

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Erik Vinicius de Sousa Reis

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO CHIKUNGUNYA  
VÍRUS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DO INIBIDOR DE MEK/ERK  
TRAMETINIBE (MEKINIST)**

Belo Horizonte  
2020

Erik Vinicius de Sousa Reis

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO CHIKUNGUNYA  
VÍRUS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DO INIBIDOR DE MEK/ERK  
TRAMETINIBE (MEKINIST)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte  
2020

043

Reis, Erik Vinicius de Sousa.

Análise morfológica do ciclo de multiplicação do Chikungunya vírus e avaliação do potencial antiviral do inibidor de MEK/ERK Trametinibe (Mekinist) [manuscrito] / Erik Vinicius de Sousa Reis. – 2020.  
185 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Cláudio Antônio Bonjardim.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Aedes. 4. Antivirais. 5. Interações entre Hospedeiro e Microrganismos. I. Bonjardim, Cláudio Antônio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Erik Vinicius de Sousa Reis  
Nº REGISTRO: 2017662130

Às catorze horas e zero minuto do dia vinte e um de dezembro de dois mil e vinte, reuniu-se, remotamente, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (titular), Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (titular), José Carlos de Magalhães (titular), Jaqueline Germano de Oliveira (titular) e Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim (orientador), para julgar o trabalho final "ANÁLISE MORFOLÓGICA DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO CHIKUNGUNYA VÍRUS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DO INIBIDOR DE MEK/ERK TRAMETINIBE (MEKINIST)" do aluno Erik Vinicius de Sousa Reis, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 21 de dezembro de 2020. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis Jordana G. Coelho-dos-Reis

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Prof. Dr. Jose Carlos de Magalhaes José Carlos de Magalhães

Dra. Jaqueline Germano de Oliveira Jaqueline Germano de Oliveira

Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim (Orientador) CLÁUDIO ANTÔNIO BONJARDIM

Flávio Guimarães da Fonseca

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador



## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido graças à inúmeras contribuições das agências de fomento à pesquisa, da UFMG que cedeu suas estruturas e das pessoas que fizeram parte de todo o processo, agradeço:

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e pelo Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS), Ministério da Saúde, pelo apoio financeiro.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, sua coordenação e seu corpo docente, pelo suporte, auxílio e conhecimento adquirido nas disciplinas do curso.

Aos funcionários da UFMG, ao pessoal da limpeza, em especial Alexandre, Maria e Ana. Aos funcionários do Centro de Microscopia da UFMG pelas inúmeras horas gastas com minhas amostras, em especial ao grande Ney, Denilson, Thalita, Rodrigo, Priscila e Bárbara. Aos funcionários do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens da UFMG, em especial ao Samuel pelo treinamento nos microscópios confocais.

Aos professores do Laboratório de Vírus: Dr. Jônatas S.. Abrahão, Dra. Betânia P.. Drumond, Dra. Giliane S. Trindade e Dra. Erna G. Kroon pelas imensas contribuições nas reuniões, corredores e outras discussões sobre virologia e seu extenso campo de conhecimento.

Ao meu orientador, Dr. Cláudio A. Bonjardim, por ter me acolhido desde o início mesmo tendo vindo de outra área e ter tido paciência com o meu desenvolvimento como virologista. À sua forma de encarar a vida, ser crítico, firme nas palavras e sua humanidade, com o qual aprendi muito.

Ao Laboratório de Vírus e todos os colegas, aos GTS em especial: Nidia por sua parceria e seu ensinamento no modo GTS de ser, Diogo pelas ótimas críticas e Hugo, que com seu jeito implicante contribuía para meu desenvolvimento fortemente.

À Beatriz, que foi minha filha científica, agradeço por este teu jeito simples, aguerrido, trabalhador e por sempre exibir um sorriso no rosto que irradia a todos a sua volta, o desenvolvimento é mútuo com a tua presença.

À Comissão Avaliadora deste trabalho na qualificação: Dr. Jônatas S. Abrahão e Dr. Pedro Alves, por todas as contribuições e sugestões.

À banca examinadora da defesa de doutorado: Dra. Jordana Grazziela Alves Coelho dos Reis, Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Dr. José Carlos de Magalhães, Dra. Jaquelline Germano de Oliveira, Dra. Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade e Dra. Izabela Maurício de Rezende pela disponibilidade em meio ao fim de ano e pelas futuras contribuições e sugestões ao trabalho.

Aos meus colegas de laboratório que viraram amigos: os gorduchos, em especial à Jake por tantas conversas, ao grande Maurício pelas conversas e incentivos, ao Jônatas e ao Rodrigo pelas conversas de conhecimento, almoços e memes. À Fernandinha que estava sempre ali nos perrengues da pós-graduação e sempre foi parceira “pau pra toda obra”. Aos grupo dos *traps*: Diogo, Paulo, Iza, Pedro, Luiz e Mari o qual me afastei por um bom tempo, mas agradeço por me renderem ótimas saídas e por terem me acolhido muito bem na minha chegada à BH com cerveja. Em especial ao Leo (Leonardo Camilo de Oliveira) por ter me ensinado desde o básico da virologia nos meus primeiros seis meses de doutorado, no qual eu não sabia nem o que era “titulação” de vírus e à Lívia que neste último ano foi uma grande parceira de bancada no diagnóstico de covid, parceira de bebida e ao incentivo na reta final do doutorado, apesar da zanga provocada por minhas implicâncias.

Aos meus amigos do Piauí que dividiram república comigo nos meus tempos de graduação e mestrado: Thayson, Enyo, Ari, Thiago, China, Vicente, Pablito e Júnior e em especial ao Jethro que sempre foi um irmão e pagou minha inscrição no doutorado, sempre acreditando em mim. À Chiriquita e Nina por serem ótimas cães de guarda e comedoras de manga.

A todos meus amigos do PI/MA, os quais são inúmeros, à galera do RPG, aos meus amigos que sempre me apoiaram, Yendis, Gabriel e à Lhaís, minha ex-namorada, que me apoiou de forma colossal e sempre incentivou o caminho que escolhi traçar, tu fez parte disso e sou muito grato.

Ao meu pai, que infelizmente não está entre nós e que apesar de não ter seguido em seus estudos, nunca deixou que nos faltasse educação, é o meu exemplo de bom coração.

Ao meu irmão pela generosidade imensa que tem no peito e à minha irmã que sempre me auxiliou e apoiou em tudo, tu é uma inspiração desde criança, linda “véa”.

Aos meus sobrinhos Renata, Emily e Benício, “xêru” do tio. Ao meu cunhados Cláudio por ter me mostrado várias coisas boas da vida, como Belchior e minha cunhada Anaile.

E claro, a quem proporcionou tudo, minha mãe fofa “réa”, que sempre foi inspiração de como resolver os problemas, sempre foi apoio incondicional nos meus estudos e sempre confiou em mim. Dizer que te amo é pouco para expressar o que a senhora é para mim, nunca poderei retribuir o que a senhora fez/faz por mim. Este doutorado é um dos caminhos que a senhora me ajudou a construir, outros virão e só tenho a agradecer, seu filho vai virar “dotô”, mas vai continuar dando “xêru” nesse cangote véi e continuar a estourar seus cravos. Coisa linda “véa”!

A todo mundo que contribuiu de alguma forma para esta etapa de minha carreira e à música no qual sempre foi uma válvula para me impulsionar em tudo.  
*Hard Rock feelings!*

## RESUMO

O chikungunya vírus (CHIKV) é um vírus envelopado com genoma RNA senso positivo, transmitido entre vertebrados e artrópodes, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, contendo três genótipos. O CHIKV penetra nas células por meio de endocitose dependente de clatrina, desnudando o capsídeo e o genoma e imediatamente induzindo a tradução das proteínas não estruturais que formam o complexo de replicação chamados de esférulas. Ao longo da infecção a célula infectada monta vacúolos citopáticos, e na etapa final é liberado via brotamento, adquirindo seu envelope por meio da membrana plasmática. Existem muitas lacunas a serem exploradas no ciclo de multiplicação do CHIKV, as quais podem ajudar a esclarecer eventos da biologia do vírus e ajudar no desenvolvimento de novas terapias antivirais. Não existem medicamentos e nem vacinas específicas para o CHIKV, existindo a constante necessidade do desenvolvimento de alternativas para o tratamento da doença. Neste trabalho, foram utilizados ensaios biológicos, com modelos animais, de caracterização por microscopias eletrônica, de varredura, de imunofluorescência e confocal. Demonstrou-se que o tratamento com Trametinibe na concentração de 40  $\mu$ M reduziu em  $\sim 3$ -log o título viral, além de reduzir a produção de partículas virais totais analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Porém, *in vivo*, não foi possível estabelecer o modelo de infecção imunocompetente e em testes com camundongos A129 o Trametinibe não protegeu os animais da letalidade do CHIKV. Na caracterização do ciclo de multiplicação do CHIKV, evidências microscópicas foram sistematizadas nas referentes etapas e puderam ser comprovados mecanismos clássicos como: penetração via endocitose mediada por clatrina, produção do complexo de replicação (esférulas), produção de vacúolos citopáticos e liberação via brotamento. Além dos achados clássicos, evidências também apontaram novos mecanismos envolvidos no ciclo de multiplicação do CHIKV. Foi descrita a penetração via macropinocitose e a formação do macropinosomo induzidos por uma ou múltiplas partidas; observaram-se partículas envelopando por meio de membranas intracelulares sem realizar o brotamento via membrana plasmática; e foram descritas as liberações via exocitose e protrusão da membrana plasmática, esta última sendo sugestiva de cauda de actina. Esses achados contribuem no entendimento de algumas lacunas relacionadas ao ciclo do CHIKV, ajudando na melhor compreensão das interações vírus-hospedeiro e podendo também ajudar na busca por novos alvos antivirais.

Palavras-chave: Chikungunya vírus. Antivirais. MEK/ERK.

## ABSTRACT

The chikungunya virus (CHIKV) is an enveloped virus with an RNA positive strand genome, transmitted between sperm vertebrates and arthropod vectors such as *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, comprising three genotypes. CHIKV enters cells through clathrin-dependent endocytosis, denuding the capsid and genome and immediately leading to the translation of the non-structural proteins that form the replication complex termed spherules. Throughout the infection it mounts cytopathic vacuoles, and in the final stage it is released via budding, acquiring the envelope through the plasma membrane. There are many gaps to be explored in the CHIKV life cycle, which can help to clarify events in the biology of the virus and support the development of new antiviral therapies. There are no specific drugs or vaccines for CHIKV, and there is a constant demand for the development of alternatives for the treatment of the disease. In this work, we used biological tests, animal models, characterization by electron, scanning, immunofluorescence and confocal microscopy. It was shown that treatment with Trametinib at a concentration of 40  $\mu\text{M}$  reduced the viral titer by  $\sim 3$ -log, in addition to reducing the production of total viral particles analyzed by transmission electron microscopy (MET). However, in vivo, it was not possible to establish the immunocompetent infection model and in tests with A129 mice Trametinib unprotected animals of CHIKV lethality. In the characterization of the CHIKV life cycle, microscopic evidence was systematized in the references and classic components such as: penetration via clathrin-mediated endocytosis, production of the replication complex (spherules), production of cytopathic vacuoles and via budding can be verified. Interestingly, in addition to the classic findings, evidence also pointed to novel processes involved in the CHIKV multiplication cycle. We described penetration via macropinocytosis and macropinosis formation induced by single or multiple particles; particles enveloping through intracellular membranes without performing budding via plasma membrane; and we showed release via exocytosis and by protrusions of the plasma membrane, in which is suggestive of actin tail. These findings contribute to the understanding of some obscurities related to the CHIKV life cycle, helping the better comprehension of virus-host interactions and may also help in the search for novel antiviral targets.

*Keywords:* Chikungunya virus. Antivirals. MEK/ERK.

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Composição da esférula do chikungunya vírus.</i>	22
<i>Figura 2 - Organização geral da partícula do chikungunya vírus.</i>	23
<i>Figura 3 – Estrutura do genoma do chikungunya vírus.</i>	24
<i>Figura 4 – Ciclo de multiplicação dos alfavírus.</i>	32
<i>Figura 5 – Número de países ou territórios nas Américas com transmissão local do CHIKV.</i>	36
<i>Figura 6 – Países e territórios em que casos de CHIKV já foram notificados (verde escuro) a partir de outubro de 2015.</i>	37
<i>Figura 7 – Ciclo de transmissão do CHIKV enzoótico e epizoótico.</i>	40
<i>Figura 8 – Mapa com a disseminação do CHIKV baseada nos genótipos e surtos ocorridos.</i>	41
<i>Figura 9 – Antivirais de amplo espectro.</i>	48
<i>Figura 10 – Ensaios virucida e dose-resposta com Trametinibe.</i>	77
<i>Figura 11 – Curva de ciclo único do CHIKV em Vero intra e extracelular com tratamento por Trametinibe 40 <math>\mu</math>M.</i>	79
<i>Figura 12 – Curva de multiplicação do CHIKV em exposição ao DMSO ou Trametinibe.</i>	81
<i>Figura 13 – Células Vero infectadas com chikungunya vírus (CHIKV) para ensaio de imunofluorescência.</i>	83
<i>Figura 14 – Células Vero fixadas em 24 horas.</i>	85
<i>Figura 15 – Células Vero tratadas com DMSO (A) ou Trametinibe 40 <math>\mu</math>M (B) fixadas em 24 horas.</i>	86
<i>Figura 16 – Células Vero infectadas com CHIKV por 8 horas pós-infecção (hpi).</i>	88
<i>Figura 17 – Células Vero infectadas com CHIKV por 16 horas pós-infecção (hpi).</i>	90
<i>Figura 18 – Células Vero infectadas com CHIKV por 24 horas pós-infecção (hpi).</i>	92
<i>Figura 19 – Células Vero infectadas com CHIKV 4 horas pós-infecção (hpi).</i>	94
<i>Figura 20 – Células Vero infectadas com CHIKV por 8 horas pós-infecção (hpi).</i>	96
<i>Figura 21 – Análises de animais C57BL/6 infectados com CHIKV.</i>	99
<i>Figura 22 – Curvas de sobrevivência e variação de peso de animais A129 infectados com CHIKV.</i>	100
<i>Figura 23 – Sinais de animais A129 infectados por chikungunya vírus (CHIKV).</i>	101
<i>Figura 24 – Sinais de camundongos A129 infectados com CHIKV em três inóculos.</i>	102
<i>Figura 25 – Variação de peso e curva de sobrevivência de camundongos A129 infectados com CHIKV em três inóculos.</i>	103
<i>Figura 26 – Variação de peso e curva de sobrevivência de camundongos A129 infectados com CHIKV e tratados com CMC ou Trametinibe.</i>	105
<i>Figura 27 – Penetração por endocitose mediada por clatrina do CHIKV em células Vero.</i>	107
<i>Figura 28 – Penetração do CHIKV por macropinocitose em células Vero.</i>	109



<i>Figura 29 – Distribuição das esférulas do chikungunya vírus (CHIKV) em células Vero.</i>	111
<i>Figura 30 – Vacúolo citopático do tipo I (CPV-I) de CHIKV em célula Vero.</i>	113
<i>Figura 31 – Estruturas citopáticas e distribuição das proteínas de capsídeo de CHIKV em células Vero.</i>	115
<i>Figura 32 – Fábrica viral e exocitose de CHIKV.</i>	117
<i>Figura 33 – Curva de multiplicação (A) e ciclo único (B) em Vero</i>	120
<i>Figura 34 – Curva de replicação genômica do CHIKV.</i>	121
<i>Figura 35 – Liberação via brotamento de partícula de CHIKV.</i>	122
<i>Figura 36 – Liberação via protusão membranar de CHIKV.</i>	124
<i>Figura 37 – Liberação via protusão membranar de CHIKV em microscopia eletrônica de varredura (MEV).</i>	125
<i>Figura 38 – Protrusões membranares em células Vero contendo partículas de CHIKV.</i>	126
<i>Figura 39 – Células Vero infectadas com CHIKV e marcada com anticorpos e corantes específicos.</i>	128
<i>Figura 40 – Titulação por ensaio de placa para o chikungunya vírus (CHIKV) em células Vero.</i>	162
<i>Figura 41 – Curva de multiplicação do CHIKV em células C6/36 e Vero.</i>	164
<i>Figura 42 – Ensaio de termolabilidade do CHIKV.</i>	165
<i>Figura 43 – Teste de diluição do anticorpo primário anti-chikungunya vírus (anti-CHIKV).</i>	166

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
AINE	Anti-Inflamatório Não-Esteroidal
ATP	Adenosina trifosfato
AUD	Domínio Único de <i>Alphavirus</i>
BHK-21	Células de Rim de Hamster Neonato
BMK-1	Grande proteína cinase ativada por mitógeno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAPI	Centro de Aquisição e Processamento de Imagens
CDC	Centro para Controle e Prevenção de Doença
CHIKF	Febre chikungunya
CHIKV	Chikungunya virus
CPV-I	Vacúolo citopático tipo I
CPV-II	Vacúolo citopático tipo II
DENV	Dengue virus
DL <sub>50</sub>	Dose Letal mediana

DMEM	Meio Dulbecco MEM
E1-A226V	Substituição de Arginina por Valina na posição 226 de E1
E1/E2/E3	Proteína Estrutural do CHIKV (1,2 e 3)
ECSA	Genótipo África Central, Sul e Leste
ECP	Efeito Citopático
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
EGTA	Ácido etileno glicol-bis( $\beta$ -aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
ERK	Cinases reguladas por sinal extracelular
ER/RE	Retículo Endoplasmático
GMTase	Guanina-7-metiltransferase
GPCR	Receptor Acoplado à Proteína G
GTase	Guaniltransferase
GTP	Guanosina trifosfato
HCV	Vírus da Hepatite Humana C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IDT	Integrated DNA Technologies®

IF	Inibidor Farmacológico
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferons do tipo I
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IMPD	Inosina Monofosfato Desidrogenase
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IOL	Linhagem do Oceano Índico
IP	Via Intraperitoneal
JNK/SAPK	c-Jun Cinase/ Proteína Cinase Ativada por Estresse
L-15	Meio de cultura Leibovitz-15
LB	Tampão de Carregamento de gel
MAPK	Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos
MAPKK	MAP-cinase-cinase
MAPKKK	MAP-cinase-cinase-cinase
MEK	MAP-cinase-cinase
MEM	Meio Mínimo de Eagle
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MOI	Multiplicidade De Infecção

MTase	Metiltransferase
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NaF	Fluoreto de Sódio
NC	Nucleocapsídeo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nsP1/2/3/4	Proteínas não estruturais do CHIKV (1,2,3 e 4)
Nups	Nucleoporinas
ORF	Janela Aberta de Leitura
PAHO	Organização Pan-Americana de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PDE3	Fosfodiesterase E3
PS	<i>Pool</i> Semente
PT	<i>Pool</i> Trabalho
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase tempo real
RSK	Cinase S6 Ribossomal
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida com reação em cadeia da polimerase
SC	Via Subcutânea
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino

SFV	Vírus da Floresta Semliki
shRNA	pequeno RNA em grampo
siRNA	pequenos RNAs de interferência
SNC	Sistema Nervoso Central
TA	Temperatura Ambiente
TCF	Fator Complexo Ternário
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFP/PFU	Unidades Formadoras de Placa
UTR	Região Não-Traduzida
UV	Ultravioleta
EEEV	Vírus da Encefalite Equina do Leste
Vero	Células de rim de macaco verde
VO	Via Oral
VSC	Via de Sinalização Celular
WB	<i>Western Blot</i>
WEEV	Vírus da Encefalite Equina do Oeste
WHO	Organização Mundial de Saúde
ZIKV	Zika virus



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
	<b>1.1 Chikungunya vírus</b>	<b>19</b>
	1.1.1 Taxonomia e origem	19
	1.1.2 Estruturas da partícula do CHIKV	21
	1.1.3 Proteínas virais	24
	1.1.4 Tropismo celular	27
	<b>1.2 Ciclo de multiplicação do CHIKV</b>	<b>28</b>
	<b>1.3 Vírus e infecção do CHIKV</b>	<b>33</b>
	1.3.1 Filogenia e virulência	33
	1.3.2 Aspectos epidemiológicos	34
	1.3.3 Ciclo de transmissão do CHIKV	38
	1.3.4 Características clínicas da doença	41
	<b>1.4 CHIKV e as vias de sinalização celular</b>	<b>43</b>
	1.4.1 Via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK)	43
	1.4.2 MAPK e vírus	45
	1.4.3 Inibidores de MAPKs como potenciais fármacos antivirais	46
	<b>1.5 Potenciais tratamentos antivirais frente ao CHIKV</b>	<b>46</b>
	1.5.1 IFs com potencial efeito antiviral	50
	<b>1.6 Modelos murinos para o CHIKV</b>	<b>51</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
	<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>56</b>
	3.1.1 Objetivos específicos	56
<b>4</b>	<b>FLUXOGRAMA</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAI E MÉTODOS</b>	<b>58</b>
	<b>5.1 Linhagens celulares</b>	<b>58</b>
	5.1.1 Células C6/36	58
	5.1.2 Células Vero ( <i>African green monkey kidney</i> )	58
	<b>5.2 Vírus</b>	<b>58</b>
	<b>5.3 Ensaios moleculares de confirmação viral (apêndice)</b>	<b>59</b>
	5.3.1 Análise do genoma de CHIKV por qPCR	59

5.3.2	Construção e teste dos iniciadores para caracterização do vírus de trabalho .....	60
5.3.3	Sequenciamento do amplicon gerado a partir do genoma de CHIKV .....	61
<b>5.4</b>	<b>Ensaio biológicos de caracterização .....</b>	<b>62</b>
5.4.1	Curva de multiplicação e ciclo único em C6/36 e Vero .....	62
5.4.2	Produção do pool trabalho .....	62
5.4.3	Titulação viral .....	62
5.4.4	Teste de termolabilidade .....	63
5.4.5	Curva de multiplicação e ciclo único do CHIKV .....	63
5.4.6	Quantificação por qPCR do RNA viral em tempos precoces ....	64
<b>5.5</b>	<b>Ensaio biológicos com inibidor farmacológico .....</b>	<b>65</b>
5.5.1	Ensaio virucida.....	65
5.5.2	Ensaio Dose-resposta do inibidor farmacológico .....	66
5.5.3	Curva de multiplicação e ciclo único do CHIKV após tratamento com inibidor farmacológico.....	67
<b>5.6</b>	<b>Análises microscópicas da infecção celular pelo CHIKV.....</b>	<b>67</b>
5.6.1	Microscopia eletrônica de transmissão.....	67
5.6.2	Microscopia eletrônica de varredura.....	69
5.6.3	Imunofluorescência e microscopia confocal .....	69
<b>5.7</b>	<b>Ensaio biológicos de infecção com CHIKV <i>in vivo</i>.....</b>	<b>70</b>
5.7.1	Produção de anticorpos em camundongos .....	71
5.7.2	Infecção com CHIKV dos camundongos C57BL/6 .....	71
5.7.3	Infecção com CHIKV dos camundongos A129.....	72
<b>5.8</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>6.1</b>	<b>Ensaio biológicos com inibidor farmacológico .....</b>	<b>76</b>
6.1.1	Ensaio virucida e ensaio dose-resposta de Trametinibe .....	76
6.1.2	Curva de multiplicação e ciclo único em presença do Trametinibe .....	78
6.1.3	Ensaio de imunofluorescência em presença do Trametinibe ....	81
6.1.4	Análise microscópica da infecção por CHIKV com tratamento pelo inibidor farmacológico.....	84
6.1.5	Ensaio de infecção com CHIKV em modelos murinos.....	97
<b>6.2</b>	<b>Caracterização morfológica do ciclo de multiplicação do chikungunya vírus. ....</b>	<b>106</b>
6.2.1	Penetração .....	106

6.2.2	Replicação.....	110
6.2.3	Síntese de proteínas .....	114
6.2.4	Morfogênese .....	116
6.2.5	Liberação .....	122
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>130</b>
	<b>RERÊNCIAS.....</b>	<b>131</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>131</b>
<b>A)</b>	<b>ENSAIOS BIOLÓGICOS DE PADRONIZAÇÃO.....</b>	<b>161</b>
A1)	Padronização da titulação viral .....	161
A2)	Curva de multiplicação em células C6/36, Vero e produção do pool trabalho de chikungunya vírus.....	162
A3)	Teste de termolabilidade.....	164
A4)	Produção de anticorpos primários policlonais em camundongos .	165
<b>B)</b>	<b>ENSAIOS MOLECULARES DE CARACTERIZAÇÃO .....</b>	<b>160</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>13172</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Chikungunya vírus

### 1.1.1 Taxonomia e origem

A espécie *Chikungunya virus* faz parte do gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*, ordem *Martellivirales*, classe *Alsuviricetes*, filo *Kitrinoviricota*, reino *Orthornavirae* e domínio *Riboviria* (WALKER *et al.*, 2020, ICTV, 2020). A espécie protótipo do gênero é o Sindbis virus (SINV) causador da febre sindbis em humanos. O gênero contém ao todo 31 espécies virais (HYDE *et al.*, 2015). Alguns critérios são utilizados para a separação entre as espécies do gênero, como: sequências de nucleotídeos e aminoácidos (aa), características antigênicas, vetores associados, hospedeiros, doença associada e características ecológicas (CHEN *et al.*, 2018; ICTV, 2019a). Diversas espécies do gênero possuem destaque devido à sua ampla disseminação mundial causando doenças em humanos (CHEN *et al.*, 2018).

Outras classificações também são encontradas. Dentre elas, uma classificação com base no complexo antigênico, sintomas, e na região do mundo no qual foram descritos a maior parte dos membros desse complexo. Nesse complexo existem dois grupos chamados de vírus do Velho Mundo e vírus do Novo Mundo. Os vírus do “Velho Mundo” foram principalmente descritos na região oriental do globo terrestre, produzem erupções cutâneas, poliartrites e pertencem ao complexo antigênico Semliki Forest virus (SFV). Os vírus do “Novo Mundo” foram descritos na região ocidental, causando como sintoma adicional encefalite e pertencem a três complexos antigênicos: Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), Eastern equine encephalitis virus (EEEV) e Western equine encephalitis virus (WEEV) (SCHAECHTER, 2009, RUPP *et al.*, 2015). Os vírus do velho mundo, incluem as espécies SFV, e o *Chikungunya virus* (CHIKV) e aqueles do Novo Mundo incluem o VEEV, EEEV e WEEV. Alguns desses vírus inicialmente encontravam-se isolados em regiões específicas, principalmente em partes da África e da Ásia, porém surtos ocorridos ao longo dos anos 2000 ampliaram os locais de distribuição desses patógenos (WEAVER, 2014). Muitos dos fatores de disseminação estão associados aos vetores das alfavíres. Os vetores são artrópodes, especificamente mosquitos,

embora carrapatos e mosquitos-palha também são comuns (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

Apenas um membro do gênero não é vetorizado por artrópodes a humanos – o *Eilat virus*, exclusivo de mosquito. Apesar disso, muitos autores descrevem esse grupo como arbovírus (do inglês *arthropod-borne virus*), apesar de não ser descrição taxonômica oficial no *international committee on taxonomy of viruses* (ICTV) (ICTV, 2019b). Os arbovírus em 1954 foram divididos em três grupos sorológicos (A, B e C) baseado em testes de inibição de hemaglutinação e reação cruzada (WHO; SCIENTIFIC GROUP ON ARBOVIRUS; HUMAN DISEASE, 1967). Após vários estudos, decidiu-se separar os arbovírus pertencentes ao grupo A, em um novo gênero, *Alphavirus*, nome recebido devido à letra “A” do grupo ao qual pertencia (CHEN *et al.*, 2018).

Muitas famílias virais compõem o grupo dos arbovírus descritos até agora. Dentre as famílias estão: *Peribunyaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Flaviviridae* e *Togaviridae* (HUBÁLEK; RUDOLF; NOWOTNY, 2014). Merecem ênfase dois gêneros: *Flavivirus*, pertencentes à família *Flaviviridae* e *Alphavirus*, já mencionados. O destaque ocorre devido ao impacto na saúde pública causado por vírus pertencentes a esses gêneros. Em especial, podem ser ressaltados os vírus causadores da dengue, zika (*Flavivirus*), da febre mayaro e febre chikungunya (CHIKF) (*Alphavirus*). Os membros dos dois gêneros compartilham algumas características como: semelhança da estrutura das partículas virais, sintomatologia, epidemiologia e vetores artrópodes. Essas semelhanças dificultam o discernimento entre as doenças causadas pelos vírus dos dois gêneros. Como é visto na sintomatologia causada devido à infecção pelo dengue vírus (DENV) e pelo CHIKV (ONG; LUM; NG, 2014).

O nome “chikungunya virus” foi criado devido ao sintoma clássico da doença, a artralgia. A palavra “*chikungunya*” foi originada do verbo raiz “*kungunyala*” que significa: “aquele que se torna contorcido” no dialeto Kimakonde da tribo Makonde. A doença ocorreu no distrito de Newala e alguns adjacentes pertencentes a TAnganyika, região da atual Tanzânia. Esse foi o local em que os primeiros casos da doença foram documentados em 1952, sendo o vírus isolado em 1953 (LUMSDEN, 1955; ROBINSON, 1955; ROSS, 1956).

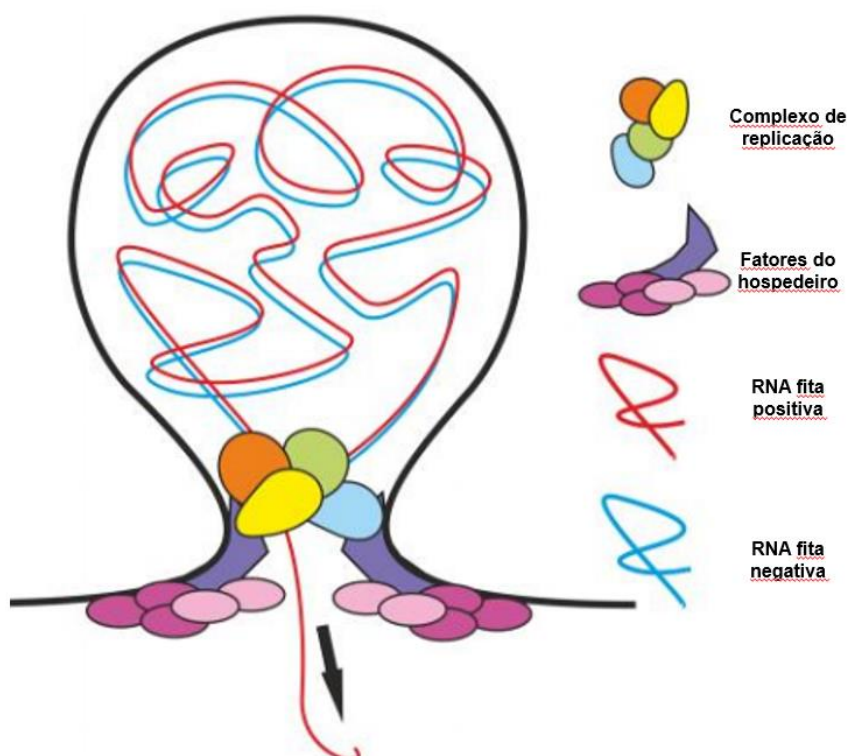
### 1.1.2 Estruturas da partícula do CHIKV

O CHIKV possui um genoma protegido por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica, contido em um envelope obtido da membrana plasmática do hospedeiro após brotamento. O nucleocapsídeo tem cerca de 40 nm e o vírion apresenta ~70 nm de diâmetro massa molecular de  $52 \times 10^6$  Da e densidade de  $1,22 \text{ g/cm}^3$  (**Figura 2**) (VANEY; DUQUERROY; REY, 2013). As partículas do vírus chikungunya, diferentemente de outros vírus com genoma de RNA, conseguem resistir a temperaturas em torno de  $58^\circ\text{C}$  (THIBERVILLE *et al.*, 2013).

O genoma do CHIKV é composto por um RNA fita simples, senso positivo (ssRNA+), não segmentado, com aproximadamente 11,8 kb. A organização do genoma apresenta uma região não codificadora 5' *Untranslated Region* (UTR), seguida por duas Janelas Abertas de Leitura (do inglês, *open reading frame* - ORF), finalizando com uma cauda 3' poliadenilada (poli-A). A primeira ORF forma duas possíveis poliproteínas não estruturais: P123 e P1234 e a segunda ORF, um RNA subgenômico 26S que origina a poliproteína estrutural.

A poliproteína P1234 gerada pela primeira ORF é clivada por protease do vírus (nsP2) e do hospedeiro. A clivagem gera quatro proteínas não estruturais (do inglês, *nonstructural Proteins* - nsPs), denominadas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, que compõem o complexo de replicação viral. Esse complexo de replicação induz a formação de estruturas conhecidas como esférulas pela membrana plasmática da célula infectada. A esférula consiste em uma evaginação da membrana junto com o complexo de replicação viral ancorado em seu gargalo, além de alguns fatores proteicos do hospedeiro (**Figura 1**) (PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017). Essas estruturas são formadas nas fases iniciais da infecção em torno de duas horas pós-infecção (hpi). Elas ajudam na evasão do sistema de defesa celular por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (THAA *et al.*, 2015), visto que, um RNA dupla fita intermediário é formado durante a replicação viral (UTT *et al.*, 2016).

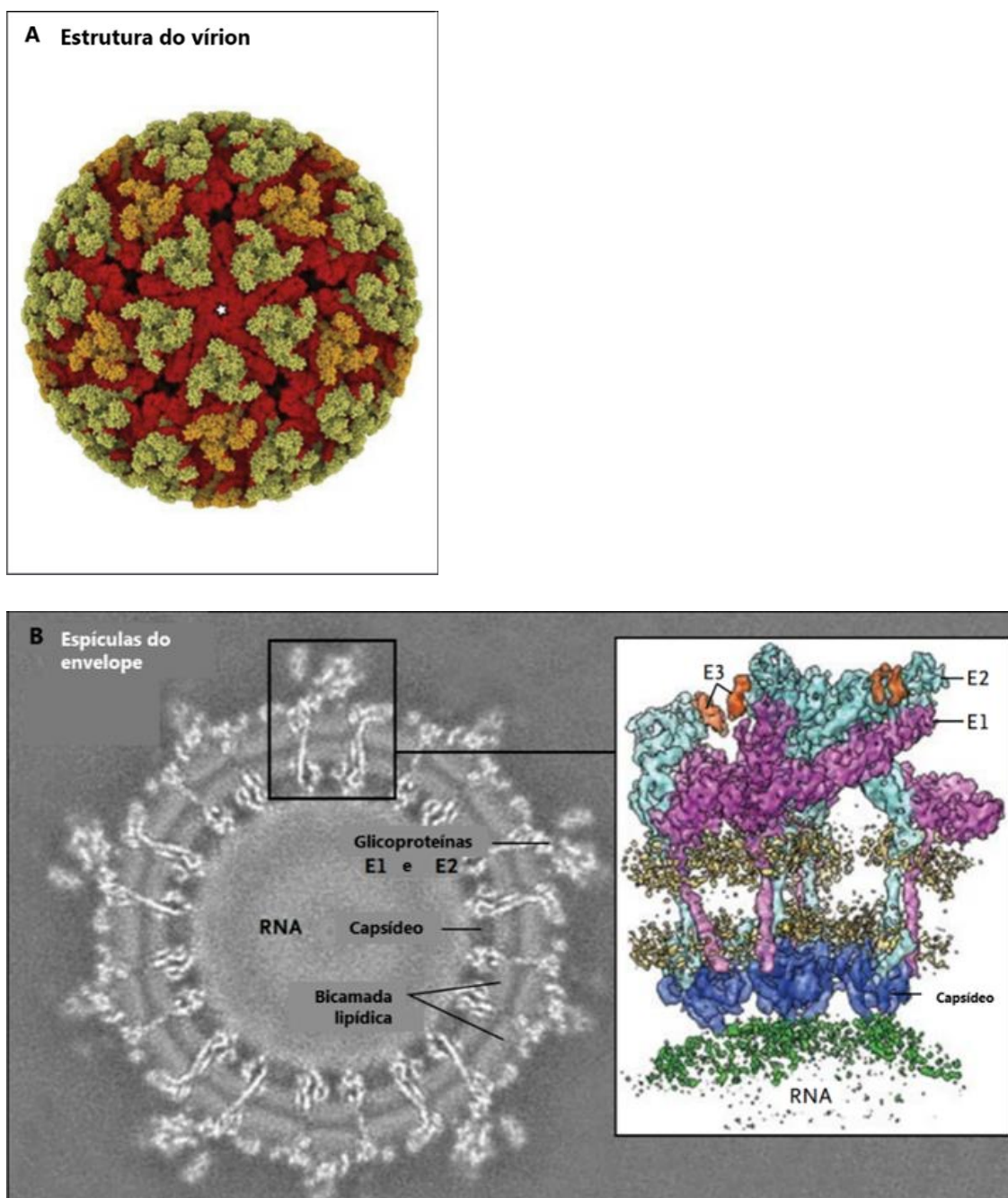




**Figura 1 – Composição da esférula do chikungunya vírus.**

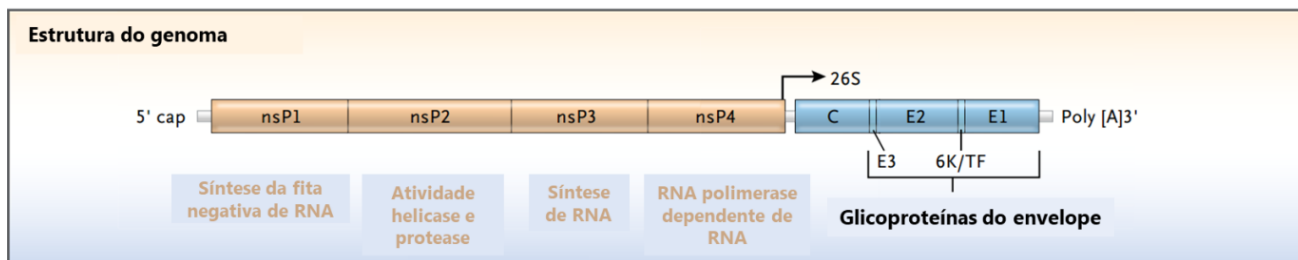
A esférula é formada por fatores proteicos do hospedeiro junto com o complexo de replicação viral (proteínas não estruturais – nsPs 1 a 4). Uma esférula abriga a fase intermediária do RNA dupla fita durante a replicação do chikungunya vírus. Fonte: Adaptado de Pietilä; Hellström; Ahola (2017).

