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 38, n. November, p. 98–105, 2017.
- MICHELL, A. et al. Arbovirus investigation in patients from Mato Grosso during Zika and Chikungunya virus introduction in Brazil, 2015-2016 Authors: **Acta Tropica**, p. 2015–2016, 2018.
- MOON, M. H. et al. SIRT1, a class III histone deacetylase, regulates TNF- α -induced inflammation in human chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 21, n. 3, p. 470–480, 2013.
- MOSTOSLAVSKY, R.; ESTELLER, M.; VAQUERO, A. At the crossroad of lifespan, calorie restriction, chromatin and disease: Meeting on sirtuins. **Cell Cycle**, v. 9, n. 10, p. 1907–1912, 2010.
- NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond fever and pain: Diagnostic methods for chikungunya virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1–14, 2019a.
- NATRAJAN, M. S.; ROJAS, A.; WAGGONER, J. J. Beyond Fever and Pain: Diagnostic Methods for Chikungunya Virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 6, 24 maio 2019b.
- NAVECA, F. G. et al. Genomic, epidemiological and digital surveillance of Chikungunya virus in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007065, 2019.
- NINLA-AESONG, P.; MITARNUN, W.; NOIPHA, K. Proinflammatory Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Persistent Arthralgia and Severe Disease After Chikungunya Virus Infection: A 5-Year Follow-Up Study in Southern Thailand. **Viral Immunology**, v. 32, n. 10, p. 442–452, 1 dez. 2019.

NOGUEIRAS, R. et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: Physiological modulators of metabolism. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 3, p. 1479–1514, 2012.

O'DONNELL, M.; LANGSTON, L.; STILLMAN, B. Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 7, p. 1–13, 2013.

OKEOMA, C. M. Chikungunya virus: Advances in biology, pathogenesis, and treatment. **Chikungunya Virus: Advances in Biology, Pathogenesis, and Treatment**, p. 1–197, 2016.

ONG, R. Y.; LUM, F. M.; NG, L. F. P. The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections. **Future Virology**, v. 9, n. 3, p. 313–330, 2014.

Organization PAWH. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory. Washington: 2017.

PANDEY, V.; KUMAR, V. Stabilization of SIRT7 deacetylase by viral oncoprotein HBx leads to inhibition of growth restrictive RPS7 gene and facilitates cellular transformation. **Scientific Reports**, v. 5, n. September, p. 1–15, 2015.

PATHAK, H.; MOHAN, M. C.; RAVINDRAN, V. Chikungunya arthritis. **Clinical medicine (London, England)**, v. 19, n. 5, p. 381–385, 2019.

PAUL, B. J.; SADANAND, S. Chikungunya Infection: A Re-emerging Epidemic. **Rheumatology and Therapy**, v. 5, n. 2, p. 317–326, 2018.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, 2010.

REN, J.-H. et al. Sirtuin 1 Regulates Hepatitis B Virus Transcription and Replication by Targeting Transcription Factor AP-1. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2442–2451, 2014.

REN, J. H. et al. Protective role of Sirtuin3 (SIRT3) in oxidative stress mediated by hepatitis B virus X protein expression. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–15, 2016.

ROBINSON, M. C. Marion c. robinson*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 28–32, 1952.

RUIZ SILVA, M. et al. Mechanism and role of MCP-1 upregulation upon chikungunya virus infection in human peripheral blood mononuclear cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–9, 2016.

SACCONNAY, L.; CARRUPT, P.; NURISSO, A. Human sirtuins : Structures and flexibility. **Journal of Structural Biology**, v. 16, 2012.

SAHOO, B.; CHOWDARY, T. K. Conformational changes in Chikungunya virus E2 protein upon heparan sulfate receptor binding explain mechanism of E2-E1 dissociation

during viral entry. **Bioscience Reports**, p. BSR20191077, 5 jun. 2019.

SCHNIERLE, B. S. Cellular Attachment and Entry Factors for Chikungunya Virus. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1078, 19 nov. 2019.

SELVARAJ, S.; KRISHNASWAMY, S.; DEVASHYA, V. Flavonoid – Metal Ion Complexes : v. 30, n. 4, p. 677–702, 2013.