A poliproteína estrutural C-E3-E2-6K/TF-E1ORF gerada pela segunda ORF a partir de um RNA subgenômico é produzida em fase tardia da infecção. A poliproteína é clivada tanto pela proteína do capsídeo viral C (proteína C), quanto por proteases do hospedeiro. A clivagem origina a proteína C, E3, E2, 6K/TF e E1 (**Figuras 2 e 3**). As proteínas E1 e E2 serão maturadas em glicoproteínas e formarão um heterodímero compondo as espículas triméricas presentes no envelope viral. Três dímeros (E1-E2)<sub>3</sub> constituem uma única espícula, que é responsável pela adesão e penetração viral (**Figura 2**). As glicoproteínas formam 240 cópias de E1 e E2 na partícula resultando em 80 espículas totais. As espículas formam um arcabouço icosaédrico ordenado que se conecta ao nucleocapsídeo com número de triangulação  $T = 4$ . A proteína E3 está ausente em grande parte dos alfavírus, e apresenta papel no impedimento da maturação precoce das espículas, que será detalhado posteriormente (ONG; LUM; NG, 2014, RUPP *et al.*, 2015). O gene de 6K, possui proposições baseadas em resultados para suas funções, que também serão abordadas posteriormente. O gene de TF, por sua vez, possui região de leitura sobreposta ao gene de 6K, sendo o último gene descrito do genoma do CHIKV (SNYDER *et al.*, 2013).



**Figura 2 - Organização geral da partícula do chikungunya vírus.**

A partícula viral do chikungunya vírus possui simetria icosaédrica, envelopada, com cerca de 70 nm de diâmetro. (A) Estrutura do vírion e (B) Corte da estrutura exibindo capsídeo e envelope viral. Envelope com glicoproteínas. E1 representada em rosa, E2 em azul claro, E3 em laranja. C em azul escuro, Envelope viral em amarelo e o RNA em verde. Em (B) o corte aponta a conexão entre as espículas virais (E1-E2) e as proteínas do capsídeo. Fonte: Adaptado de Weaver; Lecuit (2015).



**Figura 3 – Estrutura do genoma do chikungunya vírus.**

O genoma do chikungunya vírus é constituído por RNA fita simples (ssRNA), com polaridade positiva, apresentando ~11,8 kb. Está organizado em duas regiões codificadoras, do qual as proteínas não estruturais do vírus (nsP1-4) estão codificadas pela porção 5' do genoma, e as proteínas estruturais estão codificadas na região 3'. O genoma viral possui cap na extremidade 5' e cauda de poli(A) na extremidade 3'. Fonte: Adaptado de Weaver; Lecuit (2015)

### 1.1.3 Proteínas virais

Cada nsP possui atividades relacionadas à replicação do genoma viral, atuando nas fases precoces da infecção viral. A proteína nsP1 possui 60 kDa e 540 aa, atividade metiltransferase, guaniltransferase e pode estar relacionada à adição do cap-5' do RNA (RUPP *et al.*, 2015). É a única proteína não estrutural diretamente associada à membrana, responsável por ancorar o complexo de replicação. Outra atividade sugerida por alguns autores indica que nsP1 pode estar associada à iniciação e manutenção do RNA fita negativa intermediário (WANG; SAWICKI; SAWICKI, 1991, JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

A proteína nsP2 possui cerca de 90 kDa e 807 aa e apresenta múltiplas funções. Seu domínio N-terminal contém atividade helicase e também atividade RNA trifosfatase (VASILJEVA *et al.*, 2000). Anteriormente, acreditava-se que como os outros alfavírus a porção C-terminal continha um único domínio com atividade cisteína protease similar à papaína. Porém, foi sugerido que esse domínio não atuasse como protease similar à papaína (SAISAWANG *et al.*, 2015). Para a atividade protease ela também necessita do seu outro domínio: um domínio não-funcional metiltransferase, o qual, também pode estar relacionado à regulação da síntese da fita negativa de RNA, além da indução de efeitos citopáticos (ECP) nas células infectadas (MAYURI *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2018). Como protease, ela é responsável por clivar a poliproteína não estrutural P1234 nos componentes protéicos intermediários e finais (STRAUSS *et al.*, 1992). Além disso, sugere-se que

a nsP2 é responsável pelo desligamento (*shutoff*) da tradução das proteínas do hospedeiro nas células infectadas (AKHRYMUK; KULEMZIN; FROLOVA, 2012).

A proteína nsP3 possui cerca de 60 kDa, 556 aa e possui caracterização incompleta. Apesar de trabalhos com mutações no gene codificador dessa proteína mostrarem defeitos na iniciação da fita negativa de RNA ou na síntese de RNA subgenômico, outras funções permanecem desconhecidas (RUPP *et al.*, 2015). É constituída por três domínios: o macrodomínio; o domínio único de alfavírus e uma região hipervariável. O macrodomínio na porção N-terminal possui atividade de ligação ao ácido nucleico e atividade fosfatase. Essa porção N-terminal é conservada em todos os alfavírus, apesar de não possuir a mesma função em todos (PARK; GRIFFIN, 2009). O domínio único de alfavírus está contido em uma porção central de nsP3 e também compartilha uma sequência homóloga entre os alfavírus. Alterações genéticas induzidas na estrutura do domínio único de alfavírus provocam alteração na síntese do RNA fita negativa e RNA subgenômico, além de provocar alteração no processamento da poliproteína e na neurovirulência. No entanto, os mecanismos exatos dessas alterações não são determinados (TUITTILA; HINKKANEN, 2003). Por fim, a região hipervariável é tolerante a muitas alterações, apesar de alguns trabalhos com mutações nessa região mostrarem uma diminuição da virulência (AASKOV *et al.*, 2011, FOY *et al.*, 2013).

A última nsP, a proteína nsP4 tem cerca de 70 kDa e 610 aa, sendo a RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) dos alfavírus. Ela também possui atividade transferase terminal. Dentre as proteínas não estruturais, é geralmente sintetizada em menor quantidade (TOMAR *et al.*, 2006). Estudos com mutação no domínio N-terminal dessa proteína demonstram possíveis atividades com o RNA de senso negativo e com o RNA senso positivo (RUPP; JUNDT; HARDY, 2011).

A proteína C possui 264 aa e é a primeira a ser separada da poliproteína estrutural. Durante a tradução, a proteína C cliva a si própria da poliproteína estrutural por meio de uma atividade autocatalítica serina protease. Após a clivagem, subunidades C são formadas, as quais interagem entre si para formar o nucleocapsídeo (NC). Durante a morfogênese, o NC internaliza o RNA genômico. Na liberação, cada monômero C interage, em uma proporção de um para um, com a porção citoplasmática da glicoproteína transmembrana E2 (Figura 2). Dessa maneira, a morfogênese das partículas ocorre em locais especificamente endereçados com a ligação entre o NC e E1-E2. Além disso, no processo de desnudamento do capsídeo

os monômeros C interagem com os ribossomos liberando o genoma no citoplasma da célula infectada (SKOGING; LILJESTRÖM, 1998, JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

A glicoproteína E1 possui 439 aa e é uma proteína de fusão classe II. Na penetração, é responsável pela fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal da célula hospedeira. Após essa fusão, as glicoproteínas E1 são convertidas em poros íon-permeáveis na membrana endossomal. Esse processo ocorre simultaneamente a liberação do NC no citoplasma. Os poros levam a um efluxo de íons do endossomo para o citoplasma o que gera a diminuição do pH. Dessa maneira, propicia um ambiente levemente acidificado que, junto com a interação proteína C e ribossomos, funciona como gatilho de dissociação do NC no citoplasma. A proteína E1 possui uma hélice transmembrana que atravessa a bicamada fosfolipídica da célula hospedeira, além de uma cauda citoplasmática (WENGLER *et al.*, 2003, ROUSSEL *et al.*, 2006, AGGARWAL *et al.*, 2012). A estrutura dessa proteína é muito similar à estrutura da proteína E dos flavivírus diferindo-se quanto à orientação na membrana lipídica e em suas funções. Nos flavivírus a proteína E está orientada paralelamente e nos alfavírus a proteína E1 está perpendicular à membrana. Nos flavivírus a proteína E apresenta a função tanto de ligação ao receptor celular, quanto de fusão ao endossomo, enquanto nos alfavírus essas funções são exercidas pela proteína E2 e E1, respectivamente (HERNANDEZ; BROWN; PAREDES, 2014).

A glicoproteína E2 tem 423 aa e participa da ligação ao receptor celular induzindo à penetração viral, que é efetuada via endocitose mediada por clatrina. Essa proteína permanece ligada à E3, sob a forma de um precursor chamado pE2 ou p62 até sua maturação no aparelho de Golgi. No aparelho de Golgi, junto com a proteína E1 forma um heterodímero antes de ser completamente maturada. Assim como E1, também possui uma hélice transmembrana que atravessa a bicamada fosfolipídica e uma cauda citoplasmática (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2006; VANEY; DUQUERROY; REY, 2013).

A proteína E3 possui 64 aa e está presente na maioria dos alfavírus, incluindo o CHIKV. Ela é clivada do seu precursor p62 no aparelho de Golgi pela protease furina da célula hospedeira. E3 medeia o dobramento correto de p62 e controla a formação das espículas pela interação com a proteína E1. É atribuído a ela o início do processo de heterodimerização de p62 e E1 (p62-E1). Além disso, E3 também protege a fusão precoce do heterodímero E1-E2 com a membrana plasmática, pois

a clivagem de E3 é um pré-requisito para que as partículas virais sejam competentes para o processo de fusão (RYMAN; KLIMSTRA; JOHNSTON, 2004, SJÖBERG; LINDQVIST; GAROFF, 2011).

Duas pequenas proteínas também fazem parte da ORF estrutural, as proteínas 6K e TF. A proteína 6K possui 55 aa e 6 kDa, e é incorporada aos vírions em pequenas quantidades. Estima-se que existam de 5 a 10 moléculas dessa proteínas por vírion. Apesar de não possuir uma localização clara na partícula viral, problemas na região codificadora de 6k reduzem a capacidade infecciosa da partícula. Supõe-se que é componente importante no processo de brotamento viral, formação dos vírions e liberação das partículas. Também possui atividade putativa de canal de íons (SANZ; CARRASCO, 2001, MCINERNEY *et al.*, 2004). A proteína *transframe* (TF) foi descrita posteriormente às demais proteínas e possui função não completamente elucidada. É uma proteína transmembrana de 70 aa associada à montagem e brotamento dos vírions, com atividade putativa de canal de íons (SNYDER *et al.*, 2013).

#### 1.1.4 Tropismo celular

O CHIKV multiplica-se em uma variedade de células em seus hospedeiros vertebrados e invertebrados. Existe uma série de receptores putativos disseminados em uma ampla gama de tipos celulares. Alguns receptores foram descritos como responsáveis pela ligação viral, como o Mxra8 e o Proibitina 1 (PHB1) (WINTACHAI *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2018). No entanto, outros só foram comprovados em outras espécies de alfavírus, como glicosaminoglicanas (GAGs), a proteína de domínio de mucina e imunoglobulina 1 de célula T (TIM-1). Sugere-se que a variação da natureza de hospedeiros (invertebrados e vertebrados) amplia mais ainda a diversidade dos receptores (WEBER *et al.*, 2017; MATUSALI *et al.*, 2019).

Em seus hospedeiros invertebrados, o vírus infecta: células do intestino médio, células traqueais, células do ovário e células acinares das glândulas salivares, o qual são todas permissivas (FORRESTER *et al.*, 2012). Em hospedeiros humanos, foram descritas as células do sítio primário de infecção, a pele, e de sítios secundários como músculos e articulações. Também foi demonstrado presença de partículas virais no tecido linfóide, fígado, baço e cérebro (MATUSALI *et al.*, 2019). Para o sítio primário, as células permissivas ao vírus são: fibroblastos de pele, queratinócitos e melanócitos. Para os músculos: miotubos, fibroblastos, células satélites. Para as

articulações: condrócitos, osteoblastos, macrófagos e fibroblastos (SCHWARTZ; ALBERT, 2010; MATUSALI *et al.*, 2019). Além dessa variedade de células, células endoteliais do fígado, macrófagos do baço, além de células epiteliais e endoteliais do cérebro podem ser infectadas (LIM; CHU, 2014).

Em estudos com modelos *in vivo* foi demonstrada a presença do antígeno viral em células dendríticas do baço, mas não da pele (incluindo as células dendríticas plasmocitoides) (SCHILTE *et al.*, 2010). Alguns estudos *in vitro* demonstraram as variações do tropismo celular do vírus a linhagens de células contínuas. Dentre as linhagens testadas, apenas as linhagens de células sanguíneas foram refratárias à infecção viral. Porém, em um estudo com macacos (*Macaca fascicularis*), monócitos do sangue desses animais foram infectados e produziram altas taxas de IFN I (LABADIE *et al.*, 2010). Duas células de linhagens aderentes apresentaram uma forte ligação durante a adesão viral, células Vero e BEAS-2B, sendo que essas também apresentaram um maior grau de infecciosidade pelo CHIKV (SOURISSEAU *et al.*, 2007). Em estudos com pacientes, os antígenos virais foram detectados por imunohistoquímica em biópsia de células musculares e fibroblastos articulares, da derme e do músculo esquelético (OZDEN *et al.*, 2007; COUDERC *et al.*, 2008a). As células associadas à persistência viral ainda são frutos de investigação. No entanto, um estudo demonstrou em modelo *in vivo*, que os macrófagos seriam as principais células associadas à persistência viral (LABADIE *et al.*, 2010).

## 1.2 Ciclo de multiplicação do CHIKV

O ciclo de multiplicação do CHIKV se inicia com a união da espícula viral E1-E2 aos receptores da célula do hospedeiro; não são claros os receptores específicos relacionados ao CHIKV (SOLIGNAT *et al.*, 2009). A glicoproteína de membrana viral E2 é a responsável pela primeira interação vírus-célula. Existem algumas hipóteses sobre os mecanismos de ligação viral aos receptores. Uma delas propõe que em células de hospedeiros diferentes, existam receptores conservados. A outra hipótese propõe que o vírus seja capaz de interagir com múltiplos receptores celulares distintos entre os hospedeiros. Na interação com o receptor a conformação da espícula E1-E2 é modificada induzindo a formação de um endossomo (LUNDSTROM, 2016). Classicamente, é conhecido que o CHIKV penetre por meio de endocitose mediada por clatrina, porém um estudo recente demonstrou que o CHIKV consegue penetrar em células musculares humanas por meio de

macropinocitose. Apesar disso, não existem imagens microscópicas que demonstrem este mecanismo (HUA *et al.*, 2019).

O endossomo formado após a ligação viral, contendo o vírus, possui pH levemente ácido. O baixo pH é o gatilho para desencadear a desestabilização do heterodímero E1-E2 por meio de mudança conformacional e indução da liberação do NC (primeiro desnudamento). Um peptídeo de fusão de E1 é exposto após a dissociação entre E1-E2, o que desencadeia a inserção de E1 na membrana endossomal, em um processo dependente de colesterol, se tornando poros (canais de íon) e induzindo a liberação do capsídeo. O exato papel do colesterol no processo de fusão ainda é desconhecido. O canal de íon formado por E1 permite a efusão de H<sup>+</sup> do endossomo para o citoplasma o que gera a acidificação local. Dois gatilhos são sugeridos para o desnudamento do RNA genômico no citoplasma. O primeiro é a diminuição do pH no citoplasma que ocorre devido a mudança de E1. E o segundo é a interação das proteínas C com os ribossomos do hospedeiro que provoca o desnudamento do genoma (segundo desnudamento). Ambos os desnudamentos ocorrem de forma simultânea durante a fusão de E1 com a membrana endossomal (GRIFFIN, 2013; KIELIAN; REY, 2006).

O genoma é traduzido nas poliproteínas p123 e p1234 que originam as proteínas não estruturais. Essas poliproteínas são clivadas pela nsP2, que contém atividade protease, e geram as proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, que compõem o complexo de replicação viral, as esférulas virais, como mencionado anteriormente. Muitas funções das nsPs ainda são desconhecidas ou tem atividade putativa (GRIFFIN, 2013; SILVA; DERMODY, 2017). As esférulas, contendo o complexo de replicação, são formadas nas fases precoces do ciclo e ancoradas pela nsP1 na membrana plasmática. Nas esférulas, a partir do RNA genômico 49S é produzido o RNA senso negativo (gerando uma fase intermediária de RNA dupla fita) que serve de molde para um RNA genômico e para o mRNA 26S subgenômico. O RNA 26S codifica a poliproteína estrutural na fase tardia da infecção que é traduzida na poliproteína C-pE2(E3-E2)-6K-TF-E1. Ao longo da infecção as esférulas são internalizadas com via rede actina-miosina do citoesqueleto e formam uma estrutura conhecida como vacúolo citopático do tipo I (CPV-I). O papel do CPV-I na replicação é desconhecido (FROLOVA *et al.*, 2010).

A poliproteína estrutural é processada por proteases do hospedeiro e do vírus, a proteína C se autocliva da poliproteína estrutural, enquanto o restante da

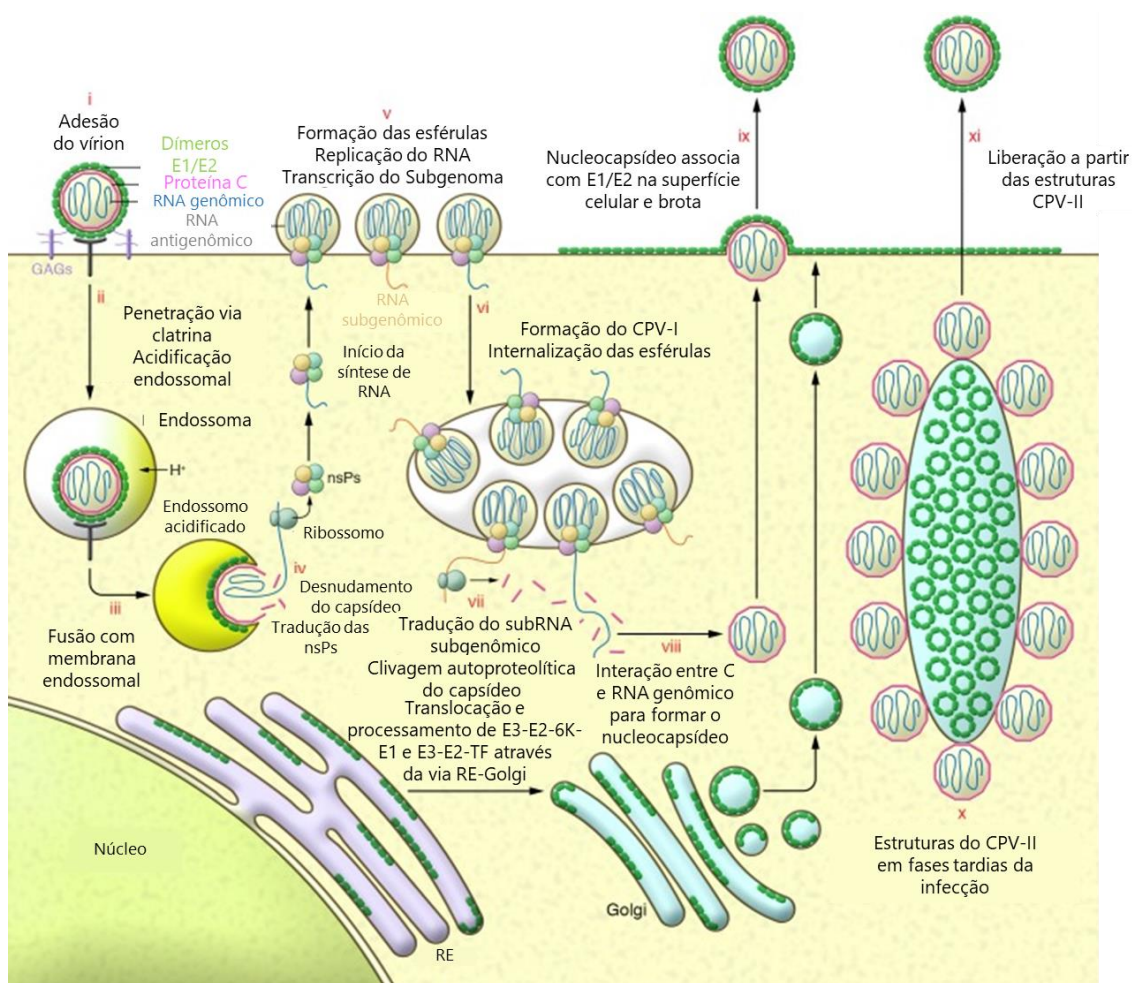


poliproteína é encaminhada para o retículo endoplasmático e aparelho de Golgi. No Golgi, as glicoproteínas de membrana E2, E1, 6K e TF são maturadas e transportadas para a membrana plasmática, as proteínas E3-E2, na forma de seu precursor PE2 só são clivadas em E3 e E2 na rede trans-Golgi. Essas proteínas são clivadas pela furina do hospedeiro, após serem liberada do aparelho de Golgi e antes de chegar à membrana. E3 é liberada pela maioria dos alfavírus, mas alguns a retém no vírion. A função de E3 além de separar a ligação precoce E1-E2, é desconhecida. As proteínas C interagem entre si para formar o NC e iniciam a encapsidação do genoma, é necessário o contato com o genoma para iniciar a montagem. A morfogênese é realizada no citoplasma e em muitos casos a presença de membranas é observada, a montagem passo a passo ainda não foi demonstrada. Após, ou durante a morfogênese, as espículas virais maduras na membrana plasmática se conectam às proteínas do capsídeo, demonstra-se que por meio de E2, para iniciar a liberação.

O processo de liberação depende da interação das proteínas do capsídeo com as glicoproteínas de membrana. Essa interação pode ocorrer antes nos vacúolos citopáticos do tipo II (CPV-II), já que existem glicoproteínas nos cernes dessas estruturas. Porém, essa interação nos CPV-II não foi comprovada. Esses vírions são liberados por brotamento, adquirindo envelope a partir da membrana bilipídica do hospedeiro. Em alguns alfavírus o brotamento é polarizado e demonstra-se que dependa de colesterol presente na membrana. Supõe-se também que a proteína 6K participe do processo de brotamento (Figura 4) (STRAUSS; STRAUSS, 1994; LI *et al.*, 2010; SILVA; DERMODY, 2017). A liberação por exocitose foi descrita, sendo liberadas várias partículas em formação de colméia, porém mais detalhes não foram relatados (CHEN *et al.*, 2013).

A maioria dos estudos que descrevem o ciclo de multiplicação do CHIKV são baseados em outros alfavírus, principalmente a espécie protótipo do gênero, *Sindbis virus* (SILVA; DERMODY, 2017). Entretanto, várias características diferenciam as espécies de alfavírus, tais como: sequência de nucleotídeos ou aminoácidos, doença associada, espécie dos vetores e hospedeiros associados (CHEN *et al.*, 2018; SILVA; DERMODY, 2017). Até aqui, o ciclo de multiplicação completo do CHIKV permanece desconhecido. Em especial, os estágios de penetração, montagem, maturação, brotamento e outros processos finais da infecção, permanecem obscuros (SCHNIERLE, 2019; SOLIGNAT *et al.*, 2009). Além disso, os receptores proteicos,

as proteínas envolvidas na produção viral e o papel dos CPV-II não é claro (**SILVA; DERMODY, 2017; SOLIGNAT *et al.*, 2009**).



**Figura 4 – Ciclo de multiplicação dos alfavírus.**

O ciclo de multiplicação inicia com a adesão do vírus no receptor celular (topo à esquerda), depois ocorrem a endocitose mediada por receptor via clatrina, a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, liberação e desmontagem do nucleocapsídeo e a liberação do RNA genômico. As proteínas nsPs que formam o complexo de replicação são então sintetizadas, processadas e vão para a membrana plasmática para formar as esférulas (fundo à esquerda). Nessas estruturas ocorre a replicação do RNA genômico e produção do RNA subgenômico. No citoplasma irá ocorrer a tradução do mRNA subgenômico em proteínas estruturais (parte inferior central). Ao longo da infecção as esférulas são internalizadas e formam uma estrutura chamada vacúolo citopático I (CPV-I). A partir do RNA subgenômico é traduzida a poliproteína estrutural e as glicoproteínas são translocadas por meio do RE, processadas e transportadas passando do aparelho de Golgi para a membrana plasmática (direita). A montagem citoplasmática do RNA genômico e do capsídeo produz o cerne do nucleocapsídeo, o qual associa-se com as glicoproteínas processadas na membrana plasmática resultando no brotamento viral (topo à direita). Na fase tardia da infecção são formados vacúolos citopáticos do tipo II (CPV-II) que são compostos por vários nucleocapsídeos com as glicoproteínas contidas em vesículas ao centro (parte esquerda da imagem). RE: Reticulo Endoplasmático e nsP: Proteína não- estrutural. Fonte: Adaptado de Silva and Dermody (2017).

### 1.3 Vírus e infecção do CHIKV

O CHIKV é transmitido entre hospedeiros humanos por meio da picada de mosquitos fêmeas em busca de repasto sanguíneo. Duas espécies são as mais comuns: o *Aedes albopictus* e o *Aedes aegypti*. Ambas se alimentam ao ar livre, mas usualmente o *A. aegypti* também se alimenta no interior de domicílios. Estes mosquitos também são vetores de outras arboviroses como a dengue e a zika, o que eventualmente acarreta casos de coinfeção com essas viroses. Via de regra, esses artrópodes tem seu pico de atividade no início da manhã e no fim da tarde. Na África, o *Ae. furcifer-taylori*, o *Ae. luteocephalus*, *Culex annulirostris*, *Mansonia uniformis* e outros, do mesmo modo transmitem o CHIKV (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012, THIBERVILLE *et al.*, 2013).

A CHIKV gera uma série de sintomas e sinais inespecíficos que podem variar dependendo da idade e estado imunológico dos indivíduos acometidos. Contudo, dentre os sintomas mais comuns o desenvolvimento de febre alta de rápido início e artralgia ou poliartralgia grave são os mais habituais na maior parte dos pacientes. Além desses, outros sintomas também podem estar presentes como: exantemas, mialgia, náuseas, fadiga, dor de cabeça e em raros casos até encefalite e meningoencefalite (POHJALA *et al.*, 2011, MONTERO, 2015). O humano é transmissor do vírus ao mosquito, durante todo o período da doença, no qual é variado. O mosquito por meio da ingestão de sangue contaminado se torna infectado e infectante a partir de 48 horas após o repasto, tempo necessário para a replicação do vírus (WHO, 2016).

#### 1.3.1 Filogenia e virulência

Existem três genótipos de CHIKV baseados na sequência de aa da proteína E1. Esses genótipos foram nomeados de acordo com a região de descrição original em genótipos: oeste africano (do inglês, *West African*); África central, sul e leste (ECSA) (do inglês, *Eastern-Central and Southern African*) e asiático (do inglês, *Asian*). O genótipo oeste africano apresenta de 11.843 a 11.881 nucleotídeos, enquanto os genótipos ECSA e o asiático apresentam de 11.557 a 11.789 e de 11.777 a 11.999 nucleotídeos, respectivamente (PRESTI *et al.*, 2014, MONTERO, 2015). Uma linhagem originada do genótipo ECSA é constantemente destacada e circulou na região do oceano Índico, sendo denominada linhagem do oceano Índico

(IOL) (do inglês, *indian ocean lineage*) (WEAVER; FORRESTER, 2015, PETERSEN; POWERS, 2016).

A linhagem IOL originou-se em regiões temperadas devido à presença do *A. albopictus*, que possui uma maior competência vetorial para esta linhagem. Essa competência vetorial aumentada ocorreu em consequência de uma substituição de alanina por uma valina na posição 226 da glicoproteína viral E1 (E1-A226V) e da substituição de uma leucina por uma glutamina na posição 210 de E2 (E2-L210Q) (NUNES *et al.*, 2015, WEAVER; FORRESTER, 2015). A mutação E1-A226V ampliou a infecciosidade do CHIKV (*fitness*) nas células do intestino médio do *A. albopictus* de 50 a 100 vezes, enquanto que a mutação E2-L210Q contribuiu para o aumento do *fitness* viral de 4 a 6 vezes (TSETSARKIN; WEAVER, 2011).

Os três genótipos eram inicialmente restritos à região de origem, sendo o primeiro genótipo descrito (oeste africano) endêmico à África subsaariana. Já os genótipos ECSA e asiático possuem um perfil mais epidêmico mundial (CAO-LORMEAU; MUSSO, 2014). A ocorrência dos genótipos ficou estagnada após um longo período sem grandes surtos notificados. Isso mudou a partir de 2004, no qual muitos casos pela primeira vez foram notificados em locais distantes da região de origem. Dentre esses locais, as Américas foi um dos principais atingidos em 2013, considerada não endêmica até então (PRESTI *et al.*, 2016).

O CHIKV foi descrito pela primeira vez em 5 de dezembro de 2013 como tendo estabelecido seu ciclo de transmissão nas Américas. O vírus do genótipo asiático foi notificado primeiro em *Saint Martin* no Caribe. O primeiro caso autóctone do CHIKV (genótipo asiático) no Brasil foi identificado em 13 de setembro de 2014 na cidade de Oiapoque no estado do Amapá. Apesar disso, o genótipo asiático não estabeleceu um ciclo vetor-humano no Brasil, diferentemente de outros lugares da América. Sete dias depois, outros casos autóctones também foram identificados, dessa vez em Feira de Santana na Bahia, porém o genótipo identificado foi o ECSA (DONALISIO; FREITAS, 2015, NUNES *et al.*, 2015).

### 1.3.2 Aspectos epidemiológicos

Apesar do crescimento da participação do *A. albopictus* na transmissão da CHIKV, em áreas urbanas o *A. aegypti* ainda é o vetor mais competente por picar preferencialmente humanos. Adicionalmente, o *A. aegypti* necessita repastar várias pessoas para ter alimentação completa em seu ciclo gonotrófico. Diferentemente, o

*A. albopictus*, via de regra, realiza uma única alimentação. Dessa maneira, o *A. aegypti* pode contaminar um maior número de indivíduos no qual tem contato no repasto sanguíneo, potencializando a disseminação do CHIKV (REITER, 2007, WEAVER; FORRESTER, 2015).

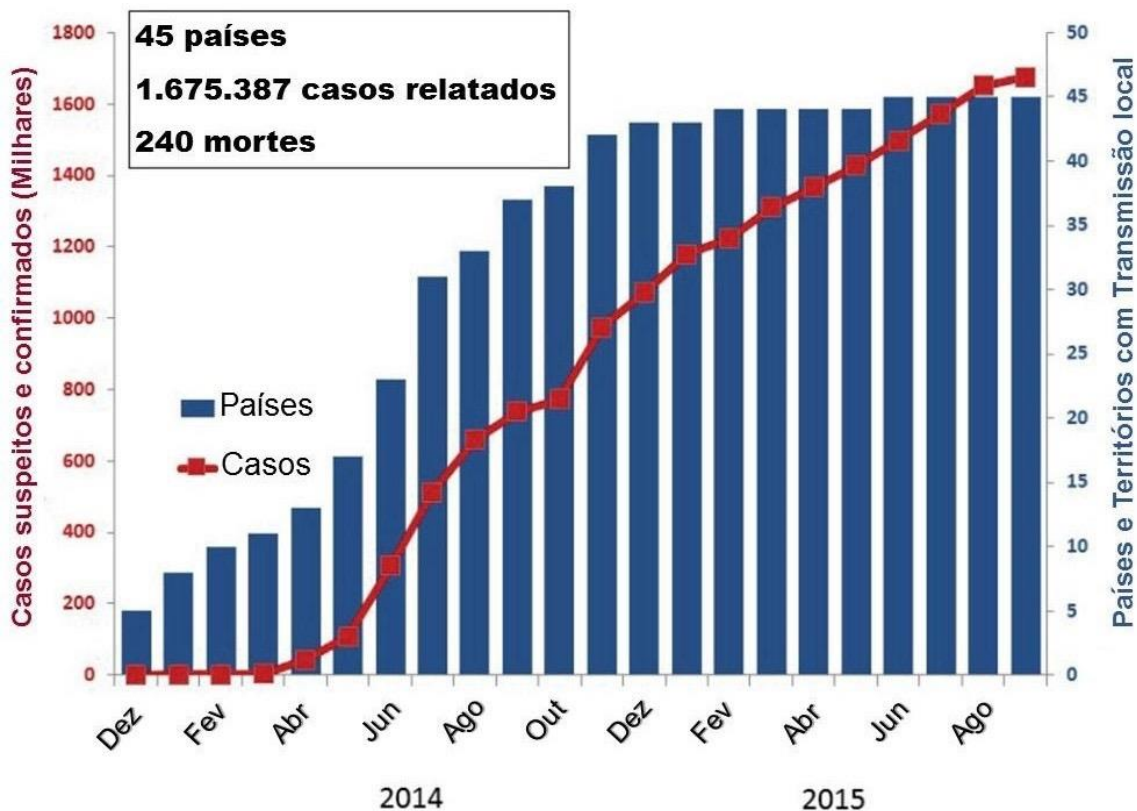
É descrito que a CHIKF ocorra na África há muitos séculos tendo os primeiros surtos exportados para a Ásia e as Américas nos séculos XVIII e XIX. A disseminação da doença ocorreu por meio de embarcações e tráfico de escravos, sendo confundida inicialmente com a dengue (HALSTEAD, 2015). O primeiro surto na era científica moderna foi identificado em 1952 em razão da baixa incidência de malária no local. Essa baixa incidência, facilitou o reconhecimento da doença que tinha sintomas característicos como febre alta de início rápido, dores nas articulações e ocasionalmente erupções cutâneas (POWERS *et al.*, 2000).

A disseminação da doença para áreas antes não afetadas, tem como principais motivos, o aumento da temperatura global e a globalização. O aumento da temperatura leva as espécies de mosquitos não nativas a invadirem e colonizarem áreas antes inóspitas, além de aumentar a longevidade dos vetores e diminuir o período de incubação extrínseco (MOURYA; YADAV; MISHRA, 2004). A globalização facilitou o aumento de viagens pelos hospedeiros humanos e a ocupação de áreas rurais e perirrurais. A globalização também gerou crescimento urbano descontrolado, dificultando medidas de controle adequadas dos vetores (TEIXEIRA *et al.*, 2015, WILSON; SCHLAGENHAUF, 2016).

Entre 2004 e 2006, o vírus chikungunya reemergiu, gerando grandes epidemias na África oriental, Índia, Sri Lanka e em algumas regiões do oceano Índico, incluindo a ilha francesa de La Reunion (WAHID *et al.*, 2017). O surto pelo vírus, ocorrido na ilha afetou 300.000 de 787.836 habitantes, gerando 38,2% de soroprevalência. Foram notificadas 257 mortes, o que gerou uma grande elevação das pesquisas relacionadas ao CHIKV, principalmente por parte das autoridades da França (ENSERINK, 2007, SCHWARTZ; ALBERT, 2010, WEAVER; FORRESTER, 2015).

O CHIKV, genótipo asiático, foi inicialmente introduzido nas ilhas do Caribe em 2013 e disseminado para outras regiões da América, totalizando quase 1,7 milhão de casos notificados confirmados da doença (Figura 5) (CDC, 2016a, PETERSEN; POWERS, 2016). Até 2019, o número de países e territórios em que casos da doença já foram notificados são de, 33 na África, 21 na Ásia, 2 na Europa, 12 na Oceania

junto com as Ilhas do Pacífico e 47 nas Américas, totalizando 115 países e territórios acometidos. Não foram contabilizados lugares com ocorrência somente de casos importados da doença (Figura 6) (CDC, 2020).



**Figura 5 – Número de países ou territórios nas Américas com transmissão local do CHIKV.** Número de casos relatados a Organização Pan-americana de Saúde, por mês, de Dezembro de 2013 a Setembro de 2015. Fonte: Peterson; Powers (2016).







foram confirmados por testes clínicos e laboratoriais. Para o controle do vírus, funcionários da saúde treinados para o diagnóstico diferencial entre o DENV, ZIKV e o CHIKV, programas educacionais e um sistema nacional ativo de vigilância são imprescindíveis (WEAVER, 2014). Dados do Brasil mostram que até outubro de 2020, 71.698 casos prováveis de infecção por CHIKV foram notificados (SE 38), com as maiores taxas presentes nas regiões NE e SE (MS. SVS, 2020).

### 1.3.3 Ciclo de transmissão do CHIKV

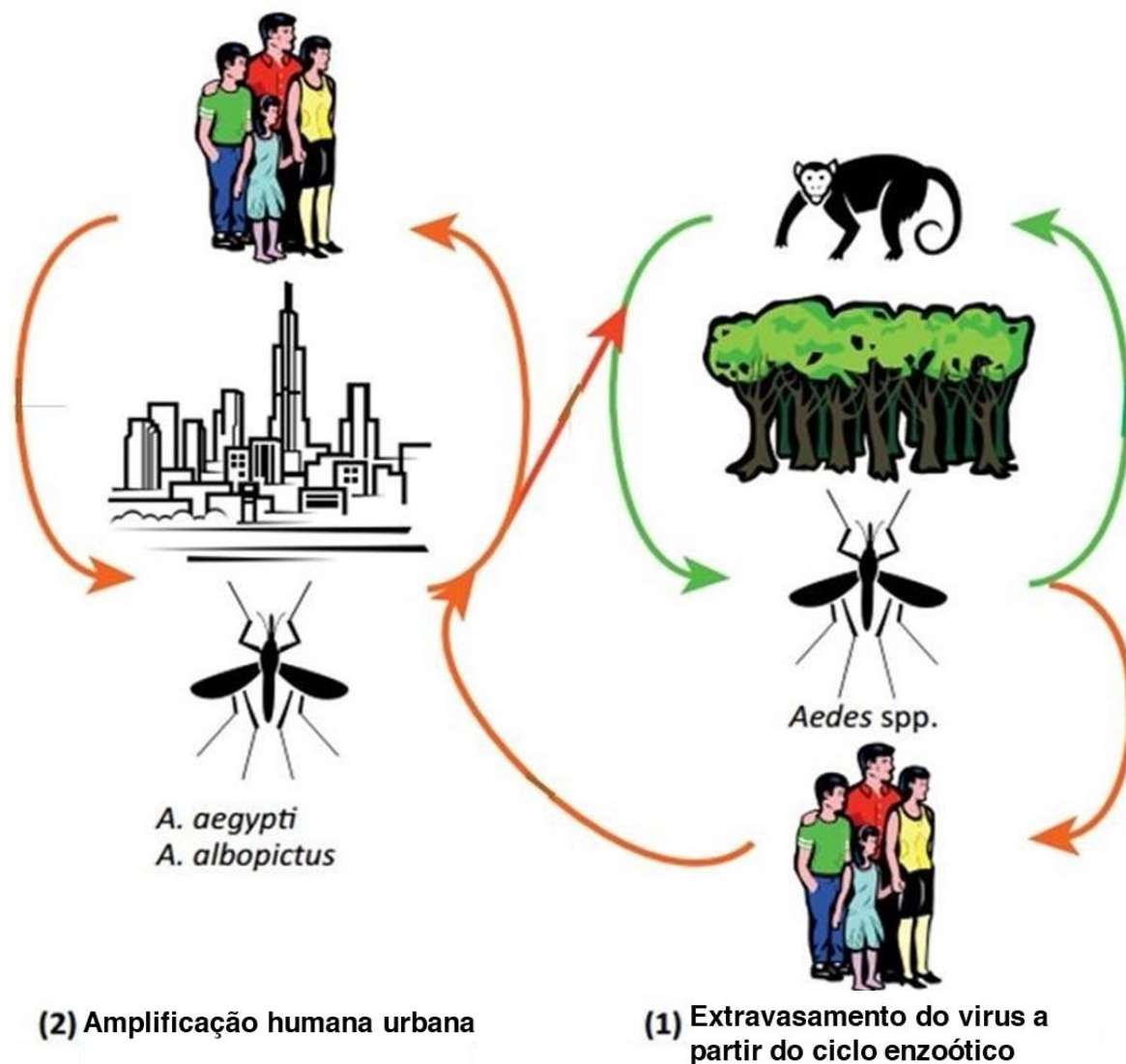
Os mosquitos vetores possuem um ciclo de geração que varia de 8 a 10 dias à temperatura ambiente (TA), no qual a partir de um ovo se forma um mosquito adulto. O ciclo começa quando a fêmea adulta infectada com o CHIKV deposita os ovos em recipientes que possam acumular água. Esses ovos podem ser infectados por transmissão transovariana (vertical). Os ovos eclodem em alguns dias se estiverem em um ambiente aquático. Caso estejam em ambiente seco, podem sobreviver até cerca de oito meses e assim que estiverem encobertos por água eclodem. Após a eclosão, concebem larvas dependentes de água que geram pupas dentro de cinco dias. As pupas ainda vivem na água e, por sua vez, se tornam mosquitos adultos em dois ou três dias. Os mosquitos adultos fêmeas gerados realizam o repasto sanguíneo e põem os ovos, reiniciando o ciclo de geração (REITER, 2007, CDC, 2016b).

As fêmeas adultas se infectam com o vírus ao picar pessoas que apresentam viremia, iniciando sua disseminação para outros hospedeiros não infectados. O mosquito amplia em pouco tempo a área de dispersão da doença devido à necessidade de repasto em mais de um indivíduo (DELATTE *et al.*, 2010; FARJANA; TUNO, 2013). Além dessa forma de disseminação do vírus, são também formas de dispersão a transmissão vertical entre o mosquito e sua prole e a contaminação por transfusão de sangue ou hemoderivado contendo o CHIKV (LIUMBRUNO *et al.*, 2008). Inúmeros fatores contribuem para a velocidade e grau dessas transmissões do vírus, como fatores ambientais, climáticos, interações CHIKV-hospedeiro e fatores imunológicos e relacionados à idade dos hospedeiros humanos (WHO, 2016).

No vetor, após o repasto de sangue contaminado, o patógeno chega ao intestino médio onde penetra nas células epiteliais desse local. Após a penetração, o CHIKV multiplica na hemocele, se dissemina e se propaga para as glândulas

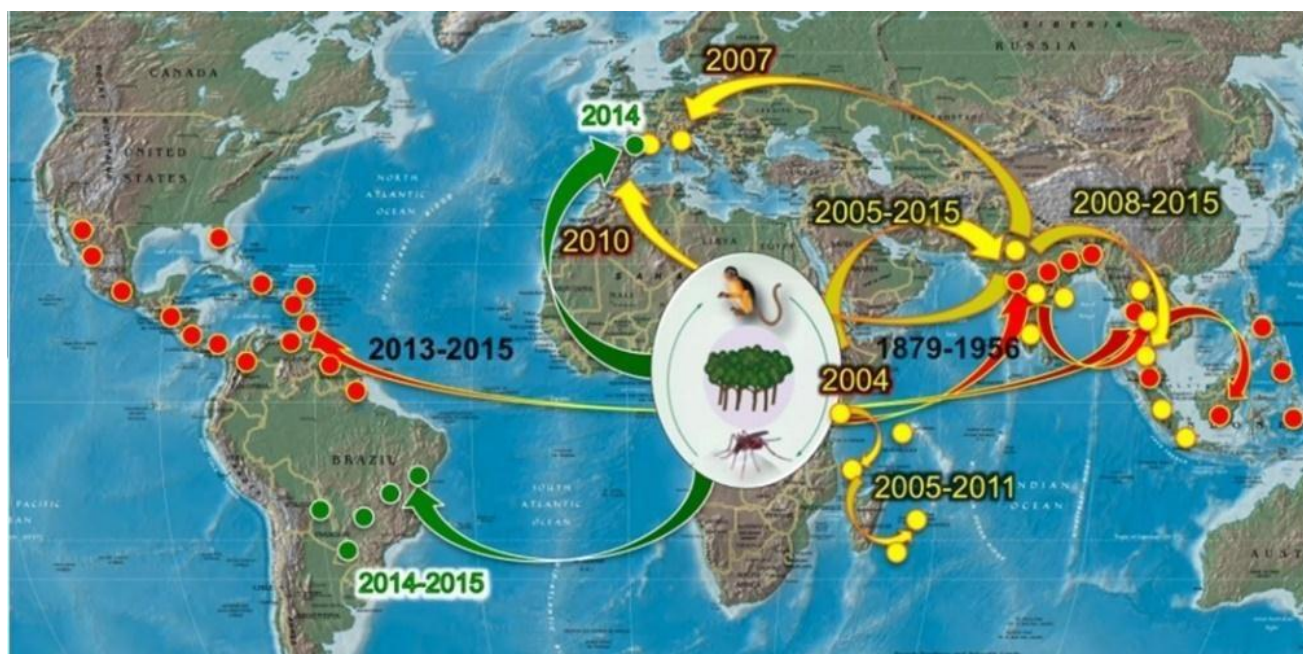
salivares. Nas glândulas, penetra, se multiplica nas células acinares e se deposita nas cavidades apicais de armazenamento da saliva antes de ser liberado durante o repasto sanguíneo. A multiplicação do vírus no vetor dura pelo menos 48 horas em um período de incubação extrínseco antes que o mosquito possa transmitir o vírus. Depois disso, o mosquito passa a ser contaminante pelo resto de sua vida que varia de cerca duas a oito semanas (JOY *et al.*, 2010; MONTERO, 2015; ERNST *et al.*, 2017).

As espécies de mosquitos vetores, são distribuídas em relação à região de origem e/ou clima em que se adaptam melhor. Os mosquitos africanos como os do gênero *Culex* spp. e outras espécies de *Aedes* spp. são os principais transmissores da doença na África. São vetores com ciclo enzoótico envolvendo principalmente primatas não humanos (PNHs) como babuínos, macacos e chimpanzés (WEAVER, 2013). Sugere-se que a passagem (*spillover*) da doença do meio silvestre para o urbano tenha ocorrido por meio da picada do mosquito silvestre infectado em humanos de tribos ou cidades próximas à área florestal. Também podem ter participação fatores relacionados ao vírus, como adaptações, *fitness* e seleções virais. Essa transmissão urbana ampliou a disseminação do vírus, principalmente pelo deslocamento humano por meio de viagens. Dessa maneira, possibilitou que o CHIKV fosse deslocado para outros lugares no qual os mosquitos daquele novo nicho eram o *A. aegypti* e o *A. albopictus* e alguns outros (**Figura 7**). Com todos esses fatores, os diferentes genótipos do vírus foram disseminados aos muitos territórios e países em que está circulando (**Figura 8**) (WEAVER; FORRESTER, 2015).



**Figura 7 – Ciclo de transmissão do CHIKV enzoótico e epizoótico.**

(1) Ciclo enzoótico, com participação de espécies de *Aedes spp.* Africanas, com disseminação silvestre e contato com humanos locais e posterior extravasamento do vírus. (2) Ciclo epizoótico com disseminação urbana e participação das espécies de *Aedes spp.* urbanas. Fonte: Adaptado de Weaver (2013).



ECSA lineage, Asian lineage, Indian Ocean Lineage

**Figura 8 – Mapa com a disseminação do CHIKV baseada nos genótipos e surtos ocorridos.**

Setas verdes: genótipo ECSA; setas vermelhas: genótipo Ásia e setas amarelas: linhagem Oceano Índico. Fonte: Adaptado de Weaver (2015).

#### 1.3.4 Características clínicas da doença

A doença possui uma fase aguda, subaguda e crônica. Na doença aguda, os indivíduos acometidos que requerem atenção médica representam uma proporção maior que as outras arboviroses devido a sua alta morbidade. Os sintomas são similares aos da dengue, com febre de início repentino podendo exceder 39°C que dura de dois dias a uma semana e tem fim abrupto. Também são relatados, erupção cutânea, dor de cabeça, dor lombar e fadiga. Normalmente se diferencia pela presença de forte artralgia que pode aparecer a partir de quatro dias. Várias articulações, como das mãos e dos pés, podem ser acometidas e debilitar pacientes de semanas até anos, no qual já foram relatados casos que duraram dois anos. Entre dois e cinco dias, os pacientes podem desenvolver erupções cutâneas ou petéquias brandas, preferencialmente no tronco. Além dos sintomas típicos, alguns pacientes apresentam vômitos, náuseas, diarreias e até anorexia que dependem dos fatores inerentes ao hospedeiro (MONTERO, 2015, CDC, 2016a, WHO, 2016).

A doença subaguda não persiste mais que três meses. É caracterizada pela recorrência de sintomas articulares dois a três meses após o início da recuperação, geralmente, nas mesmas articulações em que existia dor na fase aguda. O quadro pode desencadear artralgia, tenossinovite hipertrófica subaguda nos pulsos e

tornozelos e, em menor número de casos, síndrome de *Raynaud*, depressão, astenia e fraqueza (KUCCHARZ; CEBULA-BYRSKA, 2012, MONTERO, 2015).

Se considera que o paciente apresenta a fase crônica da doença, quando os sintomas persistem por mais de 3 meses, em uma frequência de 12 a 57% de acometimento. Após longos períodos de infecção o RNA viral é detectado em regiões articulares onde é relatada a dor, porém o vírus não é detectado. Essa ausência viral, também foi demonstrada em modelos murinos (HAWMAN *et al.*, 2013). Cerca de 93% dos pacientes permanecem sintomáticos três meses após a doença evoluir para fase crônica e 57% destes ficam ainda sintomáticos após 15 meses. Em menor frequência, apenas 47% destes pacientes apresentam sintomas crônicos após dois anos. Além disso, formas graves da doença podem vir acompanhadas de outras alterações como: miocardite, meningoencefalite, pequenos sangramentos, síndrome de *Guillain-Barré*, perda de acuidade auditiva, uveíte e retinite. A mortalidade depende da região endêmica, da idade e estado imunológico do paciente com incidência mais comum em pacientes maiores de 65 anos (JAIN; RAI; CHAKRAVARTI, 2008, MONTERO, 2015).

O diagnóstico das fases da doença é dependente de uma boa anamnese, avaliação dos sintomas do paciente e histórico epidemiológico do paciente, porém é crucial a detecção do vírus por métodos laboratoriais. Podem ocorrer diagnósticos equivocados, devido à sobreposição de vetores, sobreposição de áreas endêmicas e similaridade entre a sintomatologia com outras doenças causadas por arbovírus. No entanto, são descritos casos de coinfeção entre arboviroses. Não ocorre reação imunológica cruzada nos testes sorológicos entre os flavivírus (DENV, ZIKV e YFV) e os alfavírus (CHIKV, Mayaro virus [MAYV]), por serem de famílias diferentes com composição antigênica distinta (KAM *et al.*, 2015). Nenhuma avaliação clínica supera a diferenciação feita por teste laboratorial em que pode ser feita por meio de detecção sorológica da proteína E2 do CHIKV, ou de maneira mais sensível pela detecção do genoma viral por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (HALSTEAD, 2015, SIMMONS *et al.*, 2016).

A CHIKF provoca gastos sociais e econômicos em governos de áreas acometidas. Como exemplo, 95,2% dos pacientes com CHIKF em Kerala na Índia (em 2007) foram incapazes de bancar as despesas hospitalares. A alta morbidade da doença acarretou aumento das demandas hospitalares e de consumo de medicamentos. Além disso, as empresas obtiveram custos econômicos relacionados

à ausência dos funcionários no trabalho em consequência da sequela artrálgica (VIJAYAKUMAR *et al.*, 2013).

No Brasil, estima-se que até 2017 o custo com controle de vetores foi de 1,5 bilhão, enquanto custos médicos diretos geraram gastos de R\$ 374 milhões (TEICH *et al.*, 2017).

#### 1.4 CHIKV e as vias de sinalização celular

O CHIKV, assim como os outros vírus, subvertem as defesas inatas/metabolismo das células hospedeiras e se beneficiam da maquinaria celular para seu ciclo de multiplicação. Os fatores imunológicos do hospedeiro e as vias de sinalização celular podem contribuir para o ciclo do vírus (provirais), tornando-os alvo de potenciais antivirais. O vírus pode utilizar desses fatores antivirais e de muitas vias de sinalização celular. Já foram encontrados no total por meio de estudos por RNA de interferência (iRNA) 156 fatores celulares utilizados pelo CHIKV para seu ciclo de multiplicação e 46 fatores antivirais (KARLAS *et al.*, 2016).

Diversas vias de sinalização celular foram descritas como moduladas pelo CHIKV, dentre elas estão as vias da autofagia, JAK-STAT, MAPK, RIG-I, TGF-beta, além das moléculas sinalizadoras, tais como: TRAF6, IRAK1, IRAK2 e STAG2 (DING *et al.*, 2018; SELVAMANI; MISHRA; SINGH, 2014; VARGHESE *et al.*, 2016). Uma das ações descritas para o CHIKV consiste na indução de microRNA (miR-146a), inibindo as vias que ativam de NF-kB, uma importante via de ativação pró-inflamatória. Em fibroblastos de pele de camundongos e humanos já foi demonstrado que os miRNAs induzidos pelo vírus também tem como alvo as MAPK (PARASHAR *et al.*, 2018; SELVAMANI; MISHRA; SINGH, 2014).

##### 1.4.1 Via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK)

A via MAPK (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) é uma via altamente conservada evolutivamente composta por proteínas serina/treonina cinases. Essas proteínas participam de diversos processos celulares como proliferação, sobrevivência, diferenciação, apoptose, motilidade e metabolismo. A via das MAPK é estimulada por um gatilho extracelular, geralmente proteico, agindo em cascata a seguir. A proteína de ligação a GTP (Ras) ou a proteína Rho estimula a MAP-cinase-cinase (MAP3K). A MAP3K estimula a MAP-cinase-cinase (MAP2K), o qual fosforila e ativa a MAP-cinase (MAPK). Essas proteínas MAPK são as efetoras que

ativam ou inativam outras proteínas reguladores dos diversos processos biológicos (KOLCH, 2005, WU; PARK, 2015, ASATI; MAHAPATRA; BHARTI, 2016).

A regulação da via das MAPK é mediada por uma série de cinases, proteínas de arcabouço, fosfatases e GTPases. Esta via estimula as atividades celulares e atinge alvos citosólicos e nucleares, como fatores de transcrição, alterando em nível molecular a expressão de genes. A serina/treonina cinase MAP3K ou Raf em mamíferos possui 14 membros, em especial (C-Raf-1, A-Raf, B-Raf). A MAP2K ou cinase MAPK/ERK (MEK) apresenta 7 membros, em especial MEK1 e 2. E a MAPK ou ERK possui 12 membros, divididos em quatro famílias: (1) cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), (2) cinase c-Jun N-terminal ou proteína cinase ativada por estresse (JNK/SAPK), (3) p38-MAPK e (4) ERK5, também conhecida como grande proteína cinase ativada por mitógeno (BMK1) (BONJARDIM, 2017a, PLESCHKA, 2008, CAUNT *et al.*, 2015). Todas as ERKs são ativadas por receptores acoplados à proteína G (GPCR) e fatores de crescimento. Mas existem variações em outros ativadores dependentes de cada família, a ERK1/2 é também ativada por Mitógenos, JNK/SAPK e p38-MAPK são ativados por estresse e citocinas anti-inflamatórias e ERK5, por sua vez, é ativada por estresse e mitógenos (CHAPMAN; MINER, 2011, ROSKOSKI, 2012).

As proteínas MEK1/2 são cinases que medeiam a fosforilação de tirosina e treonina em ERK1 e ERK2, ativando essas enzimas, que são serina-treonina cinases. MEK1/2 são altamente específicas devido ERK1/2 serem os únicos alvos conhecidos de MEK1/2 (MCCUBREY *et al.*, 2010). As enzimas ERK1/2 possuem 84% de homologia em suas sequências e compartilham quase todas as suas funções, possuem extensões N-terminal e C-terminal únicas no qual provêm a especificidade de sinalização. A ERK1 humana possui 379 resíduos de aa e a ERK2, 360 resíduos de aa. Essas enzimas são ubiquamente expressas como proteínas hidrofílicas não receptoras que participam da via de sinalização de MAPK. ERK1/2 possuem mais de 175 substratos citoplasmáticos e nucleares e são as efetoras da resposta celular da via das MAPK (ROSKOSKI, 2012, ZASSADOWSKI *et al.*, 2012).

No núcleo, ERK1/2 catalisam a fosforilação de fatores de transcrição, como a família do fator complexo ternário (TCF) responsáveis por induzir a expressão de genes precoces, como seus produtos, o c-Fos e o c-Myc que induzem genes tardios a atuarem na sobrevivência, divisão e mobilidade celular. Outro alvo nuclear é Elk1 que possui múltiplos sítios alvos de ERK1/2, e sua ativação leva ao aumento da

atividade transcricional. Estes produtos c-Fos e o c-Jun são fatores de transcrição que regulam processos transcripcionais precoces seguidos à estimulação extracelular. ERK1/2 também fosforilam 30 proteínas do poro nuclear, as nucleoporinas (Nups).

No citoplasma, ERK1/2 possuem um leque de mais de 50 substratos, entre eles proteínas do citoesqueleto, moléculas regulatórias, moléculas sinalizadoras e proteínas apoptóticas. Também incluem, a fosfolipase A<sub>2</sub>, a fosfodiesterase (PDE3), a fosfoproteína fosfatase e uma família de proteínas cinases: cinase s6 ribossomal (RSK) que regula o crescimento, a motilidade, a proliferação e a sobrevivência celular (MEBRATU; TESFAIGZI, 2009, LAKE; CORRÊA; MÜLLER, 2016).

#### 1.4.2 MAPK e vírus

A via de sinalização Raf-MEK-ERK já foi descrita como modulada por diversos micro-organismos e sua importância foi estudada em muitos vírus. Esta via participa da penetração viral, transcrição gênica, síntese de proteínas, morfogênese e disseminação viral. A ativação da via pode ser necessária para os ciclos de multiplicação de vírus como o *Influenza virus* (PLANZ, 2013), *ebola virus* (STRONG *et al.*, 2008), *hepacivirus C* (ZHAO *et al.*, 2013), *human immunodeficiency virus 1* (LEE *et al.*, 2008), *japanese encephalitis virus* (YANG *et al.*, 2010), *argentinian mammarenavirus*, anteriormente: *junín virus* (RODRÍGUEZ *et al.*, 2014), *measles morbillivirus* (TORRES; CASTILLA; WACHSMAN, 2012), *human alphaherpesvirus 2* (SMITH, 2005), DENV (SREEKANTH *et al.*, 2016).

Alem desses vírus, trabalhos realizados pelo grupo de transdução de sinais (GTS) do laboratório de vírus da Universidade Federal de Minas Gerais descreveram a participação da via em ciclos de vírus como: *vaccinia virus* (MAGALHÃES *et al.*, 2001), YFV (ALBARNAZ *et al.*, 2014), DENV (OLIVEIRA *et al.*, 2020), e SLEV (AGUIAR, 2017 Dados não publicados) e ZIKV (RIVERO, 2020 – submetido).

Muitos vírus de DNA são conhecidos como indutores das vias de sinalização celular por meio da via das MAPK, porém menos vírus RNA são conhecidos induzindo esta via (PLESCHKA, 2008). Em um estudo de 2015, descreveu que apesar de o CHIKV não replicar em cultura de células de micróglia de camundongo, o vírus induziu uma elevada atividade da via MAPK. A indução pode ter sido causada por algum fator viral liberado pelos detritos celulares infectados que foram utilizados para inoculação nas células da micróglia ou diretamente pelo próprio CHIKV que também foi utilizado para esta infecção (DAS *et al.*, 2015). Outro estudo descreveu



que as três vias principais das MAPK: p38, JNK e ERK foram especificamente ativadas pelo CHIKV. Esse estudo concluiu que as vias de JNK e ERK são importantes para a formação da progênie viral (VARGHESE *et al.*, 2016).

#### 1.4.3 Inibidores de MAPKs como potenciais fármacos antivirais

A via das MAPK é alvo de fármacos para uma variedade de doenças, sendo considerada uma importante via na terapia anticâncer, pois é diretamente relacionada às neoplasias (CAUNT *et al.*, 2015). Os inibidores desta via podem atuar em qualquer uma das proteínas cinases da cascata de sinalização. Os inibidores de Raf geralmente atingem muitos alvos, mas ainda são utilizados na terapia anticâncer, como é o caso do Sorafenib. Enquanto outros inibidores de Raf são mais utilizados em testes laboratoriais e estudos pré-clínicos (KOLCH, 2000). Os inibidores de MEK são bem mais específicos, em consequência da existência de um sítio hidrofóbico adjacente ao sítio de ligação ao ATP. Porém, o principal ponto consiste em MEK agir em poucas proteínas cinases diferentes (LITTLE; SMITH; COOK, 2013). Os inibidores de ERK conhecidos atuam principalmente como inibidores competitivos com o ATP e bloqueiam a ativação dos fatores de transcrição (ROSKOSKI, 2012).

Dentre os potenciais inibidores de MEK, um importante inibidor utilizado contra infecções virais é o Trametinibe. Este é um inibidor de MEK1/2 altamente específico e potente, com  $IC_{50}$  de 0,92 nM e 1,8 nM. O Trametinibe é um fármaco (Mekinist) aprovado em 2013 pelo *food and drug administration* para uso em humanos para o tratamento contra melanoma em estágio avançado (WRIGHT; MCCORMACK, 2013). A atividade antiviral desse inibidor já foi testada contra o vírus influenza A (H1N1) (SCHRÄDER *et al.*, 2018), o vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) (DOCHI *et al.*, 2017) e de forma pioneira pelo nosso grupo, GTS, contra flavivírus, sob depósito de patente no instituto nacional da propriedade industrial (INPI) com número do processo: BR 13 2017 020173 1, de 21/09/2017 (patente concedida) (BONJARDIM, 2017b).

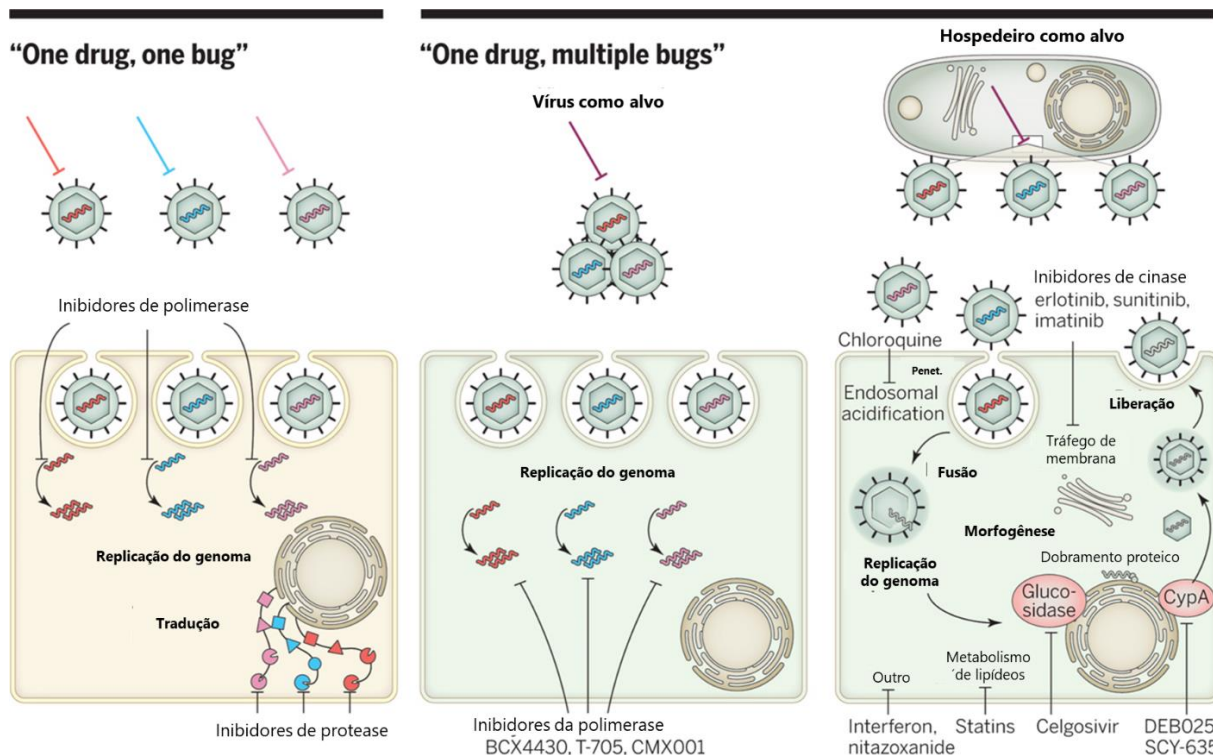
## 1.5 Potenciais tratamentos antivirais frente ao CHIKV

Não existem medicamentos específicos licenciados frente ao CHIKV. Os fármacos que existem visam apenas à terapia antipirética e analgésica da doença aguda. Já a artralgia crônica é tratada com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

e imunossupressores. Além de não oferecerem um tratamento direto frente ao vírus esses medicamentos possuem sérias contraindicações. Uma principal desvantagem é a produção de muitos efeitos adversos, principalmente se forem utilizados continuamente durante médio ou longo prazo (THIBERVILLE *et al.*, 2013, MCSWEEGAN *et al.*, 2015).

Apesar de a maioria dos antivirais aprovados agirem em enzimas virais, existem inibidores com alto potencial que agem em fatores do hospedeiro envolvidos no ciclo viral. Esses inibidores têm como principal vantagem a criação de uma ampla barreira contra o vírus, que protege a diferentes sorotipos/genótipos virais (LIN; GALLAY, 2013). Existe a necessidade constante do desenvolvimento de novas terapias contra vírus emergentes e reemergentes. O desenvolvimento de novos fármacos é caro e demorado. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos já aprovados para tratamento de doenças humanas, como o câncer, e que demonstrem também atividade antiviral, se constituem alternativas atraentes a serem testadas, diminuindo tanto os custos, como também o tempo necessário ao desenvolvimento do fármaco. O Trametinibe (Mekinist) se inclui nessa perspectiva.

Portanto, os fármacos de amplo espectro representariam uma alternativa. Baseado em duas estratégias, um antiviral pode ter ação em um único vírus: “*one drug, one bug*”, na qual ele é específico contra o vírus. Ou um antiviral pode ser de amplo espectro tendo ação em uma enzima ou fator proteico do hospedeiro que seja necessário à multiplicação de vários vírus: “*one drug, multiple bugs*” (Figura 9) (BEKERMAN; EINAV, 2015; SUBUDHI *et al.*, 2018).



**Figura 9 – Antivirais de amplo espectro.**

Solução “one drug, one bug” em que um antiviral inibe uma única proteína viral (esquerda). Enquanto a solução “one drug, multiple bugs” aborda que um antiviral tem ação em uma enzima ou fator proteico do hospedeiro que seja necessário à multiplicação de vários vírus (direita). Fonte: adaptado de Bekerman; Einav, 2015.

Existe uma série de compostos em fases de teste. Esses compostos são testados principalmente em modelos *in vitro* em fases iniciais e as principais abordagens visam as diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral (Tabela 1). São divididos dentre os que modulam: 1) a penetração viral, como a cloroquina, que também interage com os estágios tardios da replicação, como a clorpromazina; 2) a tradução das proteínas virais, como a Harringtonina, um alcaloide que afeta também a produção de RNA e diminui a citotoxicidade e também como a homoharringtonina; 3) a replicação, são exemplos a Ribavirina, que age por três mecanismos, inibição da proteína celular inosina monofosfato desidrogenase (IMPD), efeitos imunomodulatórios e incorporação de nucleosídeo mutagênico pela RNA polimerase do vírus, e outros como o Trigocherriolide A, o interferon alfa, a apigenina e a silibina; 4) o sistema imune: como o Bidarit, testado em modelo murino (THIBERVILLE *et al.*, 2013; MCSWEEGAN *et al.*, 2015; SUBUDHI *et al.*, 2018).

Para outro alfavírus relacionado ao CHIKV, o MAYV, alguns compostos foram testados com resultados promissores, dentre eles epicatequina que apresentou potencial antiviral contra MAYV afetando a multiplicação viral devido à ligação a

componentes da partícula viral (FERREIRA *et al.*, 2018). Outro inibidor, proantocianidina tem potente ação virucida contra MAYV atuando nas partículas extracelulares, bloqueando a disseminação célula-célula ou para outros tecidos não infectados (FERRAZ *et al.*, 2019). A silimarina é outro composto com ação tanto para CHIKV, o qual reduz a eficiência de replicação e a produção de proteínas não estruturais (LANI *et al.*, 2015), quanto para MAYV, o qual reduz os marcadores de estresse oxidativo nas células infectadas (CAMINI *et al.*, 2018).

**Tabela 1 – Compostos em fase de teste**

<b>LOCAL DA AÇÃO</b>	<b>COMPOSTO(S)</b>
<b>Penetração</b>	<b>Cloroquina</b> (KHAN <i>et al.</i> , 2010)
<b>Tradução das proteínas virais</b>	<b>Harringtonina, Homoarringtonina</b> (KAUR <i>et al.</i> , 2013)
<b>Replicação</b>	<b>Ribavirina</b> (ROTHAN <i>et al.</i> , 2015)
<b>Replicação</b>	<b>Mefenamic acid</b> (ROTHAN <i>et al.</i> , 2016)
<b>Replicação</b>	<b>Favipiravir</b> (DE-LANG <i>et al.</i> , 2014)
<b>Penetração</b>	<b>Suramina</b> (ALBU-LESCU <i>et al.</i> , 2015)
<b>Penetração</b>	<b>Bafilomicina</b> (KARLAS <i>et al.</i> , 2016)
<b>Replicação</b>	<b>Berberine</b> (VAR-GHESE <i>et al.</i> , 2016)

Além desses compostos, já foram também testados o arbidol que perturba as membranas e interfere nos estágios iniciais do ciclo de multiplicação do vírus; os inibidores de furina, como o dec-RVCR-cmk que tem potente efeito se adicionado logo após a infecção; alguns oligonucleotídeos antisense como o pequeno RNA em grampo (do inglês, *small hairpin RNA* [shRNA]) que atua contra genes E1 do vírus e os pequenos RNAs de interferência (siRNA) que protegem a célula contra a infecção pelos vírus pela degradação do RNA no citoplasma das células eucariotas (KREJBICH-TROTOT *et al.*, 2011; LAM *et al.*, 2012).

### 1.5.1 IFs com potencial efeito antiviral

Cada uma das proteínas virais do CHIKV pode ser um possível alvo na terapia antiviral, porém os principais alvos são as proteínas não estruturais. Os receptores celulares utilizados pelo vírus no momento da adesão, também podem ser alvos. O composto triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-one foi testado *in vitro* inibindo a função de adição do cap 5' ao RNA da proteína nsP1 (GIGANTE *et al.*, 2017).

Avaliações *in silico* obtém como principal alvo antiviral a proteína nsP2 (WONG; CHU, 2018). A nsP2 apresenta domínio C-terminal similar à metiltransferase que é essencial para a virulência do CHIKV. Este domínio induz o *shutoff* em nível transcricional e traducional, além de induzir o bloqueio à sinalização dos interferons. Essa atividade torna esta proteína um poderoso alvo de potenciais inibidores anti-CHIKV. Um composto de origem natural, ID1452-2, bloqueia parcialmente a atividade de nsP2 e inibe a replicação *in vitro* (LUCAS- HOURANI *et al.*, 2013). Outros compostos são pesquisados por meio de rastreamento por ancoragem molecular, triagem virtual e simulação molecular por meio de visualização da estrutura em raio-X da nsP2. Por meio dessas técnicas foram identificados cinco locais para ancoragem de compostos potenciais nos sítios de ação na proteína viral (NGUYEN; YU; KELLER, 2015). Também por ancoragem molecular, um fármaco potencial contra nsP2 foi produzida, a LIGAND\_4 [N-butil-9-[3,4- dipropoxi-5-(propoximetil) oxalan-2-il] purin-6-amina], que apresentou efeitos de melhora na doença (BORA, 2012). Apesar de existirem compostos em estágios iniciais, ainda não existem medicamentos aprovados, efetivos contra a proteína nsP2 do CHIKV. Esses estudos e outros visam aprimorar as futuras produções de medicamentos para este promissor alvo proteico antiviral (AGARWAL; ASTHANA; BISSOYI, 2015).