SIMON, F. et al. Chikungunya virus infection. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 3, p. 218–228, 2011.

SIMON, F. et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014 & , &&. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 7, p. 243–263, 2015.

SINGH, A. et al. Understanding the interactability of chikungunya virus proteins: Via molecular recognition feature analysis. **RSC Advances**, v. 8, n. 48, p. 27293–27303, 2018.

SINGH, R. K. et al. Molecular epidemiology of Chikungunya virus: Mutation in E1 gene region. **Journal of Virological Methods**, v. 185, n. 2, p. 213–220, nov. 2012.

SLAVOV, S. N. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus in blood donors from Northern and Southeastern Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 40, n. 4, p. 358–362, 2018.

SONG, H. et al. Molecular Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope Protein. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1714- 1724.e12, 2019.

SU, X. B.; PILLUS, L. Functions for diverse metabolic activities in heterochromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 11, p. E1526–E1535, 2013.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 597–611, 2019.

SUTARIA, R. B.; AMARAL, J. K.; SCHOEN, R. T. Emergence and treatment of chikungunya arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 30, n. 3, p. 256–263, 2018.

TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. October, p. 345, 2018.

TONG, Z. et al. SIRT7 is an RNA-activated protein lysine deacylase. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 300–310, 2017.

TRABA, J. et al. NLRP3_fasting_SIRT3_mito_JCI2015. **Journal of Clinical Investigation**, v. 3, n. 17, p. 1–9, 2015.

- TRONICK, E.; HUNTER, R. G. Waddington, Dynamic systems, and epigenetics. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, n. JUN, p. 1–6, 2016.
- VAIRO, F. et al. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 1003–1025, 2019.
- VAKHRUSHEVA, O. et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. **Circulation Research**, v. 102, n. 6, p. 703–710, 2008.
- VAN DE VEN, R. A. H.; SANTOS, D.; HAIGIS, M. C. Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 4, p. 320–331, 2017.
- VAQUERO, A. et al. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. **Genes and Development**, v. 20, n. 10, p. 1256–1261, 2006.
- WAHID, B. et al. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 69–76, 2017.
- WANG, J. et al. SIRT3 activation by dihydromyricetin suppresses chondrocytes degeneration via maintaining mitochondrial homeostasis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 14, n. 13, p. 1873–1882, 2018a.
- WANG, Y. et al. An overview of Sirtuins as potential therapeutic target: Structure, function and modulators. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 161, p. 48–77, 2019a.
- WANG, Y. et al. SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology. **Ageing Research Reviews**, v. 55, n. July, p. 100961, 2019b.
- WANG, Z. et al. Crosstalk between metabolism and epigenetic modifications in autoimmune diseases: a comprehensive overview. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 18, p. 3353–3369, 2018b.
- WARREN, J. L.; MACIVER, N. J. Regulation of Adaptive Immune Cells by Sirtuins. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. July, 2019.
- 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, 2015a.
- 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, 2015b.
- WENDLING, D. et al. Sirt1 activity in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 81, n. 5, p. 462–463, 2014.

WU, J. et al. **Emerging role of SIRT3 in mitochondrial dysfunction and cardiovascular diseases** *Free Radical Research* Taylor and Francis Ltd, , 1 fev. 2019.

YAN, W. et al. Arginine methylation of SIRT 7 couples glucose sensing with mitochondria biogenesis . **EMBO reports**, v. 19, n. 12, p. 1–15, 2018.

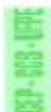
Z, L. SIRT7: from a Metabolic Regulator to a Disease Marker. **International Journal of Cancer Studies & Research**, v. 2, p. 63–66, 2015.

ZAID, A. et al. Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. **Arthritis and Rheumatology**, v. 70, n. 4, p. 484–495, 2018.

ZANNOLI, S. et al. **Chapter 9 - Diagnostics and Laboratory Techniques**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

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: FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA 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 arbovirus e doenças correlatas. Para tanto serão coletadas amostras de pacientes com suspeita clínica de infecção por arbovirus 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: 50.740-800

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br