A proteína nsP3 apesar de não ter uma função completamente elucidada, possui interações já demonstradas. Uma dessas interações ocorre com a chaperona HSP-90 que ajuda na replicação viral, sendo demonstrado que inibidores dessa chaperona reduzem a infecção viral (RATHORE *et al.*, 2014). O composto-A derivado de benzimidazole, tendo como alvo a nsP4, inibiu a infecção de muitas amostras do CHIKV, mas mais estudos precisam ser descritos (WADA *et al.*, 2017). A maior parte dos estudos com potenciais fármacos anti CHIKV são limitados à proteína nsP2 como alvo. Essa limitação ocorre devido à incompleta elucidação da estrutura das outras nsPs (SUBUDHI *et al.*, 2018).

A identificação e o desenvolvimento de novas aplicações para fármacos existentes ou em desuso é conhecida como reposicionamento (BOGUSKI; MANDL; SUKHATME, 2009). Essa estratégia é promissora sobre a prospecção padrão de fármacos, porque possui vantagens como: menor risco de toxicidade do composto; menor tempo de desenvolvimento e menor gasto para o desenvolvimento do fármaco (PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

O Trametinibe por meio dessa abordagem, já foi utilizado como agente antiviral contra o influenza vírus e o vírus da imunodeficiência humana. No influenza vírus a via de MEK/ERK é indispensável para a replicação, pois por meio dessa via é desencadeada a exportação de ribonucleoproteínas virais. O tratamento com Trametinibe inibiu a exportação dessas ribonucleoproteínas, bloqueando a replicação de diferentes subtipos de influenza (SCHRÄDER *et al.*, 2018). Interessantemente, MEK1/2 e ERK2 são incorporadas dentro dos vírions do vírus da imunodeficiência humana. ERK2, ainda, é essencial para o desnudamento, promovendo a fosforilação de um resíduo de serina na proteína do capsídeo viral. Dessa forma, o tratamento com Trametinibe reduziu a fosforilação de ERK2 nos vírions, reduzindo a infecciosidade devido à deficiência do desnudamento (DOCHI *et al.*, 2017).

## **1.6 Modelos murinos para o CHIKV**

Modelos animais são amplamente utilizados em estudos de avaliação da infecção viral, sendo dois tipos de modelos animais estudados em virologia. O primeiro é o relacionado à infecção de um vírus humano em um modelo animal que não é hospedeiro natural do vírus. O segundo modelo compreende a infecção de um hospedeiro animal natural com um vírus animal correlacionado ao vírus em humanos (MARK T. HEISE; HERBERT W. VIRGIN, 2013). Existem diversos modelos

experimentais de animais de laboratório, sendo alguns destacados para estudos com arboviroses, como PNHs e camundongos. Esses dois modelos animais são a forma mais fiel de avaliação dos mecanismos fisiopatológicos da infecção pelo CHIKV. Os PNHs são modelos utilizados em poucos estudos, sendo que a maioria dos estudos utiliza camundongos. As vantagens da utilização dos camundongos como modelo experimental são diversas. Esses animais possuem fácil e relativamente barata manutenção, rápida procriação, características fisiológicas semelhantes ao humano, funções gênicas compartilhadas com o humano, vida de curta duração, além de serem bem estabelecidos há mais de 100 anos em pesquisas científicas (JAX, 2019a).

Os camundongos são os modelos mais utilizados para o estudo da infecção pelo CHIKV, pois mimetizam bem algumas alterações causadas pela infecção em humanos. O modelo *in vivo* comparado ao *in vitro*, apresenta a vantagem de possuir todas as interações orgânicas existentes em um sistema completo (JAX, 2019b). Esse sistema completo se torna fundamental como uma das fases para a avaliação de testes antivirais frente à infecção pelo CHIKV. A escolha entre as diversas linhagens testadas para o modelo dessa infecção depende da característica fisiológica que objetiva-se avaliar. Dentre as linhagens mais utilizadas estão as linhagens: BALB/c, C57BL/6, ICR, CD1 e linhagens nocaute (do inglês, *knockout* [KO]): A129 e AG129 (CHAN; LUM; NG, 2015). Via de regra, camundongos de linhagens selvagens (do inglês, *wilde type* [WT]) não conseguem se infectar e reproduzir um quadro grave da infecção pelo CHIKV. Esses animais geralmente apresentam infecção localizada, apesar de ser estabelecido um quadro histopatológico similar à doença em humanos. Para o estabelecimento da doença disseminada, animais neonatos são utilizados devido à imaturidade do sistema imune (CHAN; LUM; NG, 2015; NG, 2017).

Alguns modelos de camundongos precisam suprimir alguma defesa contra o agente etiológico para gerarem um quadro mais exacerbado de uma doença. O desligamento (nocaute - *knockout*) de genes específicos desses animais é a estratégia utilizada pelos pesquisadores para tal supressão (GUAN *et al.*, 2010). O tipo de camundongos no qual foram submetidos a esse silenciamento gênico, são chamados camundongos KO (MAK; PENNINGER; OHASHI, 2002; ZAMBROWICZ; SANDS, 2003). Os genes KO escolhidos para potencializar a determinada infecção viral fazem parte principalmente do sistema imune do animal. Genes como os

receptores de interferon tipo I e II (*ifnar* e *ifngr*), podem sofrer esse desligamento visando acentuar a doença. O IFN-I é bem estabelecido como tendo papel chave na imunidade frente ao CHIKV (COUDERC *et al.*, 2008). Alguns modelos experimentais possuem apenas o gene *ifnar* nocaute (IFNAR<sup>-/-</sup>) e outros possuem ambos os genes *ifnar* e *ifngr* nocautes (IFNAGR<sup>-/-</sup>). Para o desligamento desses genes podem ser selecionadas diferentes linhagens (fundo genético) (SIMPSON *et al.*, 1997).

Os principais trabalhos relacionados a infecções por CHIKV em modelos experimentais de camundongos selvagens, envolvem a linhagem C57BL/6. Neste modelo, camundongos adultos são infectados com o vírus por meio da inoculação intraplantar no coxim da pata. Os sinais obtidos são edema de pata, alterações inflamatórias e histopatológicas localizadas próximo à região de inoculação (GARDNER *et al.*, 2010; HAWMAN *et al.*, 2013). Já os principais trabalhos envolvendo o CHIKV e animais KO para *ifnar* utilizam as linhagens C57BL/6 e SV129 como fundo genético (COUDERC *et al.*, 2008; SCHILTE *et al.*, 2010; GARDNER *et al.*, 2012). Os animais com fundo genético SV129 e KO para *ifnar* são denominados de A129, em referência ao IFN tipo I (A de alfa/beta). Da mesma maneira, animais KO para o gene *ifngr* são denominados, G129 e animais KO para ambos os genes de IFN (*ifnar* e *ifngr*) são denominados AG129 (HUANG *et al.*, 1993; MÜLLER *et al.*, 1994).



## 2 JUSTIFICATIVA

A CHIKF é uma arbovirose transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* spp., podendo causar sinais e sintomas como febre, dores articulares, dor de cabeça, mialgia, edema articular e/ou erupção cutânea. Pessoas de todas as faixas etárias podem ser acometidas, mas os casos mais graves ocorrem em recém-nascidos, idosos e pessoas com condições médicas instáveis. Um grande número de pacientes exhibe quadros crônicos de artralgia ocorrendo por até 2 anos pós-infecção. A CHIKF, até 2006, era considerada autolimitada e não letal. Entretanto, após um surto de CHIKV em *La Reunion*, que causou 254 mortes, a perspectiva em relação ao vírus mudou (PETERSEN; POWERS, 2016).

O vírus circula em 115 países e territórios no mundo (CDC, 2020). Somente nas Américas, em 2016 mais de 1,7 milhão de casos foram relatados à organização pan-americana de saúde (PAHO), os casos confirmados foram de 32.775 em 2020 (WHO, 2016; PAHO, 2020). Introduzido em 2014 no Brasil, até dezembro de 2020, 78.808 casos prováveis de infecção por CHIKV foram notificados (SE 46), com as maiores taxas presentes nas regiões NE e SE (MS. SVS, 2020). As sequelas articulares representam uma das principais consequências da CHIKF provocando incapacidade produtiva laboral por longos períodos. O alto grau de morbidade da doença também gera custos com medicamentos e hospitalizações pelo sistema público de saúde. Isso tudo acarreta perdas econômicas referentes as despesas públicas.

A reemergência do vírus gerou uma ampla disseminação da doença, ampliando também custos econômicos e sociais. A disseminação ocorreu devido ao aumento da competência vetorial do *A. albopictus*, que diferente do *A. aegypti*, também é encontrado em regiões temperadas. O aumento das viagens entre os habitantes de diferentes continentes e as mudanças climáticas, também são fortes indutores da propagação do CHIKV.

No entanto, o ciclo de multiplicação do CHIKV ainda não foi totalmente elucidado gerando lacunas que necessitam ser estudadas para que se possa ter um melhor entendimento da biologia viral (SILVA; DERMODY, 2017). Estudos envolvendo a análise morfológica das diversas etapas do ciclo de multiplicação viral

podem contribuir para uma melhor compreensão da interação com seus hospedeiros, além de ampliar os potenciais alvos terapêuticos virais.

Ressalta-se que, ainda não existe tratamento específico com base em medicamentos, nem vacina para se utilizar frente a CHIKV. Existe apenas a prevenção em relação ao controle de vetores e terapia para o alívio dos sintomas. Portanto, há a grande necessidade do desenvolvimento de fármacos e tratamentos específicos para o CHIKV (DEEBA *et al.*, 2016, PRESTI *et al.*, 2016).

A via sinalizadora MEK/ERK é um alvo do hospedeiro promissor de ação contra a infecção do CHIKV. Esta via regula os processos celulares de crescimento, proliferação, sobrevivência e apoptose, e já foi relacionada a outros arbovírus, incluindo o CHIKV, reforçando nosso interesse como alvo de estudo. Apesar disso, é necessária uma melhor compreensão das fases específicas do ciclo viral que possam ser afetadas durante o tratamento com potenciais antivirais. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* nos possibilitarão compreender melhor como o hospedeiro reage ao tratamento, analisando aspectos da sua resposta, como por exemplo, sua imunidade, pós-tratamento.

O Grupo de Transdução de Sinal do Laboratório de Vírus da UFMG vem estudando o papel exercido por MEK/ERK no ciclo de multiplicação dos ortopoxvírus (VACV e CPXV) (ANDRADE *et al.*, 2004, SILVA *et al.*, 2006) e dos flavivírus (DENV, YFV, SLEV e ZIKV), os quais a avaliação do papel desta via em modelos *in vivo* apresentaram resultados promissores (ALBARNAZ *et al.*, 2014, BONJARDIM, 2017b, RIVERO, 2020 - submetido; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Assim, entendemos que o melhor esclarecimento do seu ciclo de multiplicação, associado ao potencial efeito antiviral do inibidor de MEK/ERK, (Trametinibe/Mekinist), poderão contribuir para um maior entendimento das interações CHIKV - hospedeiro e, eventualmente, para a terapêutica antiviral.

### 3 OBJETIVOS

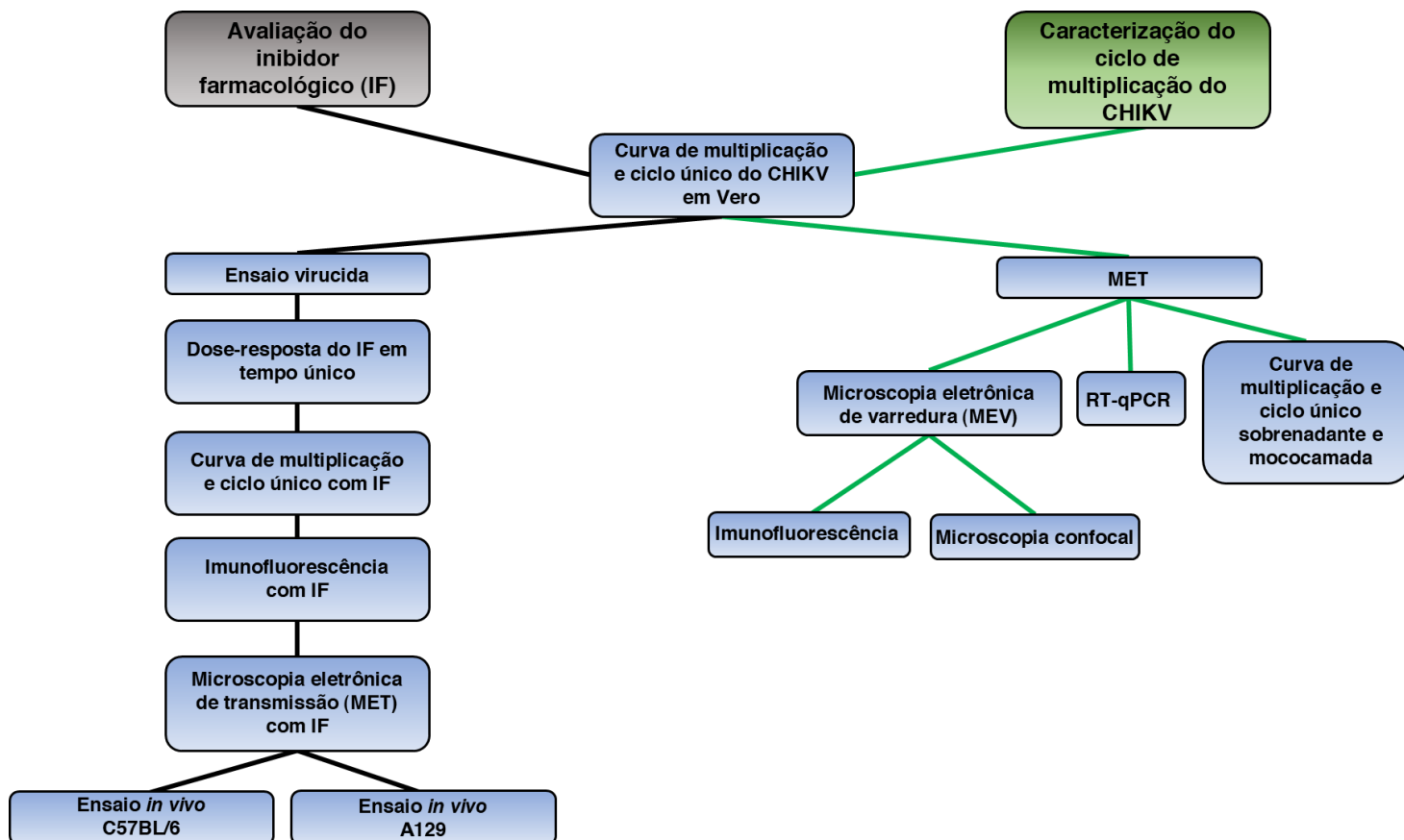
#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antiviral do inibidor da via sinalizadora MEK/ERK Trametinibe (Mekinist), contra infecções com CHIKV realizadas *in vitro* e *in vivo* e analisar morfológicamente o ciclo de multiplicação do CHIKV

##### 3.1.1 Objetivos específicos

1. Analisar o efeito do Trametinibe na multiplicação do CHIKV a baixa ou alta multiplicidade de infecção *in vitro*, determinando-se os títulos virais.
2. Verificar qual(is) etapa(s) do ciclo de multiplicação viral pode(m) ser afetada(s) pelo tratamento com Trametinibe, determinando-se os títulos virais.
3. Verificar se o tratamento com o Trametinibe protege camundongos C57BL/6 e IFNAR<sup>-/-</sup> contra a infecção com CHIKV.
4. Avaliar morfológicamente, detalhando-se as etapas do ciclo de multiplicação do CHIKV.

## 4 FLUXOGRAMA



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Linhagens celulares

#### 5.1.1 Células C6/36

As células C6/36 são derivadas de linhagem contínua obtidas de larvas de mosquito *A. albopictus* e foram mantidas em frascos de 175 cm<sup>2</sup> (T175) (*CorningIncorporated*® SP, Brasil) em meio de cultura Leibovitz-15 (L-15) (*Invitrogen*®, SP, Brasil). Este foi suplementado com 7% Soro Fetal Bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP), 1% L-Glutamina 200 mM (*Invitrogen*®), 1% Antibiótico (penicilina 100 U/mL, estreptomicina 1 mg/mL e anfotericina B 2 µg/mL) (*Invitrogen*®), incubadas a 28°C em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (BOD). Estas células foram utilizadas para a produção do *Pool* Trabalho (PT) do chikungunya virus. Seis garrafas T175 foram utilizadas para a produção, sendo utilizada a multiplicidade de infecção (MOI) de 0.01. Essas garrafas foram observadas diariamente quanto à formação de ECP. Após a observação desse efeito, foi realizada a coleta do sobrenadante em 4, 5 e 6 dias pós-infecção (d.p.i.). Estas células também foram utilizadas para a produção da curva de multiplicação do CHIKV.

#### 5.1.2 Células Vero (*African green monkey kidney*)

As células Vero são células de linhagem contínua derivadas de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*). São células aderentes, apresentando morfologia epitelial. Estas células foram cultivadas em meio mínimo de *Eagle* (MEM), suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB), antibióticos (estreptomicina 40 µg/mL e penicilina 200 U/mL) e com antifúngico (Anfotericina B 1,5 µg/mL). Estas células foram utilizadas para todos os testes *in vitro* realizados. Esses testes foram: testes de viabilidade celular, determinação da curva de multiplicação do CHIKV, ensaio de dose-resposta frente ao tratamento com distintos IFs, titulação viral por ensaio de placa, descritos posteriormente nessa seção.

### 5.2 Vírus

O vírus utilizado neste trabalho foi o CHIKV, pertencente ao genótipo ECSA amostra BHI3762/H804917. A sequência do genoma de vírus ainda não foi

depositada. Esse vírus foi cedido pelo professor Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP.

### 5.3 Ensaios moleculares de confirmação viral (apêndice)

#### 5.3.1 Análise do genoma de CHIKV por qPCR

Um teste de PCR em tempo real foi realizado para confirmar a presença do vírus e afastar qualquer suspeita de contaminação por outros vírus. Foram utilizados os iniciadores para RT-qPCR de CHIKV já descritos na literatura (PORTER *et al.*, 2004) e outros iniciadores específicos foram referentes aos seguintes vírus pesquisados: ZIKV, YFV, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, MAYV (**Tabela 2**).

**Tabela 2 – Inicializadores utilizados para confirmar presença do CHIKV e descartar contaminação.**

ÍRUS	INICIADOR	P RO- DUTO	REFERÊNCIA
HIKV	5' F-GCTATTTGTAAGAACGTCAG 3' 5' R-TACCGTGCTGCGGTCGGGAA 3'	2 00 pb	Porter <i>et al.</i> , 2004
IKV	5' F-CCGCTGCCCAACACAAG 3' 3' R-CCACTAACGTTCTTTTGCA- GACAT 5'	7 6 pb	Lanciotti <i>et al.</i> , 2008
FV	5' F-GCTAATTGAGGTGYAT- TGGTCTGC 3' 3' R-CTGCTAATCGCTCAAM- GAACG 5'		Domingo <i>et al.</i> , 2012
ENV- 1	5' F-CAAAGGAAGTCGYGCAATA 3'		Oliveira, 2015

	3' R-CTGAGTGAATTCTCTCTGC- TRAAC 5'		
ENV- 2	5' F-CAGGCTATGGCACYGTAC- GAT 3' 3' R-CCATYTGAGCARGACCAT- CTC 5'		Oliveira, 2015
ENV- 3	5' F-GGACTRGACACACGCACCCA 3' 3' R-CATGTCTCTACCTTCTCGAC- TTGYCT 5'		Oliveira, 2015
ENV- 4	5' F-TTGCCTAATGATGCTRGTCG 3' 3' R-TCCACCYGAGACTCCTTCCA 5'		Oliveira, 2015
AYV	5' F-CACGGACMTTTTGCCTTCA 3' 3' R-AGACTGCCAC- CTCTGCTKGAG 5'	6 0 pb	Naveca <i>et al.</i> , 2017

### 5.3.2 Construção e teste dos iniciadores para caracterização do vírus de trabalho

A seguir para a validação do conteúdo no PT e no PS foi realizado o sequenciamento parcial do genoma do vírus. Inicialmente foram produzidos iniciadores no qual o produto obtido tivesse um tamanho adequado para a análise. Os programas utilizados para a produção foram o oligo explorer 1.4, oligo analyzer da Integrated DNA Technologies® (IDT) e o primer-BLAST do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os dois melhores pares de iniciadores foram selecionados quanto aos melhores parâmetros de qualidade e foram produzidos pela IDT. Foram nomeados 4F e 4R o primeiro par e 5F e 5R o segundo (**Tabela 3**). O primeiro par amplifica um produto de 841 pb e o segundo, de 715 pb.

O conteúdo do PT/PS foi extraído via kit de extração de RNA (Qiagen, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. O RNA obtido foi amplificado utilizando os iniciadores (**Tabela 3**) diluídos por meio de uma RT-qPCR utilizando uma reação por SYBR baseada em Lanciotti *et al.* (1992). O gel foi feito com concentração X em SDS-page foi corrido e as bandas com o tamanho esperado foram visualizadas e cortadas para purificação do material e posterior sequenciamento.

**Tabela 3 – Inicializadores utilizados para o sequenciamento do CHIKV.**

INICIALIZADOR	SEQUÊNCIA
4F	5' AGCACATGTGGAGAAGTCCG 3'
4R	5' TATGTGGTCCTTCGGAGGGT 3'
5F	5' AAAACCGTCATCCCGTCTCC 3'
5R	5' GACGACCCTAGTAAAGGCCG 3'

### 5.3.3 Sequenciamento do *amplicon* gerado a partir do genoma de CHIKV

Após purificação por corte de banda no gel, o *amplicon* foi encaminhado ao sequenciamento com iniciadores específicos utilizados em cada reação de PCR descrita por meio do método dideoxi descrito por Sanger (SANGER, 1977). A qualidade das sequências obtidas foi analisada por meio do SeqTrace 0.9.0. (BRIAN STUCKY *et al.*, 2014). As sequências foram analisadas manualmente utilizando o programa MEGA 7.0 (TAMURA, 2011) e comparadas por meio do programa BLAST N com sequências depositadas no banco de dados do NCBI.



## 5.4 Ensaios biológicos de caracterização

### 5.4.1 Curva de multiplicação e ciclo único em C6/36 e Vero

As células C6/36 e Vero (aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por garrafa de 25 cm<sup>2</sup> (T25)) foram infectadas com o CHIKV nas MOIs 0.01, 0.1, 1.0 e 5.0 (500 µL por garrafa – volume de adsorção). As MOIs foram selecionadas em uma tentativa de construção gradual de curva de multiplicação e ciclo único. A adsorção foi realizada por 1 h sob agitação a 28 °C e 37 °C para C6/36 e Vero, respectivamente. Após, os volumes foram completados para 4 mL com os respectivos meios para cada linhagem celular. Os tempos (8, 24, 48, 72 e 96 hpi) foram selecionados baseados em curvas de multiplicação de outros arbovírus, em uma tentativa de teste. Os sobrenadantes foram coletados em tempos pré-selecionados e, posteriormente, foram titulados conforme descrito no item 4.7.3. A curva de multiplicação foi realizada utilizando-se duplicatas biológicas (2 garrafas T25 para cada MOI) e confirmada por meio de 3 experimentos independentes.

### 5.4.2 Produção do pool trabalho

Células C6/36 foram implantadas em garrafas de 175 cm<sup>2</sup> (densidade inicial de  $2 \times 10^6$  células por garrafa) e cultivadas em L-15 2% SFB mantidos em condições já referidas anteriormente. Após atingirem ~90% de confluência, as células foram infectadas com o CHIKV, a uma MOI de 0.01, seguido de incubação por, aproximadamente, 72 h, até ser observado o ECP. Após esse período o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 2800 g por 10 min à 4 °C, para sedimentação de resíduos celulares, aliquoteado e armazenado a -80 °C.

### 5.4.3 Titulação viral

A titulação viral foi feita em células Vero, cultivadas em placas de 24 poços (área do poço: 1,9 cm<sup>2</sup>) até a confluência de ~95% ( $1,5 \times 10^5$  células por poço). Foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) em meio MEM (Cultilab) a 1% SFB, sendo 100 µl de suspensão viral inoculados nas células. Três poços não foram infectados servindo como controle celular, sendo inoculados somente com MEM 1%. Após uma hora de adsorção a 37 °C, foi adicionado 1 mL de meio 199 por poço, suplementado com 2% de SFB, contendo 1,0% de carboximetilcelulose (CMC, Synth). As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 2 dias. As condições da titulação foram padronizadas ao longo do tempo. Primeiro foram testadas células

Vero com tempo de infecção de 4 dias. Depois, o tempo foi reduzido para 2 dpi, fixando logo após, conforme a formação de placas de lise. Durante 2 dias, possíveis efeitos citopáticos na monocamada foram avaliados utilizando um microscópio ótico invertido (olympus, Japão). No segundo dia, foi adicionado 1 mL de solução de formalina a 10% por 24 h a TA para a fixação. Após as 24 h de fixação, a solução foi descartada, a monocamada corada com solução 1% (p/v) de cristal violeta em PBS e o título viral foi expresso por meio do número de unidades formadoras de placa por mililitro (do inglês, *Plaque Forming Unit* - UFP ou PFU/mL).

#### 5.4.4 Teste de termolabilidade

Um teste de termolabilidade foi realizado para atestar a estabilidade do chikungunya, permitindo a sua manipulação fora do gelo durante infecções e titulações. Duas alíquotas do PT (A e B) foram retiradas do freezer -70°C. A alíquota "A" foi descongelada e imediatamente titulada de acordo com o item 5.4.3. Logo após, a alíquota "A" foi incubada em estufa a 37°C por 1 h. Depois de 1 h de incubação, a amostra "A" foi novamente titulada. Logo após, a alíquota "A" foi novamente incubada por mais 1 h a 37°C (totalizando 2 h de incubação) e titulada uma terceira vez. A alíquota "B" foi descongelada por 25 min e recongelada. Após 1 h de congelamento esta alíquota B foi titulada de acordo com o item 5.4.3.

#### 5.4.5 Curva de multiplicação e ciclo único do CHIKV

As curvas de multiplicação viral e ciclo único foram processadas em placas de 24 poços (Kasvi) e foram avaliados tempos mais precoces de infecção do CHIKV em células Vero (MEM 1%). Como o vírus tem multiplicação mais acelerada em uma maior MOI, na MOI 5.0 foram analisados os tempos de 2, 4, 6 e 8 hpi. Já para a MOI 0.1 foram analisados os tempos 8, 16 e 24 hpi. A infecção foi realizada com 1 h de adsorção a 37 °C e posterior lavagem com PBS 1X para retirada do inóculo inicial. Após cada tempo de infecção, três curvas de multiplicação foram realizadas a partir da mesma monocamada. A primeira curva contendo vírus do sobrenadante: 200 µL do sobrenadante foram coletados e titulados. A segunda curva contendo o PBS utilizado (quatro vezes) para lavar a monocamada e retirar o sobrenadante: ~300 µL do PBS foi coletado e titulado. A terceira curva contendo apenas o conteúdo viral intracelular: foram adicionados 300 µL de MEM e foram congeladas em freezer -70°C.

As monocamadas foram descongeladas e recongeladas por três vezes, raspadas com ponteiros e coletado o máximo de volume possível em microtubos de 1,5 mL. Esses tubos foram centrifugados a 13.000 x g por 5 min e todo o sobrenadante coletado em microtubos de 0,6 mL. O conteúdo dos tubos foi titulado segundo o item 5.4.3. Os experimentos foram realizados em três réplicas. As células infectadas com MOI 0.1, em tempos 8, 16 e 24 hpi, e MOI 5.0 em tempos 4 e 8 hpi, foram posteriormente preparadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) de acordo com o item 4.9.

#### 5.4.6 Quantificação por qPCR do RNA viral em tempos precoces

A quantificação do RNA viral foi executada após infecção de CHIKV MOI 0.1 em células Vero implantadas em placas de 24 poços (Kasvi) ( $1,5 \times 10^5$  células por poço). Nos tempos de 1, 2, 3 e 4 hpi as respectivas monocamadas foram lisadas com 600  $\mu$ L reagente TRIzol (ThermoFischer scientific) por poço para a extração do RNA total. O conteúdo foi homogeneizado com micropipeta e incubados por 5 min a TA. O conteúdo total foi recuperado para microtubos de 1,5 mL, adicionado 40  $\mu$ L de clorofórmio (MERCK), vortexado e incubado por 3 min a TA. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 min a 4 °C. Três fases foram formadas, somente a fase superior (contendo o RNA total) foi recuperada em um novo microtubo de 1,5 mL sem contato com as demais fases. Foram adicionados 100  $\mu$ L de isopropanol (MERCK), o conteúdo foi vortexado por 15 s e incubado por 10 min a TA. O conteúdo foi centrifugado à 12.000 x g por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi completamente removido vertendo o tubo e utilizando micropipeta. O pellet formado foi lavado com 200  $\mu$ L de etanol (MERCK) a 75% e vortexado por 15 s. Em seguida, a suspensão foi centrifugada à 7.500 x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi removido, e o secamento do tubo foi esperado. Foram adicionados 20  $\mu$ L de água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC) (Sigma), ressuspendido e incubado à 56 °C por 10 min. O conteúdo foi quantificado em espectrofotômetro. Após a obtenção do RNA, uma RT-qPCR foi realizada. O RNA total, foi utilizado em uma reação da transcriptase reversa para produzir cDNA usando o Kit SuperScript III (Invitrogen). As reações de RT-qPCR em tempo real, para as fitas positiva e negativa do RNA, foram feitas utilizando-se o reagente SYBR Green (Sigma), de acordo com o método previamente descrito (PORTER *et al.*, 2004). Para cada reação foram utilizados 4  $\mu$ L de cDNA, 1  $\mu$ L (500 nM) do iniciador senso e 1  $\mu$ L (500 nM) do iniciador anti-senso, específico

para o CHIKV, 10 µL do reagente Ready Mix e H<sub>2</sub>O ultra pura q.s.p para um volume final de 20 µL. O protocolo de amplificação consistiu em um ciclo inicial a 94 °C, por 5 min; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C, por 55 s; pareamento (temperatura específica dos iniciadores) por 50 s e extensão a 72°C por 60 s. As reações da PCR quantitativa foram feitas em termociclador Step One Real Time PCR (Applied Biosystems).

## 5.5 Ensaios biológicos com inibidor farmacológico

O inibidor Trametinibe (*Selleckchem*, EUA) foi testado neste trabalho, sendo um IF específico para MEK/ERK. O inibidor foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante, em condições ótimas para a inibição específica de seus respectivos alvos, sem causar efeitos tóxicos às células (RIVERO, 2020 – submetido)

### 5.5.1 Ensaio virucida

O ensaio virucida foi realizado para verificar se o Trametinibe nas concentrações em que não houve citotoxicidade para as células Vero (10, 20 e 40 µM) (RIVERO, 2020 – submetido) selecionadas para uso, exibiriam atividade virucida. Para isso foram utilizados cinco microtubos com capacidade para 1,5 mL, cada um com uma condição diferente. Tanto o veículo (DMSO) quanto o Trametinibe foram diluídos em MEM 1% utilizando a fórmula  $C_1V_1 = C_2V_2$ . O experimento foi organizado em cinco tubos (**Tabela 4**).

**Tabela 4 – Ensaio virucida.**

Tubo	Conteúdo
1	CHIKV + MEM 1% (Controle)
2	CHIKV + DMSO 40 µM
3	CHIKV + Trametinibe 10 µM
4	CHIKV + Trametinibe 20 µM
5	CHIKV + Trametinibe 40 µM

Os tubos foram aliquotados com 500  $\mu$ L de MEM/IF/DMSO mais 500  $\mu$ L do CHIKV PT. Foram deixados na estufa a 37 °C com atmosfera de CO<sub>2</sub> durante o tempo determinado de cada experimento (1 h ou 17 h). As amostras foram tituladas e comparadas entre si. Esse ensaio foi executado em duplicata biológica.

### 5.5.2 Ensaio Dose-resposta do inibidor farmacológico

Os ensaios de dose-resposta foram realizados utilizando-se três concentrações pré-selecionadas de Trametinibe (10, 20 e 40  $\mu$ M), as quais além de não serem citotóxicas, também não apresentaram atividade virucida. Essas concentrações foram estabelecidas previamente por experimentos em MTT do grupo em células Vero (RIVERO, 2020 – submetido). As células Vero foram implantadas em placas de 24 poços (Kasvi) até obterem confluência de ~95%, sendo então infectadas ou não com CHIKV à MOI 0.1. Após 1 h de adsorção a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub>, o IF foi adicionado em contato com a monocamada durante tempo estabelecido para cada experimento (8 e 17 hpi). Todos os poços estavam em triplicata, com as condições descritas na **tabela 5** e ao fim de cada experimento, o sobrenadante foi coletado e a titulação foi realizada.

**Tabela 5 – Condições ensaio dose-resposta Trametinibe em células Vero.**

Poços (triplicata)	Conteúdo
1, 2 e 3	Mock (Vero + MEM 1% SFB)
4, 5 e 6	Controle de vírus (CHIKV + Vero)
7, 8 e 9	Vero + Trametinibe 10 $\mu$ M
10, 11 e 12	CHIKV + Trametinibe 10 $\mu$ M
13, 14 e 15	Vero + Trametinibe 20 $\mu$ M
16, 17 e 18	CHIKV + Trametinibe 20 $\mu$ M
19, 20 e 21	Vero + Trametinibe 40 $\mu$ M

### 5.5.3 Curva de multiplicação e ciclo único do CHIKV após tratamento com inibidor farmacológico

O ensaio foi realizado nas condições correspondentes ao tópico 5.4.5, porém incluído o Trametinibe na concentração de 40  $\mu$ M. Células Vero foram infectadas de acordo com as condições descritas na **tabela 6**. Foram selecionados os tempos de 4, 8 hpi (MOI 5,0) e 8, 16 e 24 hpi (MOI 0,1), as células então foram preparadas para MET de acordo com o tópico 5.6 a seguir.

**Tabela 6 – Condições curva de multiplicação e ciclo único de CHIKV em células Vero com tratamento por Trametinibe.**

Multiplicidade de infecção (MOI)	Horas pós-infecção (hpi)	Substância
0,1	8, 16 e 24	DMSO 0,2%
0,1	8, 16 e 24	Trametinibe 40 $\mu$ M
5,0	4 e 8	DMSO 0,2%
5,0	4 e 8	Trametinibe 40 $\mu$ M

## 5.6 Análises microscópicas da infecção celular pelo CHIKV

### 5.6.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Células Vero em garrafas T25 (Kasvi, Brasil) foram infectadas com o CHIKV (MOI 0,1 e 5,0) para realização das análises microscópicas da infecção após incubação com Trametinibe ou DMSO. O preparo das amostras para a análise de MET foi realizado nos tempos de 4 e 8 hpi (MOI 5.0) ou 8, 16 e 24 hpi (MOI 0.1), tempos correspondentes aos experimentos 5.4.5 e 5.5.3. Além disso, também foram

analisadas células mock, apenas com MEM 1%, tratadas com DMSO 0.2% e tratadas com Trametinibe 40  $\mu$ M após 24 h.

Ao final das infecções/tratamentos, o restante de meio foi descartado e o fixador foi adicionado. As células foram fixadas por 2 h a TA sob agitação, com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2 obtido do Centro de Microscopia (CM) da UFMG. Após as 2 h de fixação, as células foram lavadas uma vez com MEM 1% mantido nas mesmas condições (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) do meio com células por pelo menos 2 h antes. Então, as células foram raspadas com rodo (*scrap*) cuidadosamente em movimentos firmes para o desprendimento das células. Essas foram transferidas para microtubos com capacidade de 1,5 mL e o restante de células contidas na garrafa foi lavado com 500  $\mu$ L de tampão fosfato 0,1 M produzido no próprio laboratório e centrifugadas por 5 min a 3.000 RPM. O sobrenadante foi descartado, o suficiente para evitar o ressecamento do precipitado. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de tampão fosfato 0.1 M e foram deixadas à 4°C até o momento do envio para posterior preparo no CM. Neste, elas foram pós-fixadas por 15 min em tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio 0.8%, cloreto de cálcio 5 mM em tampão fosfato 0.1 M, por 1 h, a TA no escuro. A solução de pós-fixação foi, então, removida, e o precipitado celular lavado duas vezes com tampão fosfato 0.1 M, e assim como na etapa anterior, foi ressuscitado e centrifugado. O material foi desidratado progressivamente com acetona (50%, 70%, 90%, e 100%), deixando-se por 10 min em cada um dos tratamentos e centrifugando-se, posteriormente, a 3.000 RPM por 3 min entre cada um dos tratamentos. A acetona 100% foi retirada adicionando-se à mistura EPON/Acetona (1:2) e deixando-se por 24 h a TA. A cada intervalo de 24 h, foi trocada a proporção da mistura EPON/Acetona de maneira a aumentar gradativamente a proporção de EPON. O material infiltrando foi deixado em EPON 100% por 48 h em congelador a -20 °C. O material foi incluído em EPON 100%, deixando-o polimerizar a 60 °C por 72 h. O material foi, então, cortado com ultramicrótomo e as secções ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila a 5% durante 20 min, lavadas em água destilada e colocadas em citrato de chumbo por 5 min, sendo que posteriormente foram novamente lavadas em água destilada. As imagens foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit - FEI - 2006 de 120 kV no CM. Por fim, foram analisadas para melhor descrição e observação das estruturas celulares e virais

### 5.6.2 Microscopia eletrônica de varredura

Células Vero foram implantados em lamínulas de 12 mm de diâmetro (Perfecta, Brasil) inseridas em placas de 24 poços (Kasvi, Brasil) (1,9 cm<sup>2</sup>) e infectados com o CHIKV a MOI de 0,1 ou mock-infectadas. Após 1 h de adsorção, o meio contendo o inóculo viral foi retirado, a monocamada lavada 1 vez com MEM 1% de SFB, para a retirada dos vírus que não adsorveram, e 1 ml de MEM 1% foi adicionado. Após os tempos de 4, 5, 6, 7 e 8 hpi, as células foram fixadas com Glutaraldeído (Grau 1) a 2,5% em tampão 0,1 M cacodilato (pH 7,4) por 2 h a TA, lavadas 3 vezes com tampão 0,1M cacodilato. As etapas seguintes de pós-fixação foram realizadas no CM, sendo as etapas de: fixação secundária com tetróxido de ósmio a 1%, imersão em ácido tânico 1%, desidratação em solução crescente de álcool etílico (50 a 100%), passagem pelo ponto crítico de CO<sub>2</sub> para a completa secagem da amostra. O material foi metalizado durante 90 s, sob uma corrente de 40 mA e a uma distância de aproximadamente 3 cm da placa de ouro e metalização feita em ouro contendo espessura de 5 nm. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura com canhão de emissão por efeito de campo (Quanta 200 - FEG - FEI / 2006) do Centro de Microscopia da UFMG.

### 5.6.3 Imunofluorescência e microscopia confocal

O ensaio de imunofluorescência foi realizado para analisar a diferença entre as células infectadas não tratadas e tratadas com Trametinibe. Além de avaliar a morfologia das células em diferentes tempos de infecção. A microscopia confocal foi realizada para analisar a natureza das projeções encontradas no ciclo de multiplicação do CHIKV e colocalização viral. Para o ensaio de imunofluorescência,  $1,5 \times 10^5$  células Vero foram implantadas em lamínulas de 12 mm de diâmetro (Perfecta, Brasil) inseridas em placas de 24 poços (Kasvi, Brasil)(1,9 cm<sup>2</sup>) e infectados com o CHIKV a MOI de 0,1 ou mock-infectadas. Após 1 h de adsorção, o meio contendo o inóculo viral foi retirado, a monocamada lavada 1 vez com MEM 1% de SFB, para a retirada dos vírus que não adsorveram, e 1 ml de MEM 1% ou MEM 1% contendo DMSO ou Trametinibe a 40 µM. As infecções foram incubadas por 8, 16 ou 24 hpi. Três protocolos foram testados ao longo dos experimentos. Após o tempo de cada infecção, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X gelado, o PBS foi descartado e as células foram imediatamente fixadas por 10 min com metanol gelado (a TA), acetona (a -20 °C) ou paraformaldeído 4% (a TA), de



acordo com o protocolo testado. O fixador foi retirado (para a fixação com paraformaldeído, triton X-100 a 0,1% em PBS/BSA a 1% por 5 min), as células foram incubadas com PBS/BSA 3% por 30 min, após o tempo, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1X. Foram adicionados por 1 h a TA em câmara úmida os anticorpos policlonais primários anti-CHIKV produzidos por nós em camundongos, diluídos de 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:2500 e 1:3000 em PBS/BSA 1%. Três lavagens com PBS foram feitas e o anticorpo secundário (AlexaFluor 488-anti-camundongo IgG) diluído de 1:400 em PBS/BSA 1% foi adicionado; as células foram incubadas por 1 h a 37 °C. Três lavagens com PBS foram feitas e as células foram incubadas com 4,6-diamino-2phenylindole (DAPI) (Sigma, São Paulo, Brazil), diluído em 1:1000 em PBS/BSA 1% por 1 h a TA protegido da luz. Três lavagens com PBS foram feitas e rodamina conjugada à faloidina (Invitrogen) diluída em 1:1000 em PBS/BSA 1% foi adicionada e incubada por 1 h a TA protegida da luz. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se uma gota de mowiol (sigma, EUA). O mock também foi fixado e preparado seguindo o mesmo protocolo acima. As células foram observadas usando microscópio (Zeiss) axio imager Z2-apotome 2 no CM-UFMG e o programa zen lite foi utilizado para o processamento das imagens.

Para a microscopia confocal,  $1 \times 10^4$  células Vero foram implantadas em lamínulas de 12 mm de diâmetro (Perfecta, Brasil) inseridas em placas de 24 poços (Kasvi, Brasil) (1,9 cm<sup>2</sup>) e infectados com o CHIKV a MOI de 0,1 ou mock-infectadas. O mesmo protocolo de imunofluorescência foi aplicado. Porém, as lâminas foram analisadas no centro de aquisição e processamento de imagens (CAPI) da UFMG utilizando o microscópio confocal 5 live. As imagens foram processadas no programa zeiss ZEN 3.0 blue edition.

### **5.7 Ensaios biológicos de infecção com CHIKV *in vivo***

Todos os ensaios *in vivo* foram executados após realização da disciplina BIG848 - camundongos como modelos experimentais do departamento de Biologia Geral (Genética) – ICB – UFMG, além de treinamento prático supervisionado por manipuladores mais experientes. Todas as práticas utilizaram o princípio ético nos cuidados e manipulações com os animais baseados no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Experimentos pilotos foram realizados com animais das linhagens C57BL/6 e A129. O presente trabalho está sob protocolo comissão de ética no uso de animais (CEUA) – UFMG número 07/2019.

### 5.7.1 Produção de anticorpos em camundongos

Anticorpos foram produzidos em camundongos machos selvagens C57BL/6 adultos com seis semanas. Para esta produção,  $10^5$  PFU de CHIKV foram inoculados por via intraplantar e  $10^5$  PFU por via subcutânea, concomitantemente. Após 14 dias, uma dose reforço com mais  $10^5$  PFU foi inoculada junto com um adjuvante (*emulsigen*, MVP) e após mais sete dias, os animais foram eutanasiados e o sangue total foi coletado por meio da veia braquial. O sangue foi mantido em TA por 30 min e foi centrifugado por 10 min a 1000 g em centrífuga *ependorf* 5818R, depois o soro dos camundongos foi coletado e armazenado em freezer -20 °C.

### 5.7.2 Infecção com CHIKV dos camundongos C57BL/6

O experimento foi realizado com animais adultos machos e fêmeas com 5-6 semanas de idade baseados em Gardner *et al.* (2010). Os animais foram obtidos do biotério da Faculdade de Farmácia (CEBIO) em condições convencionais. Foram acomodados e manipulados no biotério do Departamento de Microbiologia – ICB – UFMG (Nível de Biossegurança 2 - NB2). Os animais foram criados em sistema de controle de luz de 12 h/12 h com condições de comida, água disponível e troca da cama em maravalha feita semanalmente ou a cada 14 dias. Além de uso de minisoladores em rack ventilada para o acondicionamento dos animais, que foram deixados no máximo em grupos de 6 animais por gaiola. Os animais foram inoculados com 10 µL de MEM 1% para o grupo mock e 10 µL (PFU/animal descrito logo abaixo) do pool trabalho de CHIKV para os grupos infectados. Foi utilizada a via intraplantar (uma variação de via subcutânea) no coxim plantar da pata traseira esquerda do animal na direção dedo-tornozelo. Um edema de pata era esperado e para isso, foi utilizado um paquímetro digital (ZASS) para a mensuração da largura e altura da região do edema de pata. Para a avaliação do grau de crescimento do edema, a fórmula  $[(x - \text{dia } 0)/\text{dia } 0]$  foi utilizada. No qual o x é o valor do produto da altura pela largura referente ao dpi analisado. O dia 0 corresponde ao valor desse produto referente ao 0 dpi. Todos esses valores correspondem à mesma pata inoculada do mesmo animal. Os animais foram avaliados e pesados diariamente durante 14 dias em condições experimentais descritas na **tabela 7**.

**Tabela 7 – Condições experimentos com camundongos C57BL/6**

Grupo	Sexo	Dose infectante	n
1 - Mock	Fêmea	MEM 1% em 10 µL	2
2	Fêmea	10 <sup>2</sup> PFU em 10 µL	4
3	Fêmea	10 <sup>4</sup> PFU em 10 µL	4
4 - Mock	Macho	MEM 1% em 10 µL	2
5	Macho	10 <sup>2</sup> PFU em 10 µL	4
6	Macho	10 <sup>4</sup> PFU em 10 µL	4

### 5.7.3 Infecção com CHIKV dos camundongos A129

O experimento foi realizado com animais adultos fêmeas e machos com 8 semanas de idade para os experimentos com 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> PFU (**tabela 8**), baseados em Gardner *et al.* (2012). Animais fêmeas de 10 a 12 semanas foram utilizados para os experimentos com 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, e 10<sup>3</sup> PFU e tratados com Trametinibe 2 mg/kg (**tabela 9**). Os animais foram obtidos do biotério do Departamento de Microbiologia – ICB – UFMG em condições convencionais. Foram acomodados e manipulados no mesmo biotério. Os animais foram criados em sistema de controle de luz de 12 h/12 h com condições de comida, água disponível, troca da cama em maravalha feita semanalmente ou a cada dez dias. Além de uso de minisoladores em rack ventilada para o acondicionamento dos animais, que foram deixados no máximo em grupos de seis animais por gaiola. Os animais foram inoculados com 10 µL de MEM 1% para o grupo mock e 10 µL (10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> ou 10<sup>4</sup> PFU/animal descrito logo abaixo) do PT de

CHIKV para os grupos infectados. Foi utilizada a via intraplantar, no coxim plantar da pata traseira esquerda do animal na direção dedo-tornozelo. Os animais foram avaliados e pesados diariamente durante 5 dias em condições experimentais descritas na **tabela 8**. Cerca de 10  $\mu$ L de sangue da cauda dos animais foram coletados no 3° dpi, para análise de viremia. Como nesse modelo KO o CHIKV é letal, o fígado, baço, a pele da região da pata traseira e o músculo da pata de um animal fêmea infectado foram coletados em nitrogênio líquido e depois armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Animais fêmeas de 10 a 12 semanas foram utilizados para a avaliação da letalidade do CHIKV (**Tabela 9**). Esses animais foram infectados nas mesmas condições como descrito acima em  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  PFU. Animais machos e fêmeas (**Tabela 10**) foram testados para o tratamento por Trametinibe. Foram tratados diariamente por gavagem, durante três dias com Trametinibe (2 mg/kg), pesados e avaliados diariamente até o 4° dpi.

**Tabela 8 – Camundongos A129 machos e fêmeas testados com infecção por CHIKV.**

Grupo	Sexo	Dose infectante	n
1 - Mock	Fêmea	MEM 1% em 10 $\mu$ L	2
2	Fêmea	$10^3$ PFU em 10 $\mu$ L	4
3	Macho	$10^3$ PFU em 10 $\mu$ L	1
4	Macho	$10^4$ PFU em 10 $\mu$ L	1

**Tabela 9 – Camundongos A129 com 10 a 12 semanas infectados com CHIKV.**

Grupo	Sexo	Dose infectante	n
-------	------	-----------------	---

1 - Mock	Fêmea	MEM 1% em 10 $\mu$ L	4
2	Fêmea	$10^1$ PFU em 10 $\mu$ L	5
3	Fêmea	$10^2$ PFU em 10 $\mu$ L	5
4	Fêmea	$10^3$ PFU em 10 $\mu$ L	4

**Tabela 10 – Condições experimentos com camundongos A129 tratados com Trametinibe 2 mg/kg com 10 a 12 semanas.**

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Dose infectante</b>	<b>Tratamento</b>
1 - Mock	Fêmea	MEM 1% em 10 $\mu$ L	MEM 1%
2 – Veículo (CMC)	Fêmea	$10^3$ PFU em 10 $\mu$ L	CMC
3	Fêmea	$10^3$ PFU em 10 $\mu$ L	Trametinibe 2 mg/kg
4 - Mock	Macho	MEM 1% em 10 $\mu$ L	MEM 1%
5 – Veículo (CMC)	Macho	$10^3$ PFU em 10 $\mu$ L	CMC
6	Macho	$10^3$ PFU em 10 $\mu$ L	Trametinibe 2 mg/kg

## 5.8 Análise estatística

Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad) para o teste *t* de Student, regressão linear, normalização e regressão logística não linear, considerando um  $p < 0,05$  como significativo.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Ensaios biológicos com inibidor farmacológico

#### 6.1.1 Ensaio virucida e ensaio dose-resposta de Trametinibe

Para avaliar o efeito virucida do trametinibe foram utilizados como referência os ensaios de citotoxicidade por MTT e cristal violeta já realizados pelo grupo em células Vero (RIVERO, 2019), descartando-se assim a possibilidade de interferência por citotoxicidade do composto *in vitro*. Com base nesse teste, foram selecionadas três concentrações sem efeito citotóxico para as células: 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ .

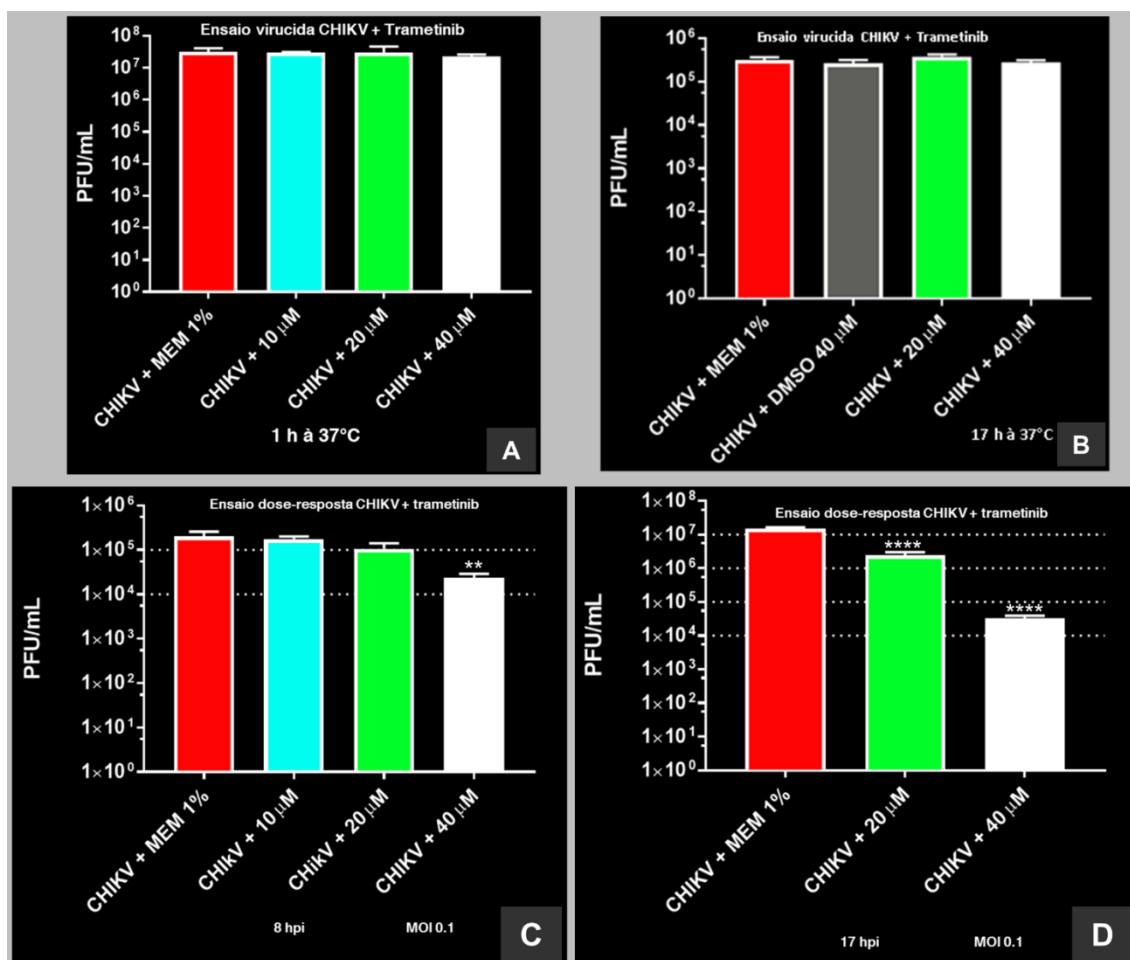
Primeiro foi realizado um ensaio para avaliar se o efeito do Trametinib não estaria inativando as partículas virais por si só, isto é, teria efeito virucida. O teste foi realizado como descrito a seguir. O tempo de 1 h a 37°C, que é o tempo padrão para esse teste baseado na literatura, foi empregado inicialmente (**Figura 10A**). Nas condições testadas não houve diferença entre os títulos virais detectados a partir da amostra mock (CHIKV + MEM1%) e aqueles das amostras em que o inibidor diluído foi colocado em contato com o vírus. Porém, como o contato do vírus com o inibidor durante a infecção duraria mais que 1 h, a abordagem foi alterada e o tempo de exposição foi aumentado no ensaio virucida. Dessa vez, o IF foi deixado em contato com o vírus pelo mesmo período do próximo experimento biológico com o IF: 17 h. Isso foi feito com o objetivo de avaliar o mesmo tempo de contato do IF com o vírus. O experimento realizado por 17 h (**Figura 10B**), assim como o ensaio de 1 h, não mostrou diferença na redução de partículas infecciosas entre o mock e as concentrações de Trametinibe, mostrando que o IF não tem efeito virucida.

Um ensaio de dose-resposta de tempo único foi realizado com a MOI 0,1 em células Vero com objetivo de avaliar se nas concentrações escolhidas, o Trametinibe teria efeito dose-dependente sobre a multiplicação viral.

Nossos resultados demonstraram que no tempo único de 8 hpi as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  não apresentaram diferença significativa em relação ao controle. Já a concentração de 40  $\mu\text{M}$  apresentou diferença significativa e reduziu o título viral em 1-log na base 10 (de  $2 \times 10^5$  para  $2 \times 10^4$  PFU/mL) (**Figura 10C**), demonstrando um potencial dose-dependente do IF.

O mesmo teste foi realizado em 17 hpi, dessa vez testando apenas duas concentrações 20 e 40  $\mu\text{M}$ . Ambas as concentrações reduziram significativamente a

quantidade de vírus. A redução do título viral foi de 1-log na base 10 ( $1,5 \times 10^7$  PFU/mL para  $2,4 \times 10^6$  PFU/mL) para a concentração de 20  $\mu$ M e de 3-log ( $1,5 \times 10^7$  PFU/mL para  $3,33 \times 10^4$  PFU/mL) para a concentração de 40  $\mu$ M (**Figura 10D**). Apesar da diferença significativa entre as concentrações de 20 e 40  $\mu$ M, a redução em escala logarítmica é um valor mais expressivo, particularmente quando se considera analisar o efeito antiviral. Devido a isso, decidiu-se seguir os experimentos utilizando a concentração de 40  $\mu$ M.



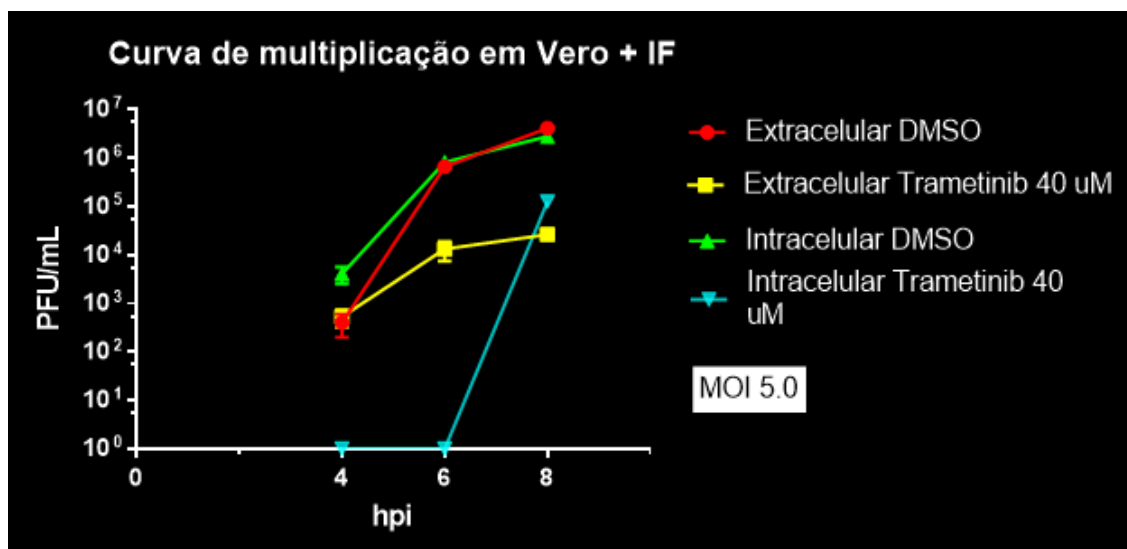
**Figura 10 – Ensaios virucida e dose-resposta com Trametinibe.**

A) Ensaio virucida realizado expondo-se o chikungunya vírus (CHIKV) frente ao Trametinibe por 1 h a 37 °C ou por B) 17 h a 37 °C. C) Células Vero foram infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 8 horas pós-infecção (hpi) tratadas ou não com o Trametinibe e foi realizado o ensaio dose-resposta. D) Células Vero foram infectadas com CHIKV na MOI de 0,1 por 17 hpi tratadas com Trametinibe e foi realizado o ensaio dose-resposta. Em vermelho: CHIKV + MEM 1% (controle); em cinza: CHIKV + DMSO; em azul: CHIKV + 10  $\mu$ M de Trametinibe; em verde: CHIKV + 20  $\mu$ M de Trametinibe e em branco: CHIKV + 40  $\mu$ M de Trametinibe.



### 6.1.2 Curva de multiplicação e ciclo único em presença do Trametinibe

Com o objetivo de avaliar o comportamento da redução dos títulos virais frente ao tratamento com Trametinibe a 40  $\mu$ M, foi realizada uma curva de ciclo único de CHIKV em função do tempo. Para isso, foram avaliados tempos precoces com a MOI 5,0, mesma MOI inicialmente utilizada e que foi utilizada para avaliação posterior por MET. Os tempos selecionados para a avaliação foram: 4, 6 e 8 hpi (**Figura 11**). Para o conteúdo do sobrenadante (linhas vermelha e amarela do gráfico) não foi observada diferença entre o título contendo DMSO e contendo o IF no tempo de 4 hpi. No entanto, a partir de 6 hpi houve diferença de 1-log na base 10 para o conteúdo tratado e às 8 hpi a diferença foi de 2-log na base 10. Esse resultado, exibe uma diminuição da produção viral dependente do tempo. Para o conteúdo intracelular (linhas verde e azul do gráfico) ocorreu diferença visível de pelo menos 3-log na base 10 no tempo de 4 hpi; para o tempo de 6 hpi a diferença foi de 5-log na base 10 e às 8 hpi o conteúdo tratado parece se restabelecer atingindo apenas 1-log na base 10 de diferença. Esses resultados mostram um possível retardo durante o ciclo de multiplicação de partículas infecciosas intracelulares que passam a ser detectadas a partir das 6 hpi, diferentemente do conteúdo não tratado. No entanto, mais análises de tempos posteriores precisam ser efetuadas. Como o conteúdo intracelular tratado (linha azul) ultrapassa o conteúdo extracelular tratado (linha amarela) às 8 hpi, pode ser sugerido que o Trametinibe afete a liberação viral. Pois, os vírus podem estar acumulados no citoplasma e terem dificuldade na finalização do processo de liberação. A diferença entre esses dois é de 1-log na base 10 às 8 hpi.



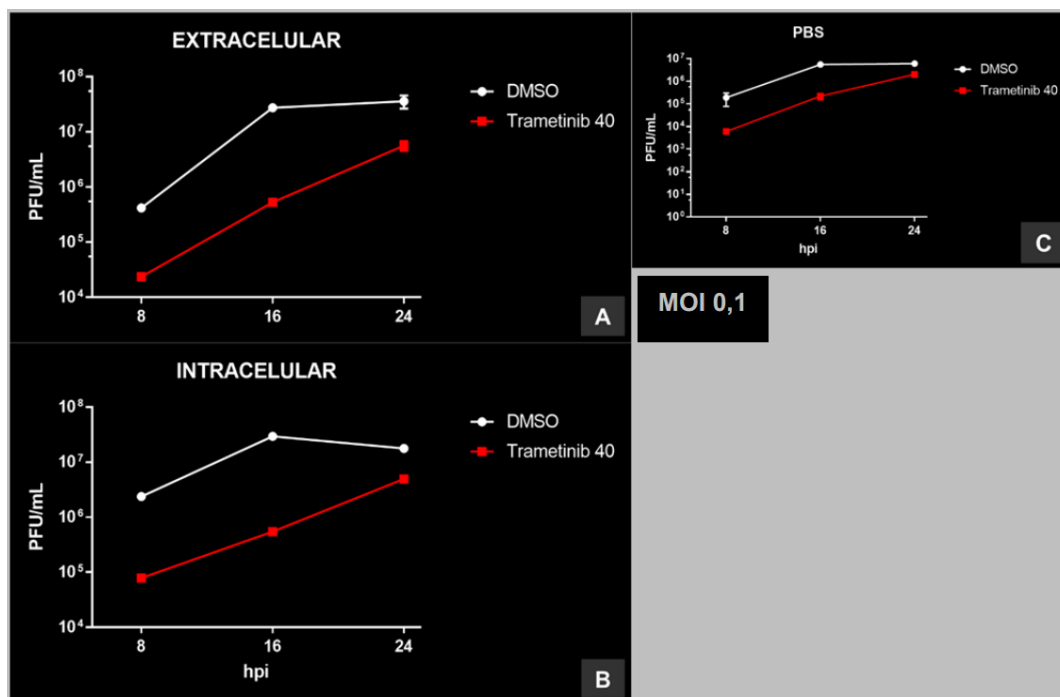
**Figura 11 – Curva de ciclo único do CHIKV em Vero intra e extracelular com tratamento por Trametinibe 40 µM.**

Células Vero foram infectadas com CHIKV na MOI de 5,0 por 4, 6 e 8 hpi. Linha vermelha: células infectadas, tratadas com DMSO e com conteúdo extracelular titulado; linha amarela: células infectadas, tratadas com Trametinibe 40 µM e com conteúdo extracelular titulado; linha verde: células infectadas, tratadas com DMSO e com conteúdo intracelular titulado e linha azul: células infectadas, tratadas com Trametinibe 40 µM e com conteúdo intracelular titulado. O tratamento foi realizado iniciando com a adsorção viral.

Para avaliarmos outros tempos optamos por uma curva de multiplicação utilizando MOI mais baixa, 0,1. Os tempos de 8, 16 e 24 hpi representavam períodos de avaliação auspiciosos referentes à curva de multiplicação do vírus. Para o conteúdo do sobrenadante (**Figura 12A**), a diferença às 8 hpi foi de apenas 1-log na base 10 (DMSO:  $4,2 \times 10^5$  PFU/mL para IF:  $2,3 \times 10^4$  PFU/mL). Para o tempo de 16 hpi a diferença foi de 2-log (DMSO:  $2,7 \times 10^7$  PFU/mL para IF:  $5,6 \times 10^6$  PFU/mL). E para o tempo 24 hpi a diferença foi de 1-log na base 10 (DMSO:  $3,6 \times 10^7$  PFU/mL para IF:  $5,6 \times 10^6$  PFU/mL). Esses resultados mostram que a diferença de inibição caiu no tempo de 24 hpi, mas ainda apresenta uma redução da produção de vírus do sobrenadante em todos os tempos. Entretanto, mais análises precisam ser realizadas para tempos posteriores para avaliar se a produção seria restabelecida. Na curva do conteúdo intracelular (**Figura 12B**) para os tempos de 8, 16 e 24 hpi a redução foi de 2-log (DMSO:  $2,3 \times 10^6$  PFU/mL para IF:  $7,8 \times 10^4$  PFU/mL), 2-log (DMSO:  $2,9 \times 10^7$  PFU/mL para IF:  $5,4 \times 10^5$  PFU/mL) e 1-log na base 10 (DMSO:  $1,7 \times 10^7$  PFU/mL para IF:  $4,9 \times 10^6$  PFU/mL), respectivamente. O comportamento da produção dos vírus intracelulares tratados com Trametinibe se assemelha ao dos vírus extracelulares. A **figura 12B** mostra a curva de multiplicação com o conteúdo do PBS utilizado (4 vezes) na lavagem da monocamada após o tempo determinado. Muitas partículas virais foram

retiradas do conteúdo intracelular, atingindo títulos de  $10^6$  PFU/mL. Comparando-se com o conteúdo intracelular após a lavagem (**Figura 12B**), vemos que os títulos das amostras com DMSO (linhas brancas) são maiores na imagem B que em C. O que sugere que as partículas virais tituladas sejam partículas intracelulares infecciosas e não partículas aderidas na membrana das células que não foram retiradas na lavagem. Isto é, sugerindo que o envelope possa ser adquirido de alguma forma ainda intracelularmente, o que geraria uma partícula com capacidade de penetração e infecciosa.

O Trametinibe já foi anteriormente utilizado pelo GTS como potencial anti-flaviviral quando incorporado a ciclodextrinas, o que é objeto de depósito de patente no INPI sob número do processo: BR 13 2017 020173 1, de 21/09/2017 (BONJARDIM, 2017b). Tendo nosso grupo sido pioneiro nessa abordagem de reposicionamento do Trametinibe para o uso como potencial antiviral. Outros vírus também foram analisados com a estratégia de reposicionamento desse medicamento com o objetivo de tratar IAV e HIV (DOCHI *et al.*, 2017; SCHRÄDER *et al.*, 2018). Assim como nesses trabalhos e em dados recentes do grupo para o ZIKV (RIVERO, 2020 – submetido), o Trametinibe se mostra uma alternativa promissora contra vírus em resultados *in vitro*. Os dados encontrados até aqui, sugerem uma possível ação antiviral desse inibidor.



**Figura 12 – Curva de multiplicação do CHIKV em exposição ao DMSO ou Trametinibe.**

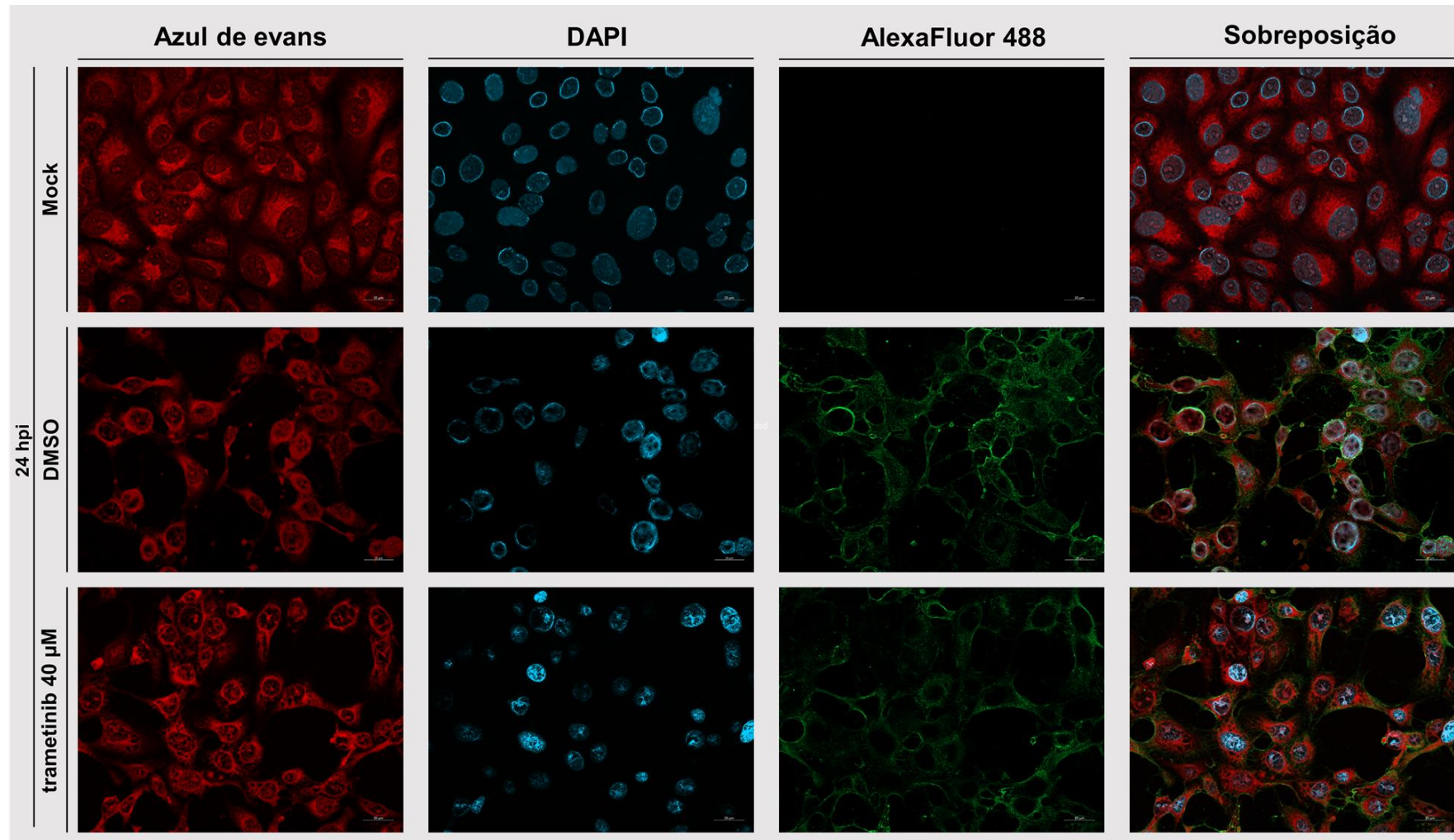
Células Vero foram infectadas com CHIKV na MOI 0,1 por 8, 16 e 24 hpi. O conteúdo extracelular, intracelular e do PBS foi titulado após a exposição ao DMSO ou Trametinibe. A) Conteúdo extracelular com DMSO e com Trametinibe titulado. B) Conteúdo intracelular com DMSO e com Trametinibe titulado e C) Conteúdo do PBS utilizado para a lavagem com DMSO e com Trametinibe titulado. Linhas brancas: infecção tratada com DMSO e linhas vermelhas: infecção tratada com Trametinibe 40 µM.

### 6.1.3 Ensaio de imunofluorescência em presença do Trametinibe

Com o objetivo de analisar se ocorre redução das partículas virais totais após as células serem infectadas com CHIKV em diferentes MOIs e tempos de infecção e tratadas ou não com Trametinibe a 40 µM, foi utilizado um ensaio de imunofluorescência e posterior visualização por microscopia.

Em ensaio de imunofluorescência foi avaliada a infecção do CHIKV em células Vero tratadas ou não com Trametinibe 40 µM. Utilizando MOI 0,1 as células foram infectadas por 24 hpi e coradas azul de Evans, DAPI e marcadas com AlexaFluor 488. As células mock infectadas não obtiveram visualização por ligação dos anticorpos específicos do vírus. Nas células tratadas com DMSO a fluorescência das partículas virais (AlexaFluor 488) foi maior que a fluorescência nas células tratadas com trametinib, corroborando os resultados de redução encontrados no tratamento durante a curva de multiplicação do CHIKV (**Figura 13**). A redução da fluorescência foi sutil, se comparada ao teste de ensaio de placa para esse mesmo tempo em que a diferença foi de 1-log na base 10. Na imunofluorescência a marcação mostra a

ligação do anticorpo primário policlonal às proteínas estruturais do vírus, representando a visualização das partículas totais. Essa redução é naturalmente maior em ensaios de partículas infecciosas, já que os vírus tem a característica de produzirem muitas partículas totais, porém bastante partículas defectivas (não infecciosas) (VON MAGNUS, 1954).



**Figura 13 – Células Vero infectadas com chikungunya vírus (CHIKV) para ensaio de imunofluorescência.**

Células Vero infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 24 horas pós-infecção (hpi), tratadas com DMSO ou Trametinibe 40  $\mu$ M e preparadas para ensaio de imunofluorescência. Citoesqueleto celular em vermelho (azul de Evans); núcleo das células marcados com azul (DAPI); proteínas virais marcadas em verde (AlexaFluor 488) e sobreposição das imagens gerando colocalização das estruturas.

#### 6.1.4 Análise microscópica da infecção por CHIKV com tratamento pelo inibidor farmacológico

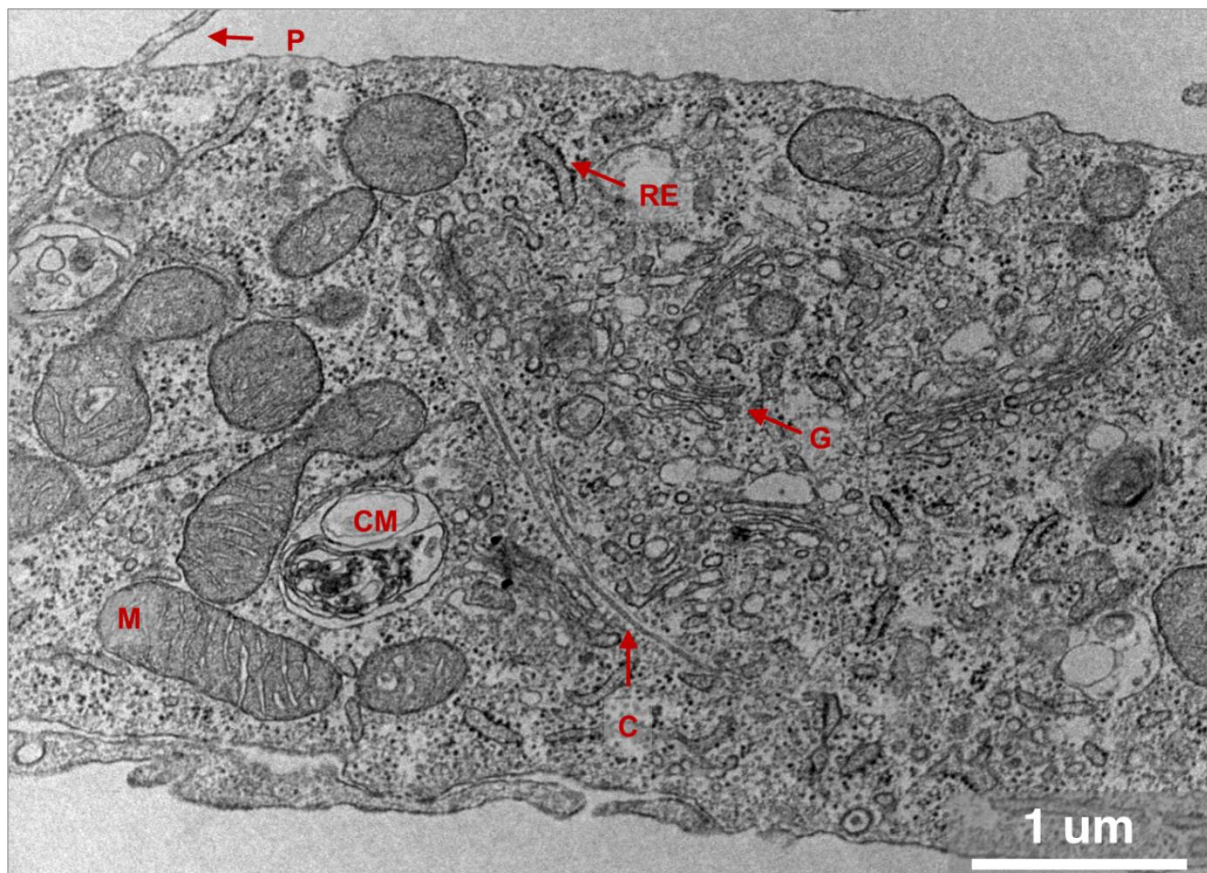
Após os experimentos anteriores, ensaios de MET foram realizados para se avaliar se alguma etapa do ciclo de multiplicação do CHIKV estaria sendo afetada pelo tratamento com Trametinibe. Para isso foram avaliadas as mesmas condições dos experimentos referidos nas **figuras 11 e 12** com algumas variações. Muitos parâmetros foram testados para esse experimento (**Tabela 11**).

**Tabela 11 – Condições microscopia eletrônica de transmissão da infecção do CHIKV em células Vero.**

Multiplicidade de infecção (MOI)	Horas pós-infecção (hpi) ou horas de incubação	Substância
Vero (sem infecção)	24 h	MEM 1%
Vero (sem infecção)	24 h	DMSO
Vero (sem infecção)	24 h	Trametinibe 40 µM
0,1	8, 16 e 24	MEM 1%
0,1	8, 16 e 24	DMSO
0,1	8, 16 e 24	Trametinibe 40 µM
Vero (sem infecção)	4 h	MEM 1%
Vero (sem infecção)	8 h	Trametinibe 40 µM
5,0	4 e 8	DMSO
5,0	4 e 8	Trametinibe 40 µM



As células mock infectadas (apenas célula e meio por 24 h) foram analisadas em aumentos com escala de 1  $\mu\text{m}$  para a visualização panorâmica do conteúdo celular (**Figura 14**). Nas imagens é possível notar a presença de organelas membranosas como mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (RE), Golgi (G), protrusão de membrana (P), citoesqueleto (C) e um corpúsculo multilamelar (CM). Esta célula representa um número de 20 células analisadas.



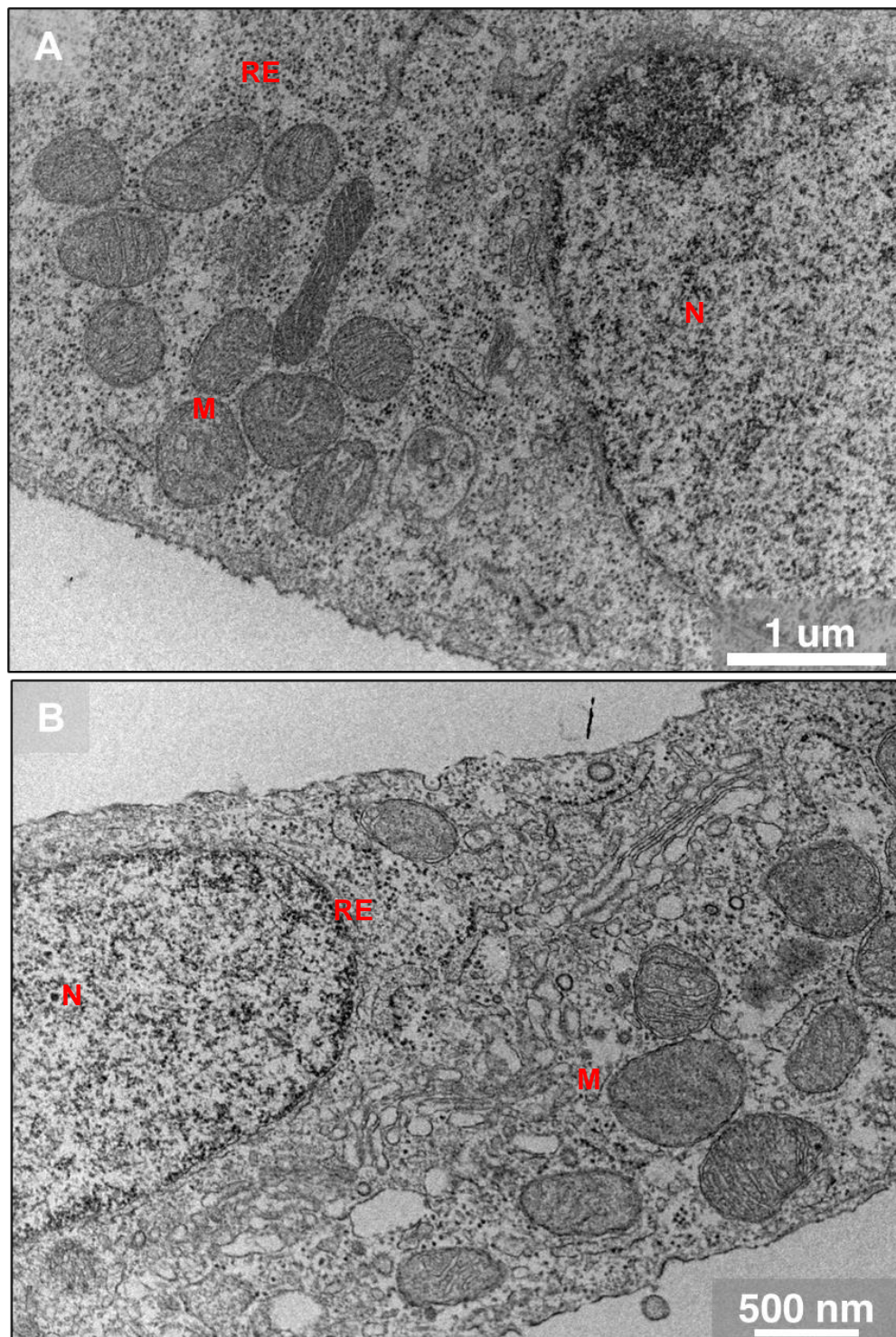
**Figura 14 – Células Vero fixadas em 24 horas.**

Micrografia de célula Vero em condições normais de cultivo (MEM 1% + antibióticos) fixada após 24 h para microscopia eletrônica de transmissão (MET). P: protrusão da membrana plasmática; RE: Retículo Endoplasmático; G: Golgi; CM: corpúsculo multilamelar; M: mitocôndria; C: citoesqueleto.

Células Vero tratadas apenas com DMSO por 24 h (**Figura 15A**) e tratadas com Trametinibe 40  $\mu\text{M}$  por 24 h (**Figura 15B**) mostram ainda a presença de parte do núcleo. É possível observar que não houve alterações morfológicas na estrutura da célula controle (**Figura 14**) para a célula tratada com DMSO (**Figura 15A**), também não houve alterações visíveis entre a célula tratada com DMSO (**Figura 15A**) e a célula tratada com Trametinibe à 40  $\mu\text{M}$  (**Figura 15B**). Isso corrobora o

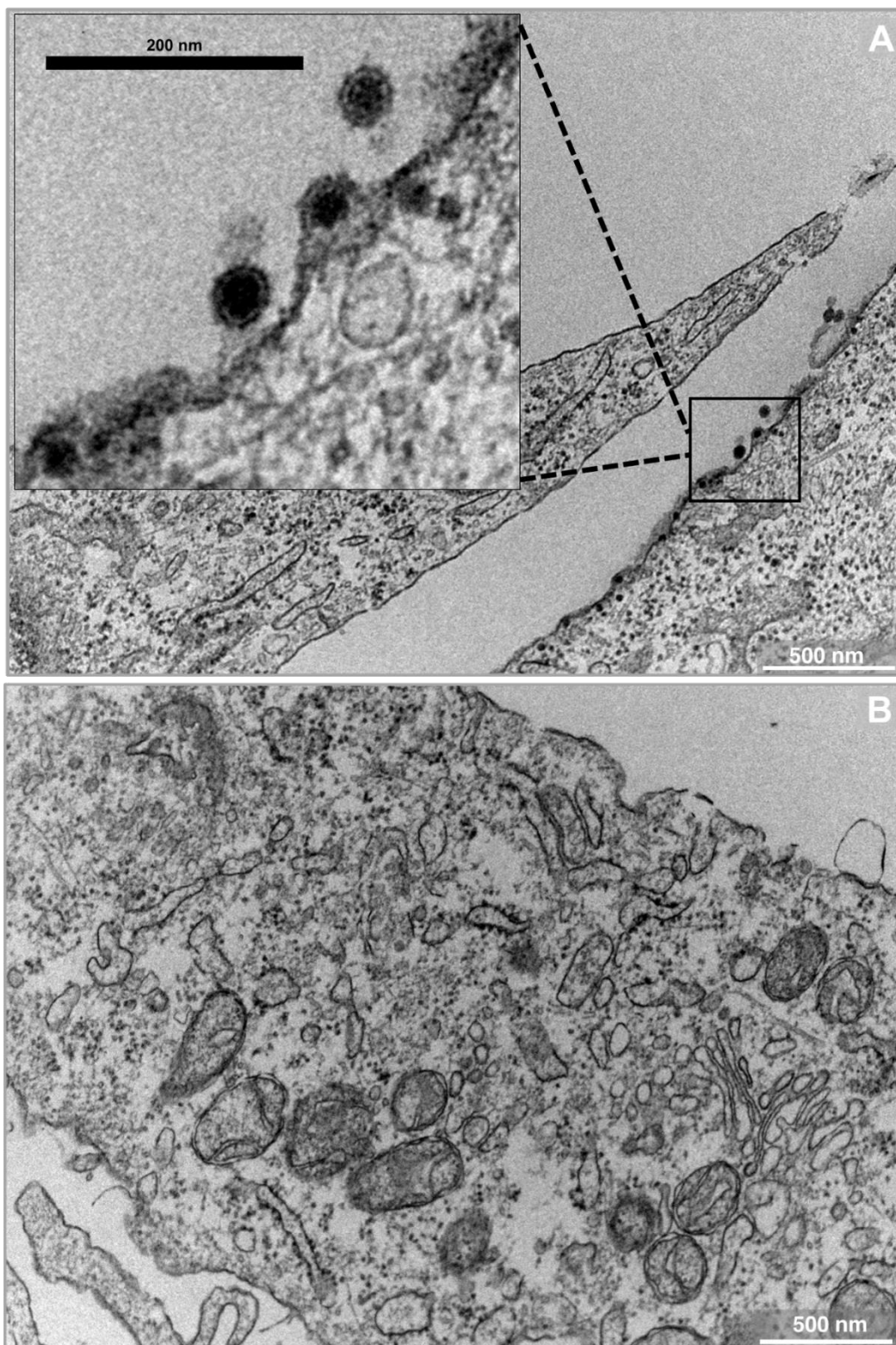


resultado anterior de citotoxicidade por MTT e cristal violeta já realizado pelo grupo (RIVERO, 2019).



**Figura 15 – Células Vero tratadas com DMSO (A) ou Trametinibe 40 µM (B) fixadas em 24 horas.** A) Célula Vero em condição normal de cultivo (MEM 1% + antibióticos), tratada com DMSO por 24 h e fixada para microscopia eletrônica de transmissão (MET). B) Célula Vero em condição normal de cultivo, tratada com Trametinibe a 40 µM por 24 h e fixada para MET.

Imagens da célula infectada com CHIKV à MOI 0,1 por 8 hpi e tratada com DMSO ou Trametinibe (**Figura 16**), apresentam poucos indícios de partículas maduras do vírus nesse tempo. Algumas alterações celulares foram visualizadas ao longo das células analisadas, relacionadas ao efeito citopático (ECP) viral, estas alterações não foram visualizadas nas células controle. A estrutura celular estava em sua maior parte similar às células controle, indicando que em 8 hpi o vírus ainda produz suas primeiras rodadas de geração de progênie, com presença também de muitas células ainda não infectadas (**Figura 16A**). Esférulas e partículas maduras foram encontradas em pequenas quantidades. Na imagem é possível notar uma partícula viral em processo de brotamento, indicando uma fase tardia do ciclo de multiplicação do vírus (**Figura 16A**). Em comparação, nas células nas mesmas condições tratadas com Trametinibe 40  $\mu$ M (**Figura 16B**) não foram encontradas partículas virais e nem esférulas. Apesar disso, um maior número de membranas intracelulares foi encontrado, podendo indicar uma fase mais precoce do ciclo comparada à observada na célula tratada com DMSO, isto é, um aparente atraso da infecção pós-tratamento com inibidor. Na maior parte das células não existiu alteração morfológica (25 células analisadas), indicando que o inibidor pode ter agido ao menos no retardo da infecção.



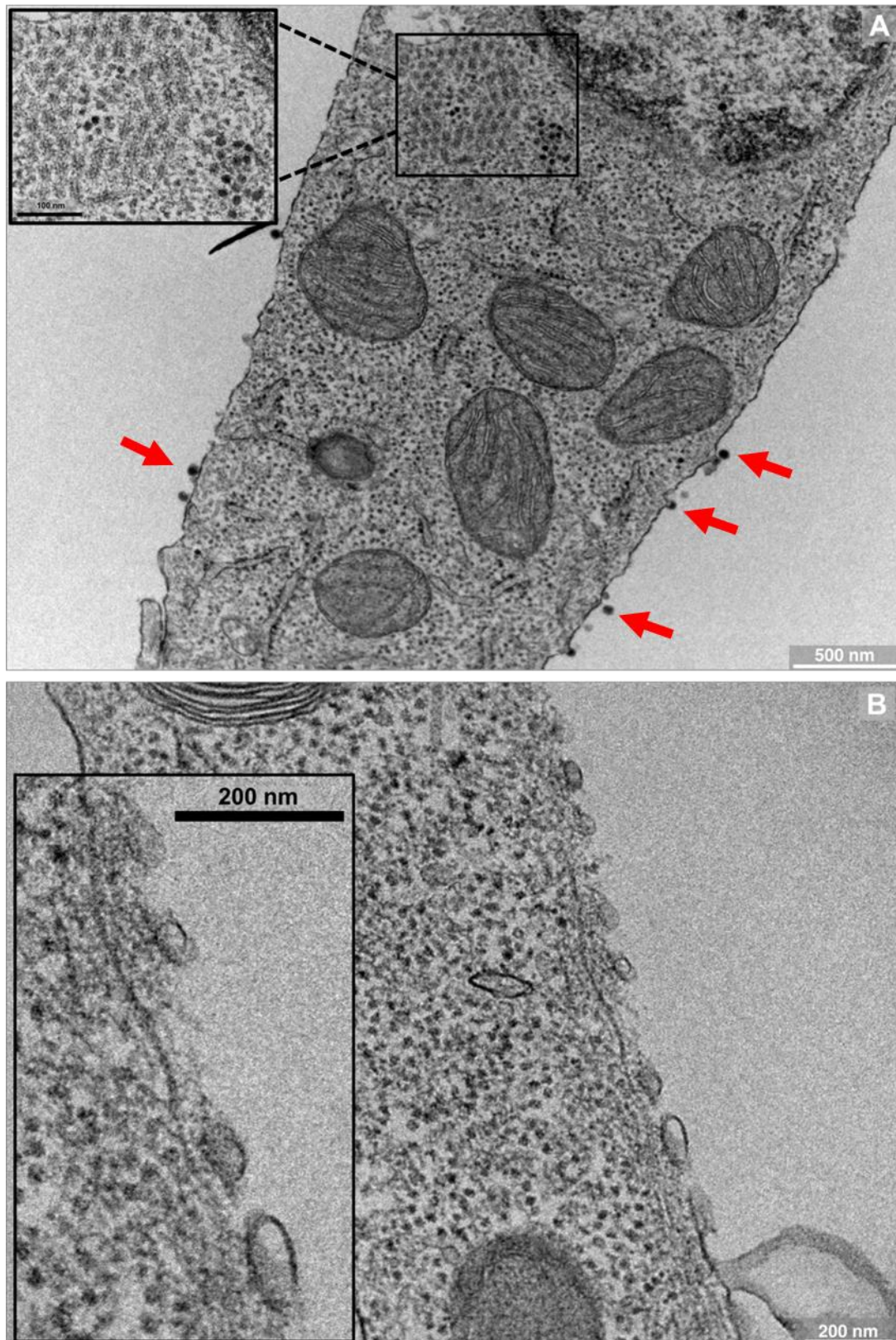
**Figura 16 – Células Vero infectadas com CHIKV por 8 horas pós-infecção (hpi).**

A) Célula Vero infectada com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 8 hpi, tratada com DMSO e fixada para microscopia eletrônica de transmissão (MET); partículas maduras são destacadas na imagem. B) Célula Vero infectada com CHIKV à MOI 0,1 por 8 hpi, tratada com Trametinibe 40  $\mu$ M e fixada para MET.

De forma proporcional, as células infectadas com CHIKV por 16 hpi e tratadas com DMSO ou Trametinibe (**Figura 17**) apresentaram alterações morfológicas. Inúmeras estruturas relacionadas ao vírus foram encontradas, exibindo uma infecção viral, após muitas rodadas de ciclos múltiplos. Partículas virais maduras foram encontradas em todas as células analisadas. As células tratadas com DMSO apresentaram estágio mais avançado do ciclo, foram observadas muitas estruturas citopáticas relacionadas ao CHIKV relatadas na literatura (HIGASHI *et al.*, 1967). Dentre elas a formação da composição das proteínas do capsídeo em conformação de colmeia (ver destaque), além da presença de capsídeos virais com formação mais avançada (**Figura 17A**). Na figura ainda é possível notar muitas partículas liberadas (setas vermelhas), mas a célula ainda não apresenta deterioração de suas estruturas. Esta célula é representativa de 25 células analisadas.

Na célula tratada com trametinib 40  $\mu$ M, a maioria das células apresentava fase com presença de esférulas (**Figura 17B**), e um número muito menor de partículas virais foi observado, em muitos campos foi possível visualizar apenas três ou menos partículas virais em uma escala de 500 nm ou 1  $\mu$ m. Mais uma vez, sugerindo que a infecção após o tratamento com Trametinibe é afetada de alguma maneira pelo inibidor.





**Figura 17 – Células Vero infectadas com CHIKV por 16 horas pós-infecção (hpi).**

A) Célula Vero infectada com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 16 hpi, tratada com DMSO e fixada para microscopia eletrônica de transmissão (MET); capsídeos virais e proteínas do capsídeo são destacados em aumento na imagem; setas vermelhas indicam partículas virais maduras.

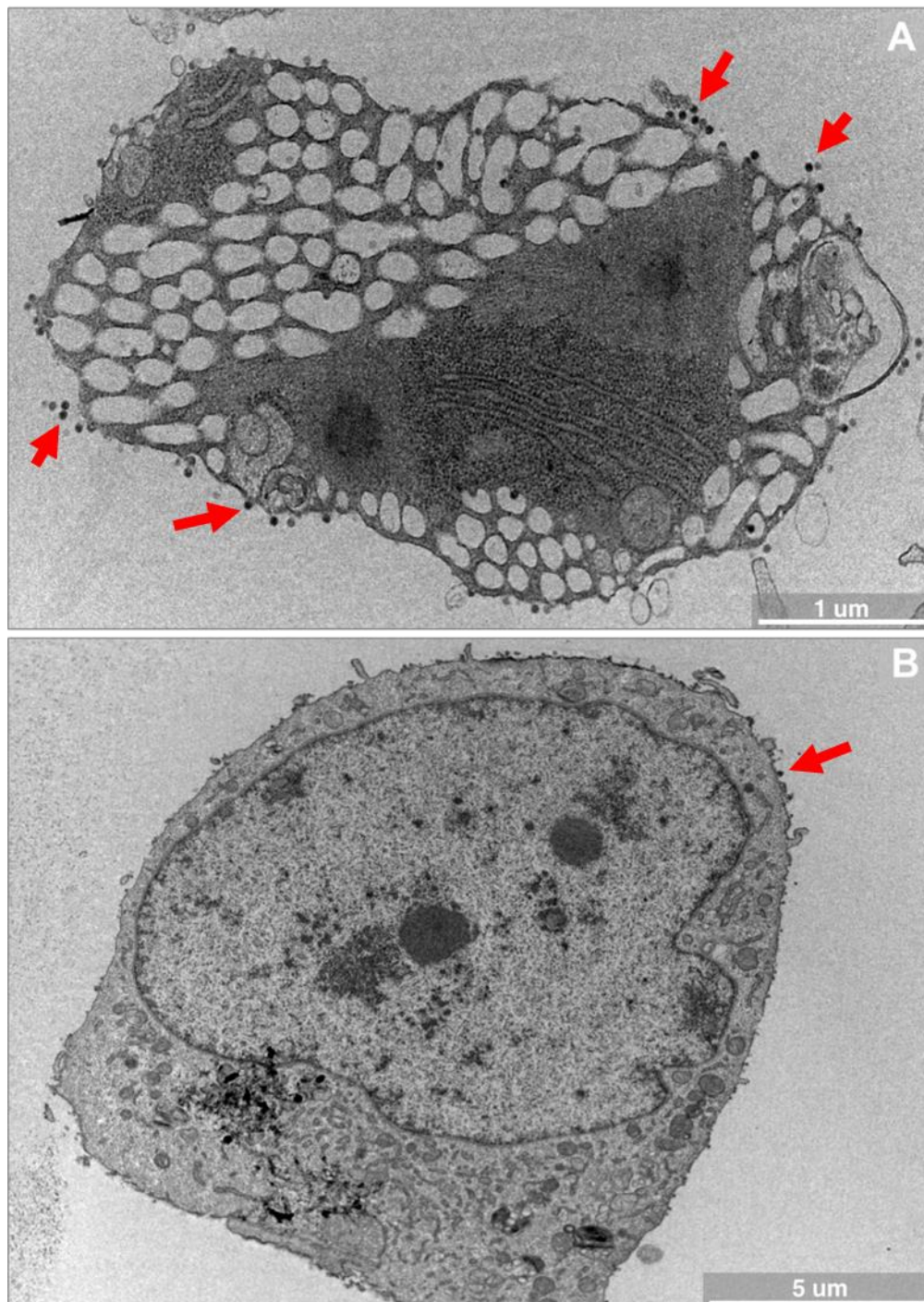
B) Célula Vero infectada com CHIKV à MOI 0,1 por 16 hpi, tratada com Trametinibe 40  $\mu$ M e fixada para MET; a presença de esférulas é destacada na imagem.

Finalmente, na última condição de tratamento para a MOI 0,1, no tempo 24 hpi, as células tratadas com DMSO ou Trametinibe 40  $\mu$ M (**Figura 18**) foram avaliadas. Assim como os tempos analisados anteriormente, houve uma diferença entre o tratamento por DMSO ou Trametinibe. As células tratadas por DMSO, estavam em fase tardia da infecção, a maioria das células analisadas (25 células) apresentou arredondamento, aumento de vacuolização e estruturas sugestivas de corpos apoptóticos (**Figura 18A**). Além disso, muitas partículas virais maduras foram observadas (setas vermelhas).

Por outro lado, nas células tratadas com o IF, também foram observadas mudanças citopáticas tardias, porém a estrutura celular estava menos degradada (**Figura 18B**). Além disso, muitas células ainda não haviam liberado partículas ou apresentaram um número de partículas virais maduras liberadas, com menos de 5 partículas visíveis por célula (seta vermelha). Esse número foi muito menor comparando-se com as células não tratadas pelo IF, que apresentou um número médio de ~40 partículas visíveis liberadas.

As células infectadas com baixa MOI apresentam múltiplas rodadas de multiplicação do CHIKV, com muitas células ainda não infectadas. A baixa MOI é representativa da infecção que ocorre *in natura* em hospedeiros, uma vez que a carga viral será muito mais baixa que a quantidade de células alvo no hospedeiro. Com base nos resultados com baixa MOI, foi possível observar que o trametinib apresentou efeito inibitório sobre a formação de partículas virais totais e manteve a estrutura celular preservada, mesmo em fases mais tardias da infecção (24 hpi), embora não nos tenha possibilitado definir qual etapa específica do ciclo estaria sendo afetada.



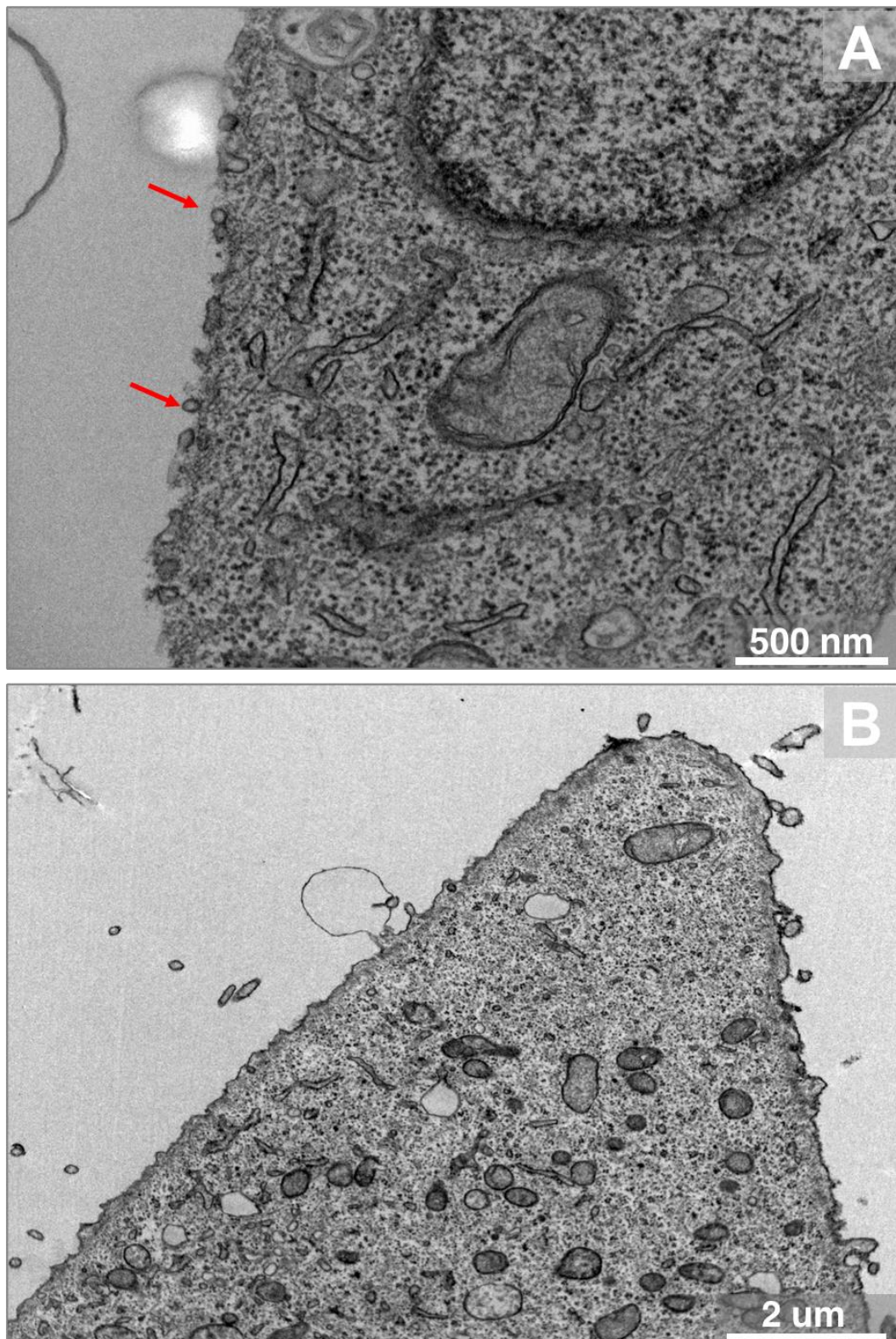


**Figura 18 – Células Vero infectadas com CHIKV por 24 horas pós-infecção (hpi).**

A) Célula Vero infectada com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 24 hpi, tratada com DMSO e fixada para microscopia eletrônica de transmissão (MET); partículas virais são destacadas na imagem com setas vermelhas. B) Célula Vero infectada com CHIKV à MOI 0,1 por 24 hpi, tratada com Trametinibe 40 µM e fixada para MET; uma partícula viral é destacada na imagem com seta vermelha.

No ciclo único de infecção com MOI 5,0 as células foram analisadas em dois tempos: 4 hpi e 8 hpi com tratamento por DMSO ou trametinib 40  $\mu$ M. As células infectadas com CHIKV MOI 5,0 por 4 hpi e tratadas com DMSO apresentaram muitas esférulas, com distribuição na maior parte polarizada, mas partículas virais não foram visualizadas (**Figura 19A**). A presença das esférulas indica a fase inicial do ciclo de multiplicação do CHIKV; esférulas são formadas a partir da segunda hora de infecção viral (FROLOVA *et al.*, 2010). Nas mesmas condições as células tratadas com Trametinibe 40  $\mu$ M não apresentaram esférulas ou outros indícios de ECP, confirmando a inibição do IF também em uma alta MOI (**Figura 19B**). Apesar de o ciclo ser sincrônico (alta MOI), não foi possível avaliar a etapa exata do ciclo de multiplicação do vírus afetada pelo IF. As imagens são representativas das 25 células analisadas.





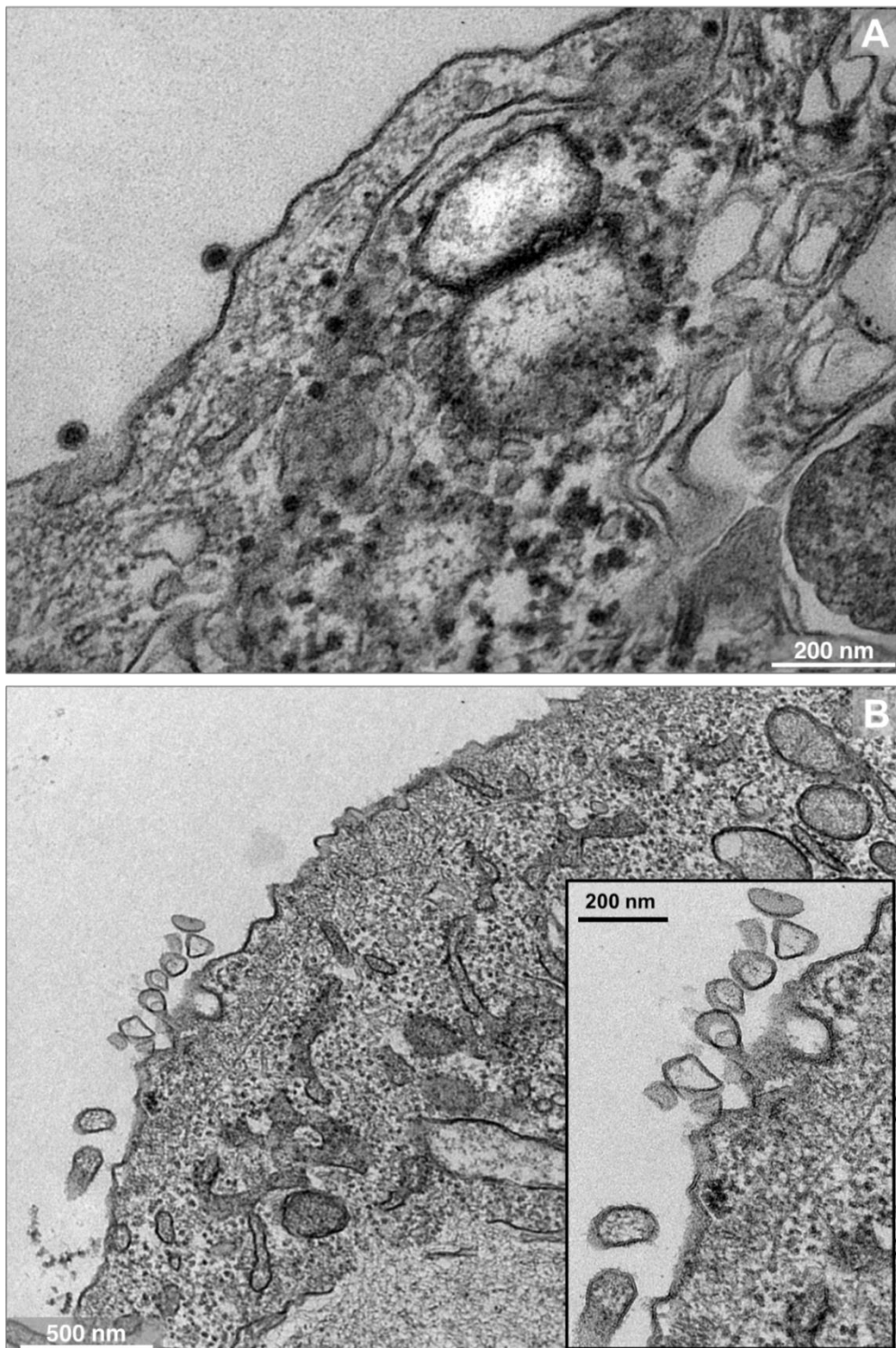
**Figura 19 – Células Vero infectadas com CHIKV 4 horas pós-infecção (hpi).**

A) Célula Vero infectada com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 5,0 por 4 hpi, tratada com DMSO e fixada para microscopia eletrônica de transmissão (MET); setas destacam as esférulas virais.  
B) Célula Vero infectada com CHIKV à MOI 5,0 por 4 hpi, tratada com Trametinibe 40 µM e fixada para MET.

A seguir, as células infectadas com CHIKV à MOI 5,0 por 8 hpi tratadas com DMSO ou Trametinibe 40  $\mu$ M foram analisadas. A apresentação das células nesse tempo se assemelhou com o estado das células na infecção com 16 hpi na MOI 0,1, com estruturas da fase tardia do ciclo de multiplicação visualizadas. Nas células tratadas com DMSO, os vírus maduros foram visualizados extracelularmente em grande quantidade. Uma fábrica viral também é visualizada na célula com capsídeos em formação e a presença de membranas (**Figura 20A**). Nas células analisadas, também foram encontradas esférulas, contudo, numa proporção muito maior comparado ao tempo de 4 hpi.

Nas células tratadas com o IF, as partículas virais não foram encontradas com facilidade, em cerca de 5 das 25 células analisadas, somente uma partícula viral foi visualizada em uma escala de 500 nm. Já na maioria das células, nenhum vírus foi visível, mas foram observadas esférulas, no entanto, essas esférulas estavam em número menor que as notadas nas células tratadas com DMSO (**Figura 20B**). Com base nesses resultados indicam que houve uma diminuição na produção de partículas totais e um retardo da multiplicação do CHIKV causado pelo Trametinibe, mesmo em alta MOI.

Apesar da utilização de alta MOI, não foi possível avaliar a fase do ciclo de multiplicação do CHIKV no qual o Trametinibe atua. Estudos com influenza vírus do tipo A mostram que o IF atua em fases precoces não chegando a afetar da síntese de proteínas. No ciclo do influenza inibe a atividade da polimerase viral, porém a eficiência do IF depende da linhagem celular testada (SCHRÄDER *et al.*, 2018). Para o YFV, a inibição da via atua na inibição da morfogênese viral, afetando o acúmulo de proteínas não estruturais, o rearranjo membranar e a replicação do genoma (ALBARNAZ *et al.*, 2014).



**Figura 20 – Células Vero infectadas com CHIKV por 8 horas pós-infecção (hpi).**

A) Célula Vero infectada com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 5,0 por 8 hpi, tratadas com DMSO e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). B) Célula Vero infectada com CHIKV à MOI 5,0 por 8 hpi, tratada com Trametinibe 40 µM e fixada para MET; esférulas são destacadas na imagem.

### 6.1.5 Ensaios de infecção com CHIKV em modelos murinos

A padronização dos ensaios *in vivo* com modelos de infecção pelo CHIKV foi feita em duas linhagens de camundongos: uma selvagem (C57BL/6) e outra KO (A129). As linhagem foram escolhidas com o objetivo de comparar os achados em modelos com competência para montar resposta imune (selvagem), com o modelo imunodeficiente (KO). Os experimentos iniciais tiveram o objetivo de confirmar as condições dos modelos murinos para o vírus encontrados na literatura, além de alterar algumas condições. Estas condições foram: inóculo viral, idade dos animais e condições sanitárias. A avaliação foi necessária para o início dos testes com IF, com dois ensaios pilotos foram realizados nesses animais. Este trabalho está sob ação do protocolo da CEUA da UFMG número: 07/2019.

#### 6.1.5.1 Infecção de camundongos C57BL/6 com CHIKV

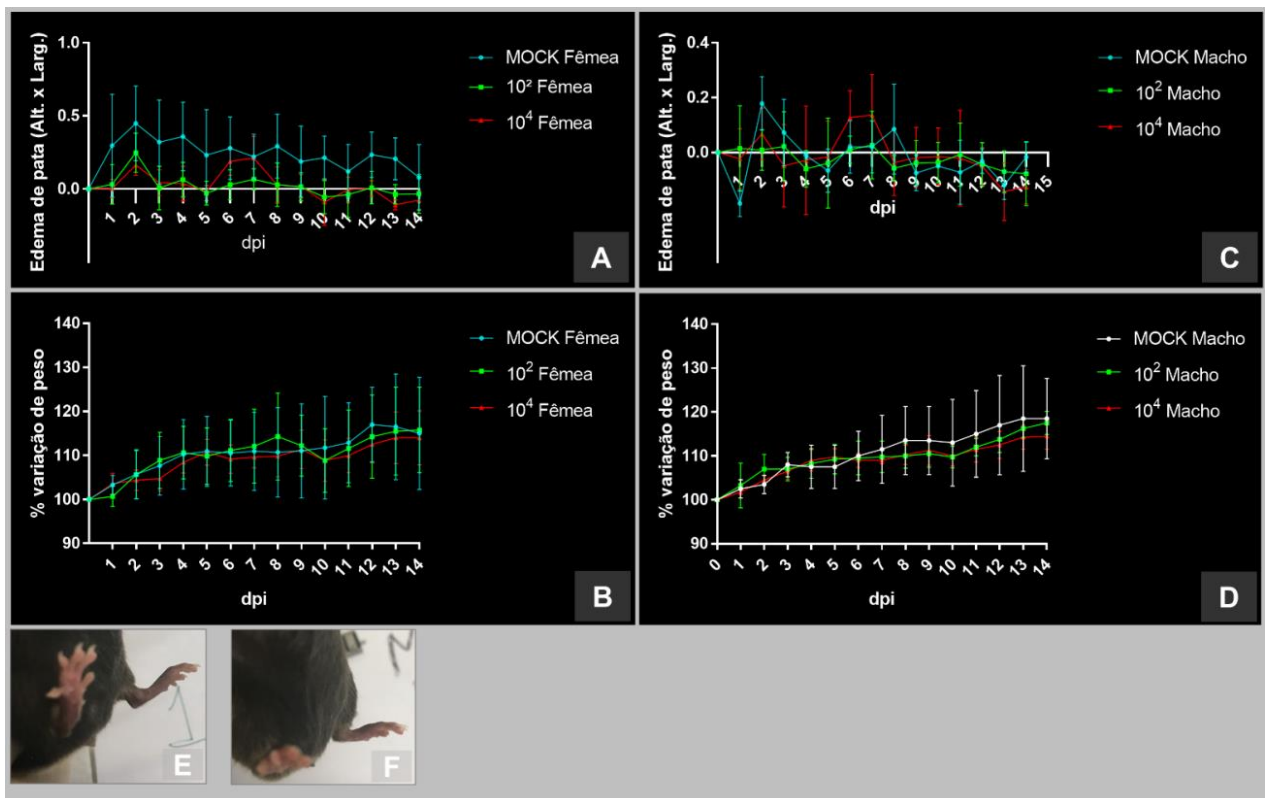
Neste experimento objetivou-se comparar a infecção do CHIKV entre fêmeas e machos dos animais imunocompetentes, além de comparar dois inóculos virais diferentes:  $10^2$  e  $10^4$  PFU/camundongo. Seis grupos foram utilizados (**Tabela 8**): 10 animais fêmeas e 10 animais machos adutos de 5 a 6 semanas de idade. O sinal indicativo de infecção por CHIKV em camundongos convencionais, edema de pata, foi mensurado por paquímetro diariamente. O edema de pata foi visualizado nos animais fêmeas inoculados com  $10^2$  e  $10^4$  PFU (**Figura 21A**), porém de forma branda. O edema não foi desenvolvido de forma homogênea entre os animais, alguns apresentaram edema mais proeminente que outros. O grupo mock fêmea, apesar de ser o controle, obteve um valor maior de espessura de pata comparado aos grupos infectados, provavelmente em consequência da diferença entre os animais desse grupo em relação ao número e ao peso. Visto que, apenas dois animais foram selecionados para o grupo mock, devido à disponibilidade, sendo os animais que apresentaram o maior e o menor peso corporal (**Figura 21A linha azul**). É possível notar ainda, que os animais que foram infectados com o maior inóculo (linha vermelha) tiveram um maior edema nos 6° e 7° dpi. Para os machos (**Figura 21C**), a variação foi ainda mais nítida tanto do ponto de vista observacional (**Figura 21E e F**),

quanto em relação ao resultado plotado. Assim como nas fêmeas, o grupo macho  $10^4$  obteve um maior edema ao 6<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dpi comparados aos machos do grupo  $10^2$ .

Não houve variação de peso entre nenhum dos grupos, tanto nas fêmeas quanto nos machos (**Figura 21B e D**), o que era esperado de acordo com os estudos já realizados nesse modelo (GARDNER *et al.*, 2010), uma vez que a infecção em modelos convencionais é localizada na região do local de inoculação. Em vez de perda houve um aumento de peso, o qual é normal devido a idade dos animais que ainda são passíveis de desenvolvimento.

Apesar desse modelo apresentar uma doença com poucos sinais observáveis, ele apresenta alterações que são mensuradas por análises laboratoriais, como histopatologia e análise de citocinas. Ou seja, apesar de sinais observacionais brandos, sinais histopatológicos e de análises de citocinas podem apresentar alterações patológicas robustas no local de infecção do CHIKV. Além disso, por serem imunocompetentes o tratamento com Trametinibe poderia gerar uma melhora por possibilitar que o sistema imune se recomponha, isso devido ao possível retardo da infecção ou diminuição das partículas virais. Como o IF age diretamente no hospedeiro, seria importante avaliar este modelo quanto à recuperação.





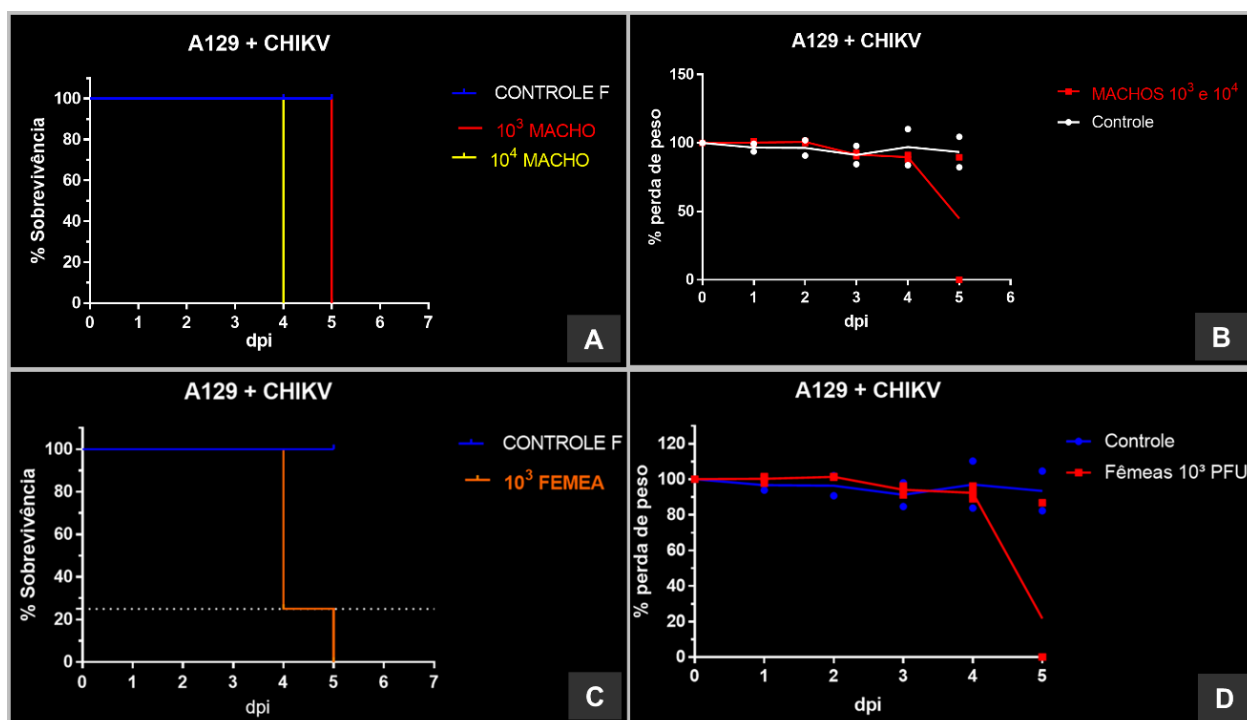
**Figura 21 – Análises de animais C57BL/6 infectados com CHIKV.**

A) Gráfico de edema de pata (altura x largura) quantificado por paquímetro digital durante 14 dpi. Linha azul: animais fêmeas mock-infectados com MEM 1%; linha verde: animais fêmeas infectados com inóculo de 10<sup>2</sup> unidades formadoras de placa (PFU); linha vermelha: animais fêmeas infectados com inóculo 10<sup>4</sup> PFU; B) Gráfico de variação de peso. Linha azul: animais fêmeas mock-infectados com MEM 1%; linha verde: animais fêmeas infectados com inóculo de 10<sup>2</sup> PFU; linha vermelha: animais fêmeas infectados com inóculo 10<sup>4</sup> PFU; C) Gráfico de edema de pata (altura x largura) quantificado por paquímetro digital durante 14 dpi. Linha azul: animais machos mock-infectados com MEM 1%; linha verde: animais machos infectados com inóculo de 10<sup>2</sup> PFU; linha vermelha: animais machos infectados com inóculo 10<sup>4</sup> PFU; D) Gráfico de variação de peso. Linha azul: animais machos mock-infectados com MEM 1%; linha verde: animais machos infectados com inóculo de 10<sup>2</sup> PFU; linha vermelha: animais machos infectados com inóculo 10<sup>4</sup> PFU; E) Animal macho mock-infectado controle aos 8 dpi e F) Animal macho infectado com inóculo 10<sup>4</sup> PFU aos 8 dpi.

#### 6.1.5.2 Infecção de camundongos A129 (IFNAR -/- KO) com CHIKV

Neste experimento objetivou-se comparar a infecção do CHIKV entre fêmeas e machos dos animais imunodeficientes, comparando-se dois inóculos virais diferentes, 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> PFU/camundongo. Para isso, foram utilizados quatro grupos de animais machos e fêmeas com 8 semanas de idade (**Tabela 9**). Os grupos de fêmeas e machos foram heterogêneos devido à baixa disponibilidade dos animais com essa idade para o experimento. Para esses animais, como esperado, o CHIKV foi letal, levando a óbito no 5<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> dpi para o grupo macho 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup>, respectivamente (**Figura 22A**). Todas as fêmeas morreram, a morte de três animais ocorreu no 4<sup>o</sup> dpi e um no

5º dpi (**Figura 22C**). Esses resultados confirmaram o padrão de letalidade rápido do CHIKV em animais com deficiência no receptor de IFN-I. A variação de peso foi muito pequena, provavelmente devido à alta virulência, ou seja, com a rápida letalidade os animais não chegaram a perder peso. Por fim, não houve diferença de variação de peso entre o grupo mock e os animais de ambos os sexos (**Figura 22B e D**).

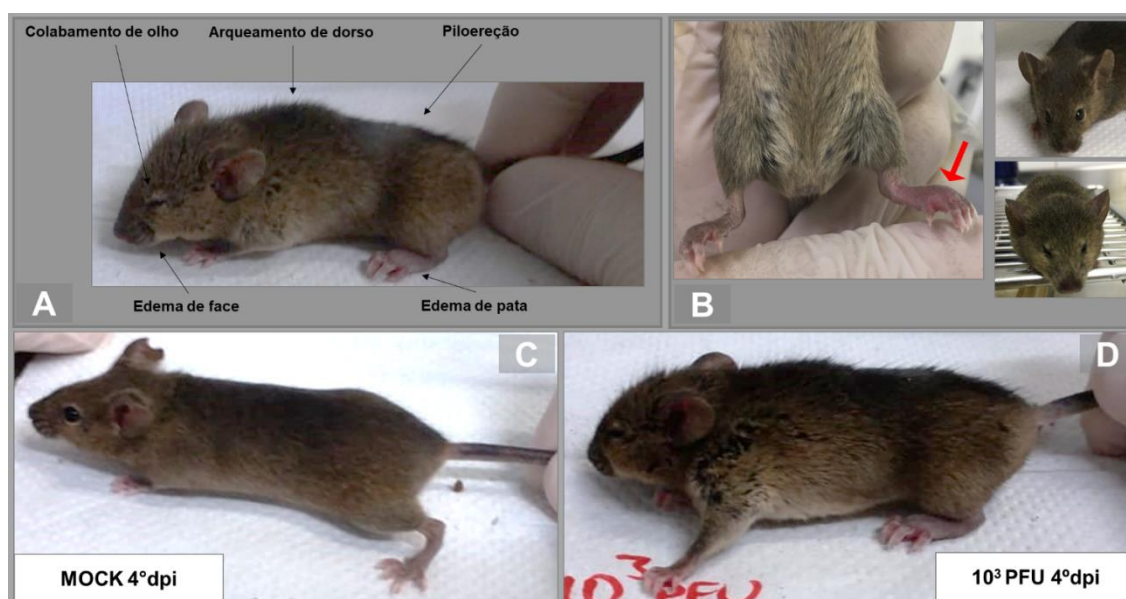


**Figura 22 – Curvas de sobrevivência e variação de peso de animais A129 infectados com CHIKV.** A) Curva de sobrevivência de animais machos. Linha azul: controle fêmeas; linha vermelha: macho com inóculo 10<sup>3</sup> unidades formadoras de placas (PFU); linha amarela: macho com inóculo 10<sup>4</sup> PFU; B) Gráfico de perda de peso de animais machos. Linha branca: fêmeas controle; linha vermelha: macho com inóculos 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> PFU; C) Curva de sobrevivência de animais fêmeas. Linha azul: controle fêmeas; linha laranja: fêmeas com inóculo 10<sup>3</sup> PFU; D) Gráfico de perda de peso de animais fêmeas. Linha azul: controle fêmeas; linha vermelha: fêmeas com inóculo 10<sup>3</sup> PFU.

Nesse modelo animal, sinais de infecção foram claros e notados a partir do 3º dpi, os quais incluíam piloereção, arqueamento de dorso, colabamento de olho ou conjuntivite, edema de face e edema de pata (**Figura 23A e B**). Os animais apresentaram alteração no comportamento, ficando mais reclusos, apresentando menor comportamento exploratório e pouca movimentação na gaiola. O grupo mock se manteve sem sinais durante todo o experimento e apresentou comportamento padrão, diferentemente do grupo infectado (**Figura 23B, C e D**).

Esses resultados confirmam achados para esse modelo descritos na literatura (GARDNER *et al.*, 2012), em que as condições testadas foram as mesmas. No

trabalho de Langsjoen e colaboradores (2018) ocorreu uma diferença com relação à perda de peso encontrada. No entanto, os pesquisadores testaram duas variáveis diferentes: idade dos animais (4 a 8 semanas) e inóculo ( $10^4$  PFU). Essas variações podem ter gerado diferença de perda de peso, já que animais com 4 semanas a menos possuem uma taxa de ganho de peso maior comparados a animais mais velhos. Com uma dose infectante menor,  $10^2$  PFU inoculada via intradermal, foi visto em outro trabalho que os animais morreram entre 2 e 4 dpi, porém, os animais são IFNAR<sup>-/-</sup> gerados na linhagem C57BL/6. Além disso, a idade dos animais e o local exato da inoculação intradermal não foi mostrada (SCHILTE *et al.*, 2010). Dessa forma, uma possível nova etapa consiste em testar o inóculo de  $10^2$  PFU para avaliar se os animais permaneceram vivos por mais tempo, uma vez que é importante uma faixa de trabalho com o inibidor que será utilizado como tentativa de tratamento desses animais.



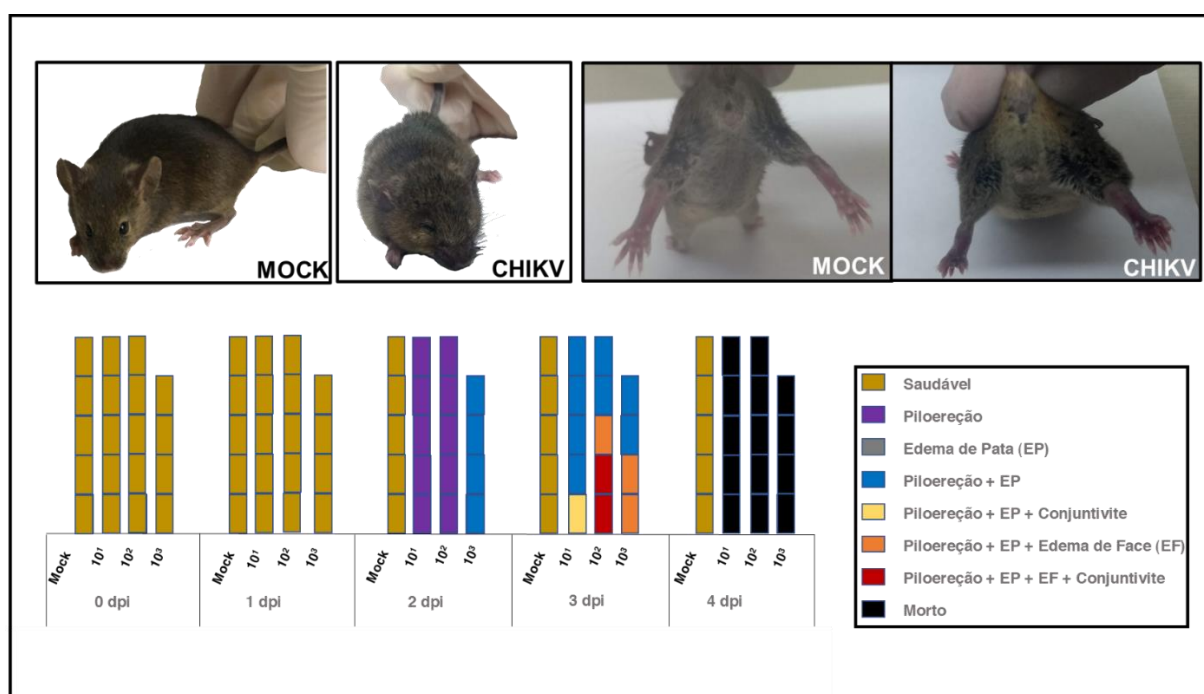
**Figura 23 – Sinais de animais A129 infectados por chikungunya vírus (CHIKV).**

A) Animal fêmea com inóculo de  $10^3$  unidades formadoras de placa (PFU) no 4ºdpi, apresentando conjuntivite, arqueamento de dorso, piloereção, edema de face e edema de pata. B) Edema de pata à esquerda; canto superior direito: face do animal controle e logo abaixo: face do animal fêmea com inóculo de  $10^3$  PFU. C) Animal fêmea mock-infectado no 4ºdpi sem sinais. D) Animal fêmea infectado com inóculo  $10^3$  PFU no 4ºdpi apresentando sinais de doença.

A seguir foram testados inóculos menores. Um número maior de animais foram avaliados, dessa vez entre 10 e 12 semanas de idade, e foram infectados com três inóculos ( $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  PFU/camundongo). Somente animas fêmeas foram utilizados, pois não houve variação nos sinais da doença referentes ao sexo dos



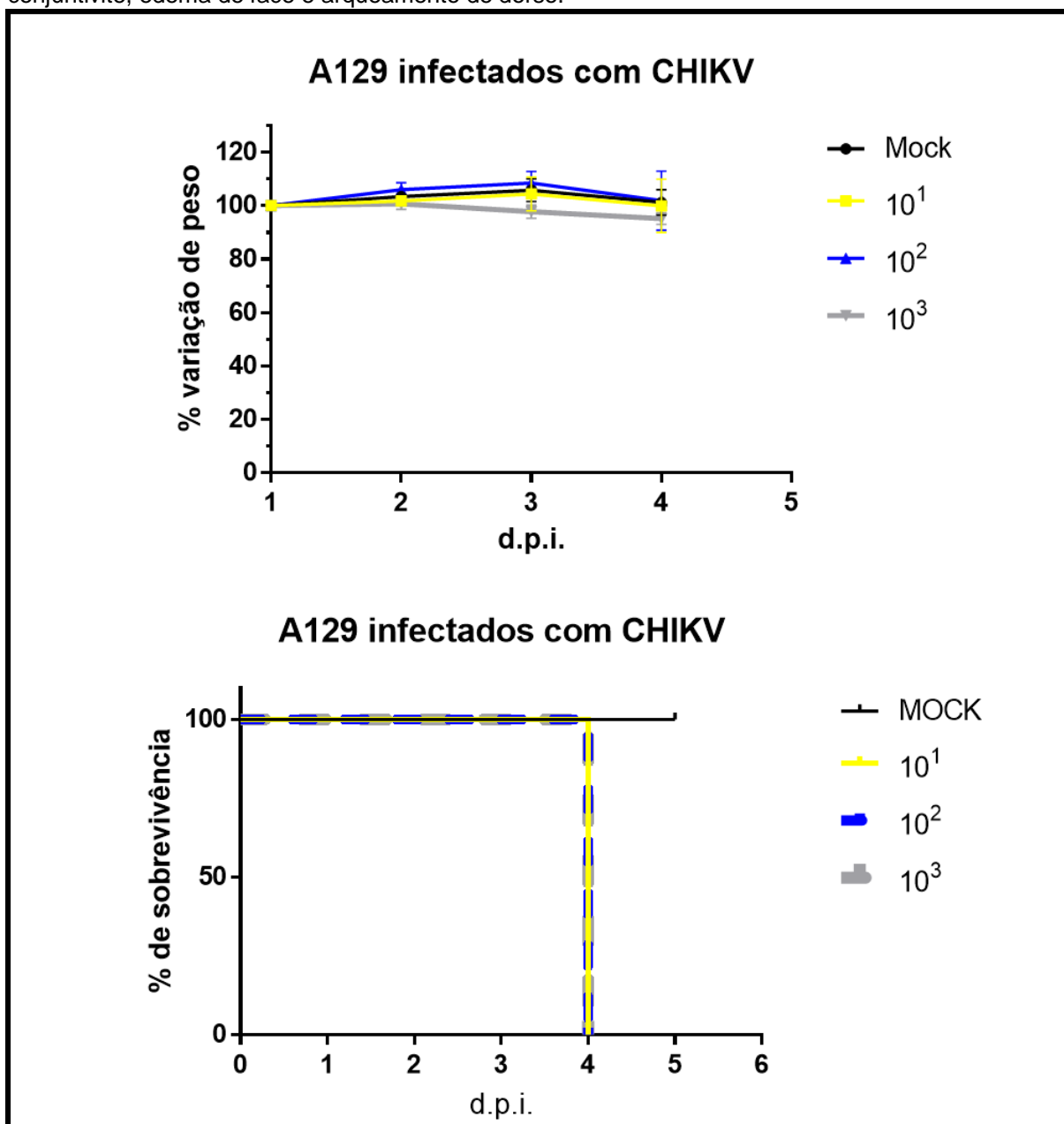
animais (**Tabela 10**). Os animais foram avaliados e pesados quanto ao surgimento dos sinais durante quatro dias. Em todos os grupos os animais iniciaram os sinais a partir do 2º dpi, confirmando a rápida multiplicação do CHIKV. Proporcionalmente, nesse segundo dia, o grupo com maior inóculo ( $10^3$ ) evoluiu para sinais mais graves que os outros grupos, apresentando além da piloereção, edema de pata (**Figura 24**). Os sinais apresentados pelos animais doentes foi igual entre os grupos, com variação entre os animais, sendo os sinais clássicos os de edema de pata, piloereção, edema de face e conjuntivite (**Figura 24**). Curiosamente, todos os animais vieram a óbito no 4º dpi, mesmo os animais inoculados com apenas 10 partículas virais infecciosas e não houve variação de peso significativa entre os grupos (**Figura 25**). Com base nesses resultados, foi testado um tratamento com trametinib em animais inoculados com a maior dose ( $10^3$ ), que ainda representa uma dose intermediária se comparada a outras infecções virais (CAMPOS *et al.*, 2020). A dose de Trametinibe escolhida para o tratamento foi de 2 mg/kg do animal, que representa uma dose intermediária de uso em modelos animais (YAMAGUCHI *et al.*, 2011).



**Figura 24 – Sinais de camundongos A129 infectados com CHIKV em três inóculos.**

Camundongos A129 fêmeas de 10 a 12 semanas de idade foram infectados com 10 µL contendo CHIKV  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  unidades formadoras de placas (PFU) por via intraplantar, avaliados quanto aos sinais e pesados durante quatro dias. Os animais mock infectados permaneceram saudáveis ao longo do experimento. Os animais iniciaram os primeiros sinais no 2º dia pós-infecção (dpi). Todos os animais

( $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$ ) foram obtidos no 4º dpi. Os sinais apresentados foram: piloereção, edema de pata, conjuntivite, edema de face e arqueamento de dorso.



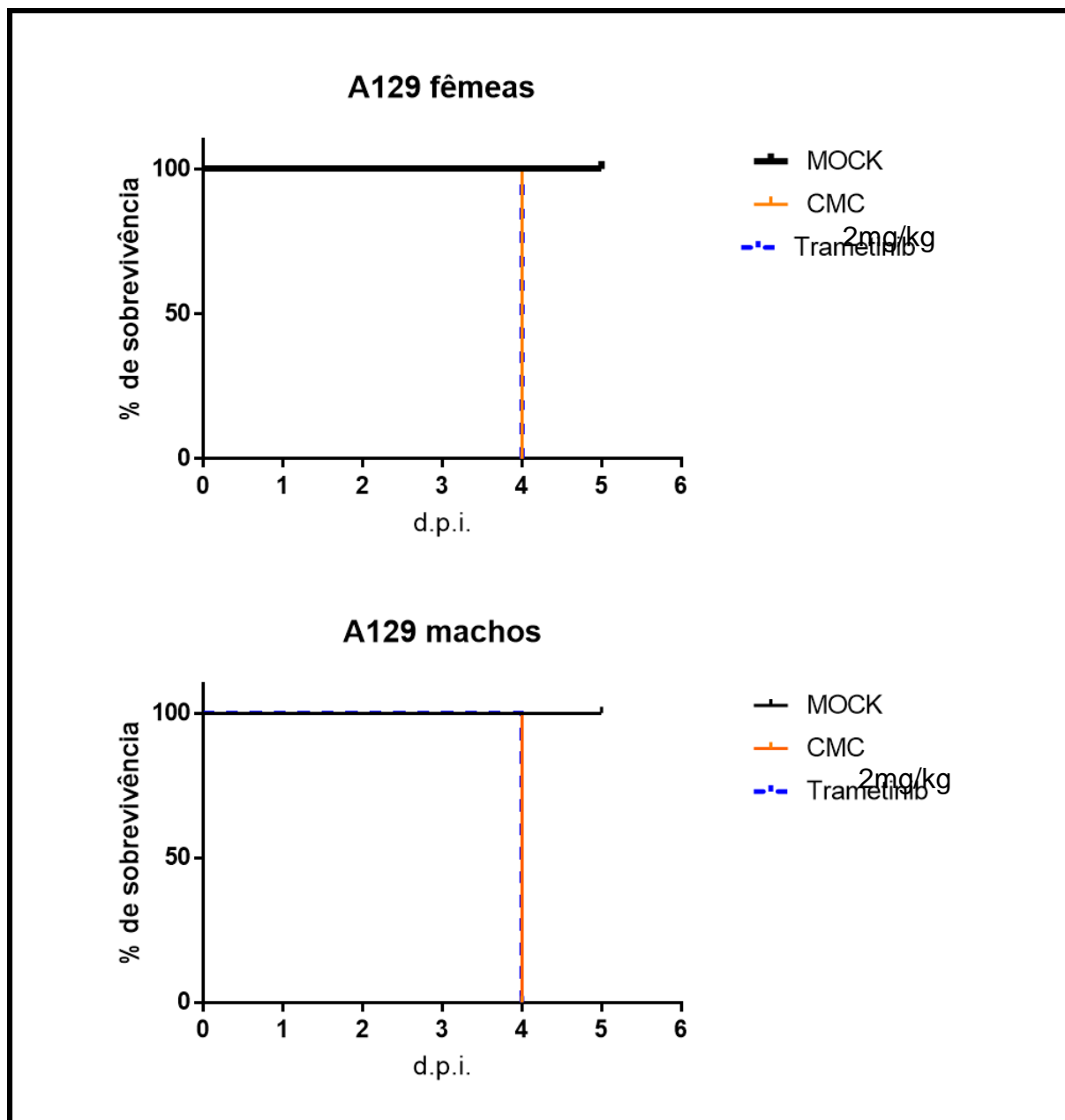
**Figura 25 – Variação de peso e curva de sobrevivência de camundongos A129 infectados com CHIKV em três inóculos.**

Camundongos A129 fêmeas de 10 a 12 semanas de idade foram infectados com 10  $\mu$ L contendo CHIKV  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  unidades formadoras de placas (PFU) por via intraplantar, avaliados quanto aos sinais e pesados durante quatro dias. Não houve perda de peso significativa dos animais infectados em relação ao grupo mock. Todos os animais ( $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$ ) foram obtidos no 4º dia pós-infecção.

Seis grupos com animais machos e fêmeas (devido à disponibilidade de animais) de 10 a 12 semanas foram utilizados para o teste do inibidor (**Tabela 11**). Neste experimento além do grupo mock, foram avaliados dois grupos tratados apenas com o veículo (CMC) utilizado para diluição do trametinib. O tratamento foi

realizado por meio de gavagem diariamente a partir do momento da inoculação do vírus com  $10^3$  PFU/camundongo. Os animais apresentaram sinais claros da doença nos grupos CMC e tratados com IF, chegando a óbito no 4<sup>o</sup> dpi (**Figura 26**).

A utilização do modelo KO foi escolhida como alternativa para o desenvolvimento de sinais fortes da doença em modelos adultos de animais. A nítida presença desses sinais permitiria uma boa avaliação da melhora dos sinais, no caso de sucesso do tratamento com o IF. Porém, a morte de todos os animais, mesmo o grupo infectado com 10 partículas, comprova a forte influência do IFN-I no controle da infecção por CHIKV (SCHILTE *et al.*, 2010). Outra desvantagem relacionada ao tratamento do vírus consiste na rápida multiplicação viral, o que pode não ter permitido com que o hospedeiro conseguisse subverter a doença com o tratamento. Com esse resultado, nesse modelo o tratamento com trametinib não protegeu os animais da letalidade. Devido a esse resultado, não foram realizados demais testes com o modelo KO, A129, para o tratamento da infecção por CHIKV. Já foi demonstrada a regulação do IFN- $\alpha$  na via das MAPK, em específico JNK e p38 (ZHAO *et al.*, 2011) e ERK mediando a resposta antiviral via IFN-I por meio da ativação do fator regulatório de interferon 3 (WANG *et al.*, 2004).



**Figura 26 – Variação de peso e curva de sobrevivência de camundongos A129 infectados com CHIKV e tratados com CMC ou Trametinibe.**

Camundongos A129 machos e fêmeas de 10 a 12 semanas de idade foram infectados 10  $\mu$ L com CHIKV  $10^3$  PFU. Os animais foram tratados com CMC (veículo do inibidor) ou Trametinibe 2 mg/kg diariamente a partir do dia 0 de infecção. Todos os animais foram a óbito no 4º dia pós-infecção (dpi).

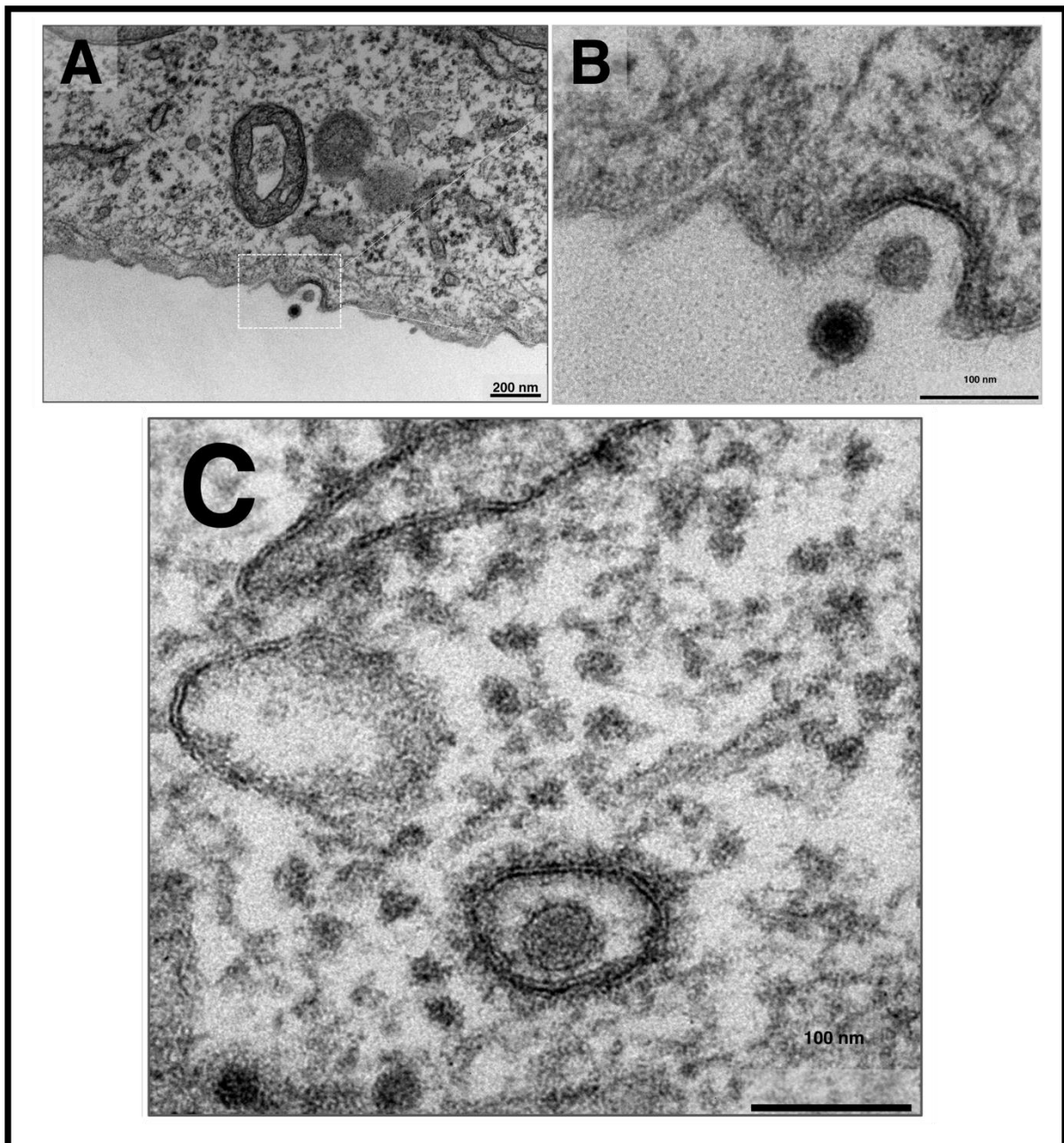
## 6.2 Caracterização morfológica do ciclo de multiplicação do chikungunya vírus.

Diante das muitas análises feitas com imagens de microscopia eletrônica e achados de ensaios biológicos, foram montadas evidências morfológicas das etapas do ciclo de multiplicação do CHIKV. Infecções foram realizadas em células Vero nas MOIs de 0,1 e 5,0 em diferentes tempos especificados nas imagens a seguir. De acordo com as curvas de multiplicação realizadas com o CHIKV e as evidências microscópicas do padrão de produção de partículas, pode-se observar que a infecção com 16 e 24 hpi à MOI 0,1 representa etapas tardias, similares a encontrada em 8 hpi à MOI 5,0. Nesses tempos, as células apresentam intensa vacuolização e produção de partículas, sem penetração de vírus sendo observada nas células analisadas. De forma similar, os tempos de 8 hpi à MOI 0,1 e 4 hpi à MOI 5,0, apresentam padrões similares de fase inicial de infecção com presença de partículas em penetração e visualização de complexos de replicação.

### 6.2.1 Penetração

A penetração do CHIKV é classicamente baseada em estudos de alfavírus que mostram que a endocitose mediada por clatrina requer baixo pH para uma infecção bem-sucedida (SOURISSEAU *et al.*, 2007). Embora essa via esteja muito consolidada na penetração do CHIKV, a penetração via macropinocitose já foi recentemente encontrada nas células musculares (HUA *et al.*, 2019). Apesar de os trabalhos com ciclo de multiplicação terem promovido notáveis avanços na biologia do CHIKV, existem poucas imagens do processo de penetração de células pelo CHIKV. Células Vero foram infectadas com CHIKV à MOI 0,1 e coletadas após 8 hpi (**Figura 27A a C**).

Nestas imagens, é possível observar a entrada de partículas de CHIKV por dois processos distintos. Em um deles, a entrada dos vírions ocorre após a invaginação da membrana plasmática formando uma vesícula revestida (**Figura 27A**), moléculas de clatrina circundam a vesícula em formação (**Figura 27B**). Após a entrada completa do vírion, um endossoma revestido transporta o CHIKV (**Figura 27C**). Erasmus e colegas mostraram os mesmos padrões de vesícula revestida de clatrina em micrografia eletrônica (ERASMUS *et al.*, 2017).



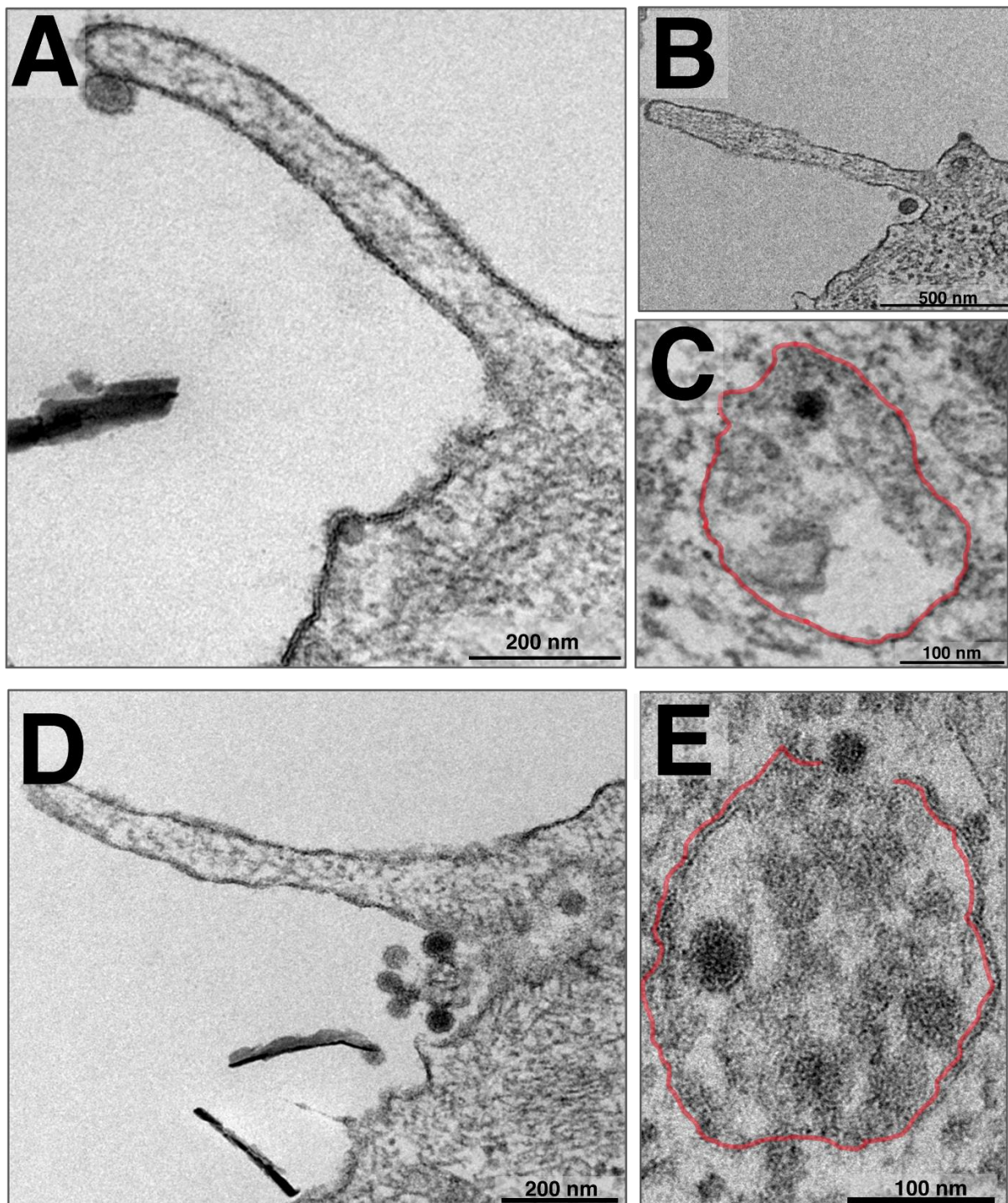
**Figura 27 – Penetração por endocitose mediada por clatrina do CHIKV em células Vero.**

Células Vero infectadas com CHIKV MOI 0,1 à 8 horas pós-infecção (hpi) fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) duas partículas iniciando a penetração por endocitose; B) esse mecanismo é destacado mostrando a formação do endossomo. C) Um endossomo revestido por clatrina carrega uma partícula de CHIKV.

O outro processo foi visualizado em células Vero infectadas com CHIKV 16 hpi à MOI 0.1 e constituiu na penetração endossomal relacionada à macropinocitose (**Figura 28**). Duas formas de macropinocitose foram observadas, na primeira o vírion

induz a formação de uma protrusão de membrana (lamelipódio) de ~700 nm que exhibe o vírus na ponta apical (**Figura 28A**), transporta o vírus para a porção basal para formar uma vesícula (**Figura 28B**), e forma uma vesícula não revestida (macropinosomo) com ~300 nm carregando a única partícula (**Figura 28C**). A outra forma de macropinocitose encontrada apresenta partículas múltiplas induzindo a formação de um lamelipódio com ~800 nm. A porção basal do lamelipódio, invagina e engloba as partículas de CHIKV (**Figura 28D**). Como resultado, forma-se um macropinosomo com ~300 nm que transporta os vírus juntos e inicia o desnudamento do capsídeo a partir do envelope viral (**Figura 28E**).





**Figura 28 – Penetração do CHIKV por macropinocitose em células Vero.**

Células Vero infectadas com CHIKV MOI 0,1 à 16 horas pós-infecção (hpi) e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Protrusão membranaar ~700 nm (lamelipódio) com uma única partícula na parte apical. B) Vesícula imatura em formação englobando uma partícula viral. C) Em vermelho: um macropinosomo não revestido contém um único vírus. D) Protrusão membranaar com vesícula em formação na parte basal englobando múltiplas partículas virais. E) Em vermelho: um macropinosomo não revestido contém múltiplas partículas virais e inicia o desnudamento do capsídeo de uma delas.

Até o momento, esse novo processo de penetração não foi confirmado em outras linhagens de células e por micrografia eletrônica. Um número considerável de



vírus DNA ou RNA com ou sem envelope utiliza macropinocitose para penetrar na célula hospedeira (MERCER; HELENIUS, 2009). Alguns desses agentes são vaccínia vírus (MERCER; HELENIUS, 2008), adenovírus (MEIER *et al.*, 2002), ecovírus 1 (KRIEGER *et al.*, 2013), vírus da imunodeficiência humana (MARÉCHAL *et al.*, 2001) e o vírus da rubéola (LEE; BOWDEN, 2000). Esses vírus, formam um macropinosoma de tamanho e formato variável alternadamente entre 0,5 a 10 µm (MERCER; HELENIUS, 2009).

Neste estudo foram exibidas micrografias eletrônicas da penetração via macropinocitose e macropinosomas formados carreando o CHIKV. Vacúolos intracelulares não revestidos (**Figura 28C e E**) são como aqueles encontrados na infecção pelo herpesvírus (NICOLA; MCEVOY; STRAUS, 2003). Além disso, foram observadas partículas únicas ou múltiplas de CHIKV penetrando em células de vertebrados (células Vero) via macropinocitose (**Figura 28B e D**). Interessantemente, esses dados corroboram que o CHIKV pode penetrar nas células de vertebrados por meio de mais de um processo de penetração.

Neste trabalho, sugerimos que após algumas rodadas de progênie a macropinocitose passa a ser utilizada, pois só foi observada a partir de 16 hpi, na infecção assíncrona (MOI 0,1). Este mecanismo, talvez represente uma alternativa à via endocitose tradicional após tempos tardios, acelerando a infecção viral devido ao alto número de partículas comumente produzido pelo CHIKV. Esse evento também pode contribuir com o rápido ciclo de multiplicação do CHIKV.

Outra possibilidade é que o CHIKV possa utilizar outros mecanismos de penetração devido às amplas linhagens celulares e hospedeiros os quais possui tropismo (vertebrados e invertebrados) (BERNARD *et al.*, 2010; HOORNWEG *et al.*, 2016). Apesar das especulações, estudos mais aprofundados são necessários para investigar tempos precisos e gatilhos específicos de macropinocitose na infecção por CHIKV.

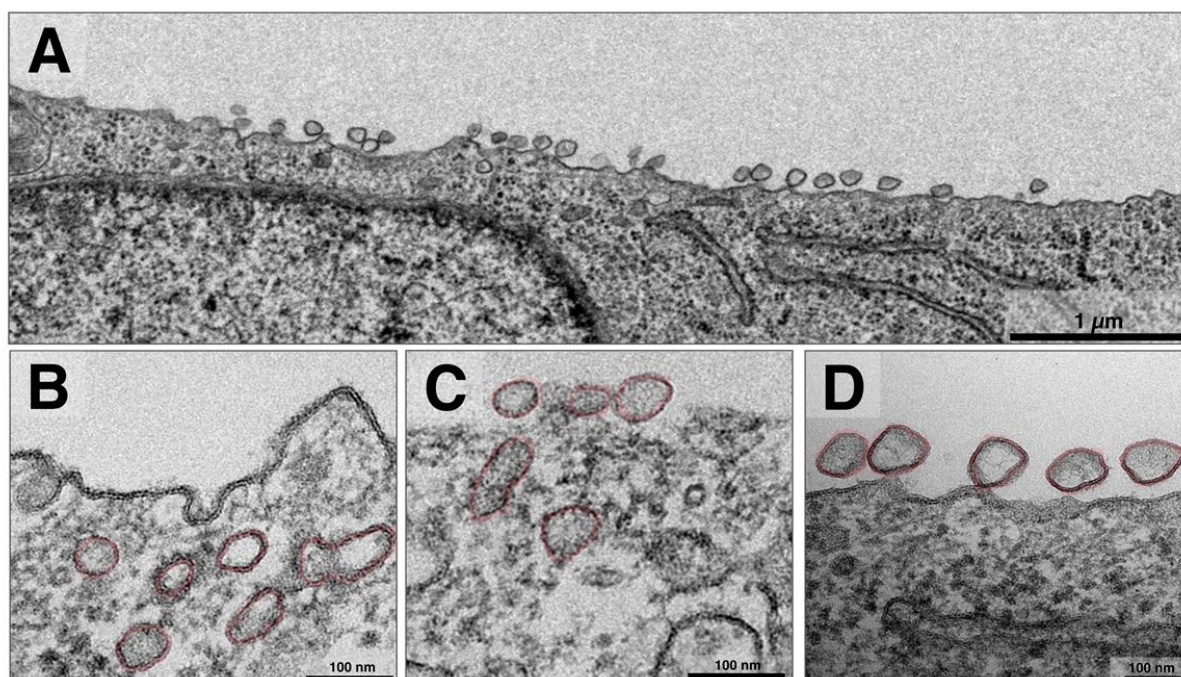
### 6.2.2 Replicação

As nsPs constituem o complexo de replicação do genoma de alfavírus e formam uma estrutura de membrana conhecida como esférula que ancora externamente a membrana celular por meio de um gargalo estreito

(BARTHOLOMEEUSEN *et al.*, 2018). As esférulas abrigam um RNA intermediário dupla fita durante o processo de replicação do genoma viral (UTT *et al.*, 2016).

Estudos anteriores já exibiam micrografias de esférulas para outros alfavírus (FROLOVA *et al.*, 2010; KUJALA *et al.*, 2001)) e também para o CHIKV (HELLSTRÖM *et al.*, 2017). Contudo, foram observadas neste trabalho esférulas de CHIKV em uma disposição variável em células Vero infectadas. Esta conformação das esférulas foi visualizada nos tempos de 4 hpi à MOI 5.0, e 8 hpi à MOI 0.1 (**Figura 29**). Na maioria das células, as esférulas, em tamanhos variados (~60 a 100 nm), apresentaram-se polarizadas em uma vasta parte da membrana celular (**Figura 29A**).

No entanto, foram encontradas algumas esférulas concentradas internamente e próximas à membrana da célula (**Figura 29B**) e dispostas juntas, tanto internamente quanto externamente à membrana celular (**Figura 29C**). Estas distribuições são atípicas em comparação com outros estudos (FROLOVA *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2018), que mostram a distribuição padrão das esférulas, ancoradas pelo gargalo, contendo o complexo de replicação viral, na superfície da membrana celular (**Figura 29D**).



**Figura 29 – Distribuição das esférulas do chikungunya vírus (CHIKV) em células Vero.**

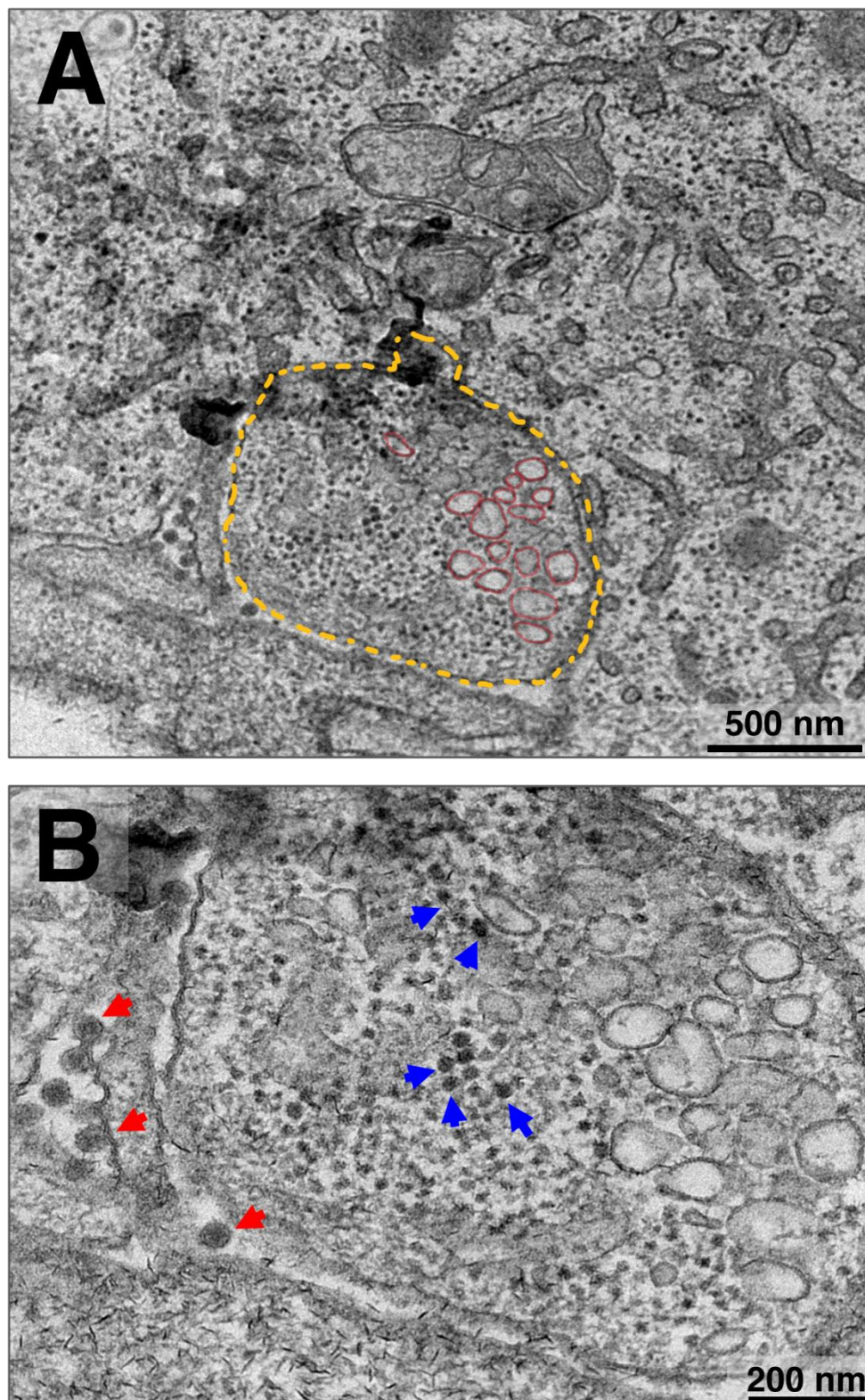
Células Vero foram infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 à 8 e 24 horas pós-infecção (hpi) e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Distribuição das esférulas

ancoradas à membrana celular. B) Em vermelho: esférulas concentradas internamente próximas à membrana plasmática. C) Em vermelho: esférulas concentradas tanto internamente, quanto externamente à membrana plasmática. D) Em vermelho: distribuição clássica das esférulas, ancoradas externamente à membrana plasmática.

Nos alfavírus em geral, estas esférulas internalizam-se na fase tardia da infecção, formando o CPV-I e continuam a produzir RNA durante toda a infecção. Curiosamente, na infecção por CHIKV, tem sido descrito que a maioria das esférulas permanece na superfície celular por um período maior que três horas pós-infecção (THAA *et al.*, 2015).

Neste trabalho, foram encontrados CPV-I apresentando ~1,3  $\mu\text{m}$ , alojando esférulas em disposição desordenada (**Figura 30A**), e proteínas do capsídeo (**Figura 30B**). Curiosamente, esse CPV-I é diferente do padrão descrito em estudos anteriores, no qual as esférulas revestiam a vesícula internamente de forma ordenada, e não estão presentes proteínas do capsídeo viral (CHEN *et al.*, 2013).





**Figura 30 – Vacúolo citopático do tipo I (CPV-I) de CHIKV em célula Vero.**

Células Vero foram infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 à 8 e 24 horas pós-infecção (hpi) e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Em amarelo: um CPV-I é destacado, contendo esférulas (em vermelho) desordenadas internamente. B) O mesmo CPV-I em aumento contém também proteínas de capsídeo viral (setas azuis) internamente; partículas virais formadas (setas vermelhas) são visualizadas próximas ao vacúolo.

No início da infecção, cerca de duas horas após a penetração, a tradução pelo ribossômico do hospedeiro de nsPs1-4 forma o complexo de replicação e inicia a replicação do RNA com a formação das esférulas. Ao longo do curso da infecção, as esférulas são internalizadas e formam uma estrutura vacuolar denominada CPV-I que contém marcadores lisossomais e endossômicos (SPUUL *et al.*, 2010). Este CPV-I forma uma grande estrutura vesicular circundada na superfície internamente por esférulas que continuam a produção de RNA (CHEN *et al.*, 2013). É sugerido que o CPV-I encontrado neste trabalho pode representar uma forma inicial de fábrica viral de CHIKV, embora mais estudos com marcadores de membrana específicos precisem ser feitos para confirmar esse fato.

### 6.2.3 Síntese de proteínas

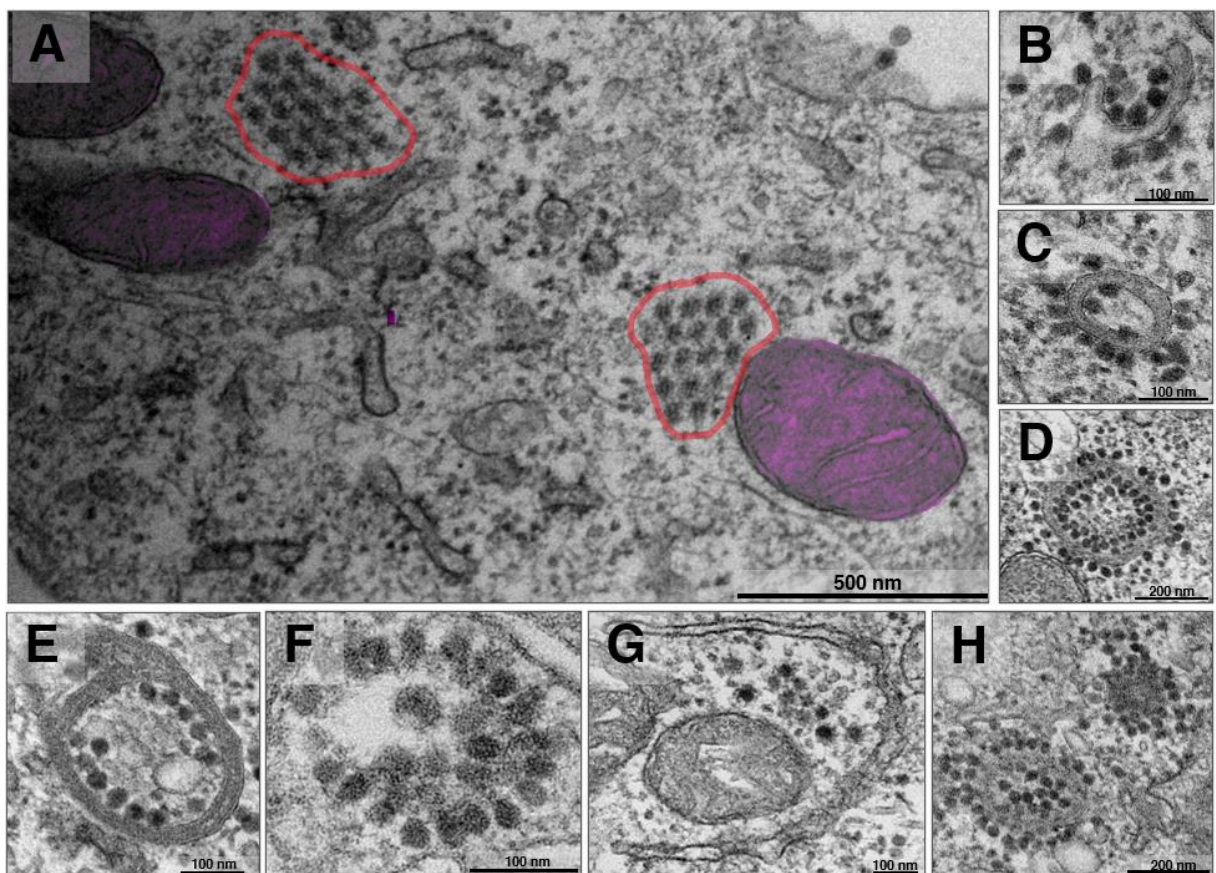
CHIKV produz muitas partículas que exploram intensamente a maquinaria das proteínas das células hospedeiras. A proteína estrutural nsP2 coordena o *shutdown* da tradução do hospedeiro, priorizando à tradução das proteínas virais (FROLOV; SCHLESINGER, 1994). As proteínas do capsídeo do CHIKV são descritas organizadas em associação a outras proteínas do capsídeo (CHEN *et al.*, 2013). Esta associação, denominada formação em colmeia, é apresentada em outros vírus organizadas nas fábricas virais (BORGES *et al.*, 2019) ou como uma estratégia para libertação por exocitose (CHEN *et al.*, 2013). Higashi e colegas mostraram proteínas estruturais estabelecendo diferentes estruturas citopáticas produzindo vacúolos com presença de membranas (HIGASHI *et al.*, 1967).

Neste trabalho, foi confirmada a presença desses vacúolos e foram descritos outros tipos; também, foi descrita a formação em colmeia das proteínas precursoras de capsídeos. Células Vero infectadas por CHIKV a 8 hpi à MOI 5.0, apresentaram proteínas precursoras do capsídeo organizadas em colmeia próximas a mitocôndrias (**Figura 31A**).

Além disso, o vírus produziu estruturas com formato semelhante à mão, contendo capsídeos e membrana (**Figura 31B**) e também em formato circular com membrana fechada contendo capsídeos internos e externos (**Figura 31C e D**). Estas estruturas fechadas com membrana podem conter poucos (**Figura 31C**) ou múltiplos capsídeos (**Figura 31D**). CHIKV produz diversos outros padrões de estruturas



citopáticas que variam em número de compartimentos (**Figura 31E**), distribuição de capsídeos e ausência (**Figura 31F**) ou presença de membranas (**Figura 31G**). Embora a maioria destas estruturas esteja presente individualmente por célula, também foram encontradas mais de uma estrutura presente na mesma célula infectada (**Figura 31H**).



**Figura 31 – Estruturas citopáticas e distribuição das proteínas de capsídeo de CHIKV em células Vero.**

Células Vero infectadas com chikungunya vírus (CHIKV) à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 16 e 24 horas pós-infecção (hpi) e MOI 5,0 por 8 hpi, e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Em vermelho: proteínas de capsídeos dispostas em forma de colméias próximas à mitocôndrias (em roxo). B) Estrutura vesicular citopática em forma de mão, contendo capsídeos. C) Estrutura vesicular citopática fechada com capsídeos internos e externos à estrutura. D) Estrutura vesicular citopática contendo múltiplos capsídeos internos e externos à estrutura. E) Estrutura vesicular com dois compartimentos contendo capsídeos. F) Estrutura citopática contendo apenas capsídeos em formação circular. G) Estrutura vesicular aberta com poucas proteínas do capsídeo e próximas a uma mitocôndria. H) Presença concomitante de duas estruturas citopáticas distintas com e sem presença de vesículas.

Durante o estágio de síntese de proteínas, o CHIKV produz estruturas citopáticas que compreendem principalmente a proteína do capsídeo (HIGASHI *et*

*al.*, 1967). Em fases tardias da infecção, as proteínas estruturais formam o CPV-II, uma estrutura vacuolar de proteínas do envelope (E) e revestida por capsídeos que se acredita serem liberados por brotamento (SILVA; DERMODY, 2017). Essas estruturas são produzidas na infecção de células de vertebrados e invertebrados (CHEN *et al.*, 2013). São apresentadas imagens adicionais de estruturas de vacúolo citopático apresentando ou não membranas e com proteínas do capsídeo dispostas em diferentes composições (**Figura 31**).

Além dessas estruturas, os capsídeos podem gerar uma formação em colmeia, apresentada em vírus gigantes (BORGES *et al.*, 2019; RETENO *et al.*, 2015), e até mesmo demonstrada para o CHIKV, porém, em fase tardia de infecção em uma composição com vírions maduros liberados por exocitose (CHEN *et al.*, 2013).

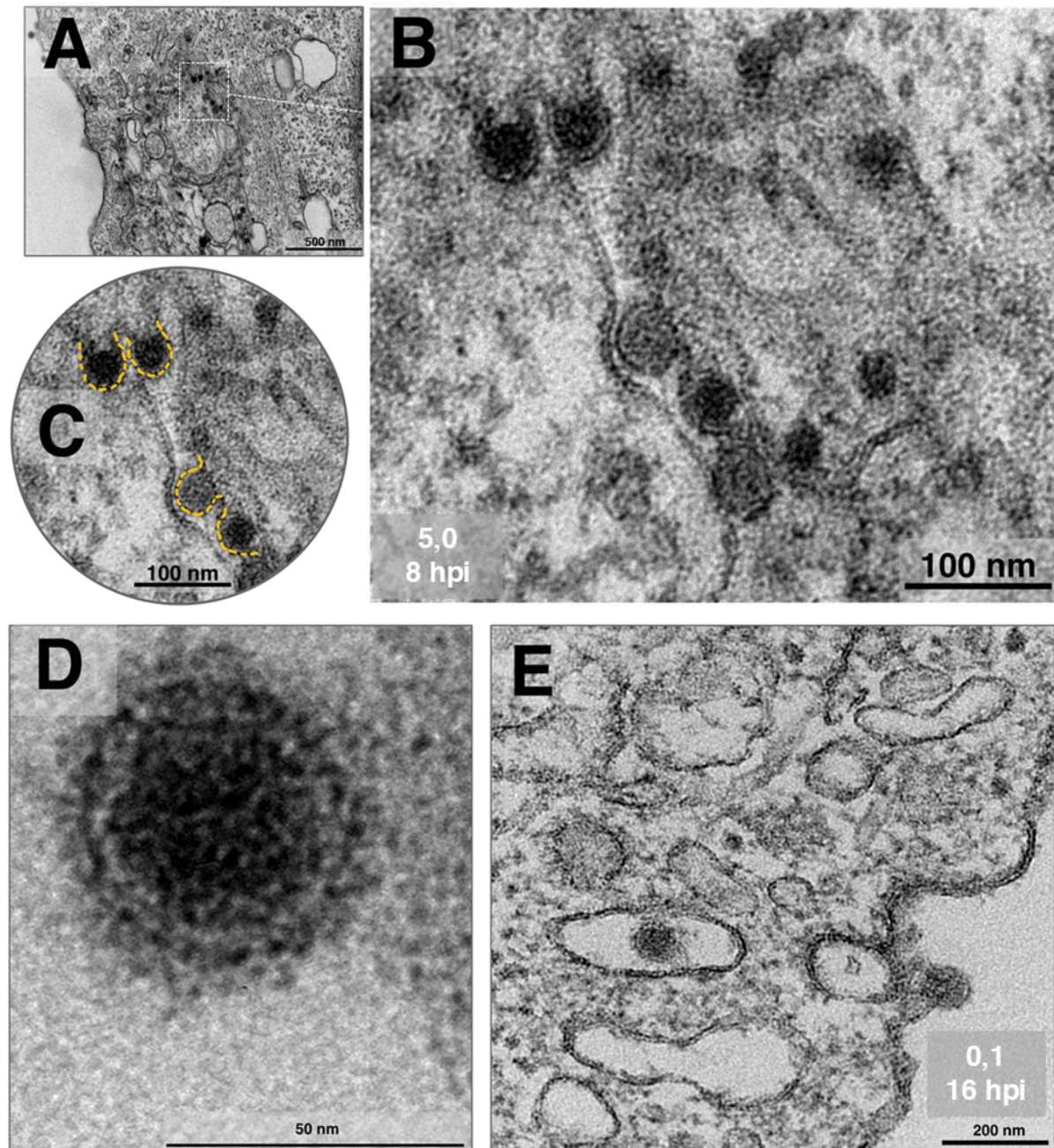
Sugere-se que essas muitas variações de estruturas do CPV-II podem representar uma forma alternativa que pode potencializar a montagem do vírus e até mesmo promover uma liberação alternativa, como exocitose de partículas múltiplas. Porém, para confirmar essa hipótese, são necessários estudos avaliando tempos precisos e sincronizar a infecção (MOI alta) nas fases finais de infecção.

#### 6.2.4 Morfogênese

Os alfavírus obtêm o envelope lipídico da membrana celular por meio de brotamento, no qual o vírus imaturo se torna um vírion (SILVA; DERMODY, 2017). Após os resultados obtidos com alto título intracelular de vírus recuperado, imagens de microscopia eletrônica de transmissão da infecção CHIKV em células Vero foram analisadas para o rastreamento de partículas envelopadas intracelulares.

Surpreendentemente, algumas partículas virais foram observadas adquirindo o envelope sem, no entanto, estarem sendo liberadas por brotamento. Estas partículas obtiveram envelopes em uma fábrica viral delimitada por membrana visualizada à 8 hpi (MOI 5.0) (**Figura 32A e B**). Os envelopes (**Figura 32C**) e uma partícula de CHIKV madura com ~ 60 nm (**Figura 32D**) foram destacados para comparação. Também foi observada uma vesícula não revestida em processo de liberação por exocitose (célula em fase tardia de infecção, contendo alta vacuolização), observado à 16 hpi (MOI 0,1). Esta vesícula carregava uma partícula

viral madura, podendo ser o possível mecanismo de liberação das partículas que obtém o envelope de membranas intracelulares (**Figura 32E**).



**Figura 32 – Fábrica viral e exocitose de CHIKV.**

Células Vero infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 16 hpi e MOI 5,0 por 8 hpi, e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Fábrica viral delimitada por membranas, destacadas em B. B) partículas obtendo envelope e outras sem envelope. C) Em amarelo: destaque de B, as membranas formando o envelope das partículas virais. D) Para comparação, uma partícula madura de chikungunya vírus com ~60 nm. E) Vesícula não revestida, em processo de liberação, carregando uma partícula viral.



Células Vero foram infectadas com CHIKV para avaliar a infecciosidade das partículas em diferentes MOIs. Uma curva de multiplicação – MOI 0,1 – foi realizada por meio de titulação por ensaio de placa. Para analisar, a produção viral foi titulada em três conteúdos: (I) apenas no sobrenadante (extracelular), (II) apenas na intracelular, e (III) apenas o PBS utilizado para a lavagem (quatro vezes) da monocamada e remoção dos vírus do sobrenadante. Como resultado, o número de vírus intracelular a 8 hpi era ~1-log na base 10 superior ( $2,5 \times 10^6$  PFU/mL) ao número de vírus do sobrenadante ( $2,7 \times 10^5$  PFU/mL); e apenas em 16 hpi, os vírus do sobrenadante excedem o conteúdo intracelular (**Figura 33A**).

O título observado para vírus do sobrenadante pode ultrapassar o título intracelular anteriormente ao ponto de 16 hpi, apesar de na curva o título viral ampliar a diferença às 24 hpi. O inóculo por poço foi de  $1,5 \times 10^4$  PFU. Em 8 hpi o conteúdo intracelular, após 4 lavagens com PBS, foi de  $2,5 \times 10^6$  PFU/mL, ou seja, um aumento de 2-log, o que reforça a possibilidade de existir partículas intracelulares com capacidade infecciosa (virions) (**Figura 33A**).

Em consequência da grande diferença nos títulos virais, esse resultado sugere que não seriam partículas ainda aderidas à monocamada após a lavagem com PBS. Nos outros tempos os títulos virais foram ainda maiores, apresentando para 16 hpi e 24 hpi:  $2,1 \times 10^7$  e  $1,3 \times 10^7$  PFU/mL, respectivamente.

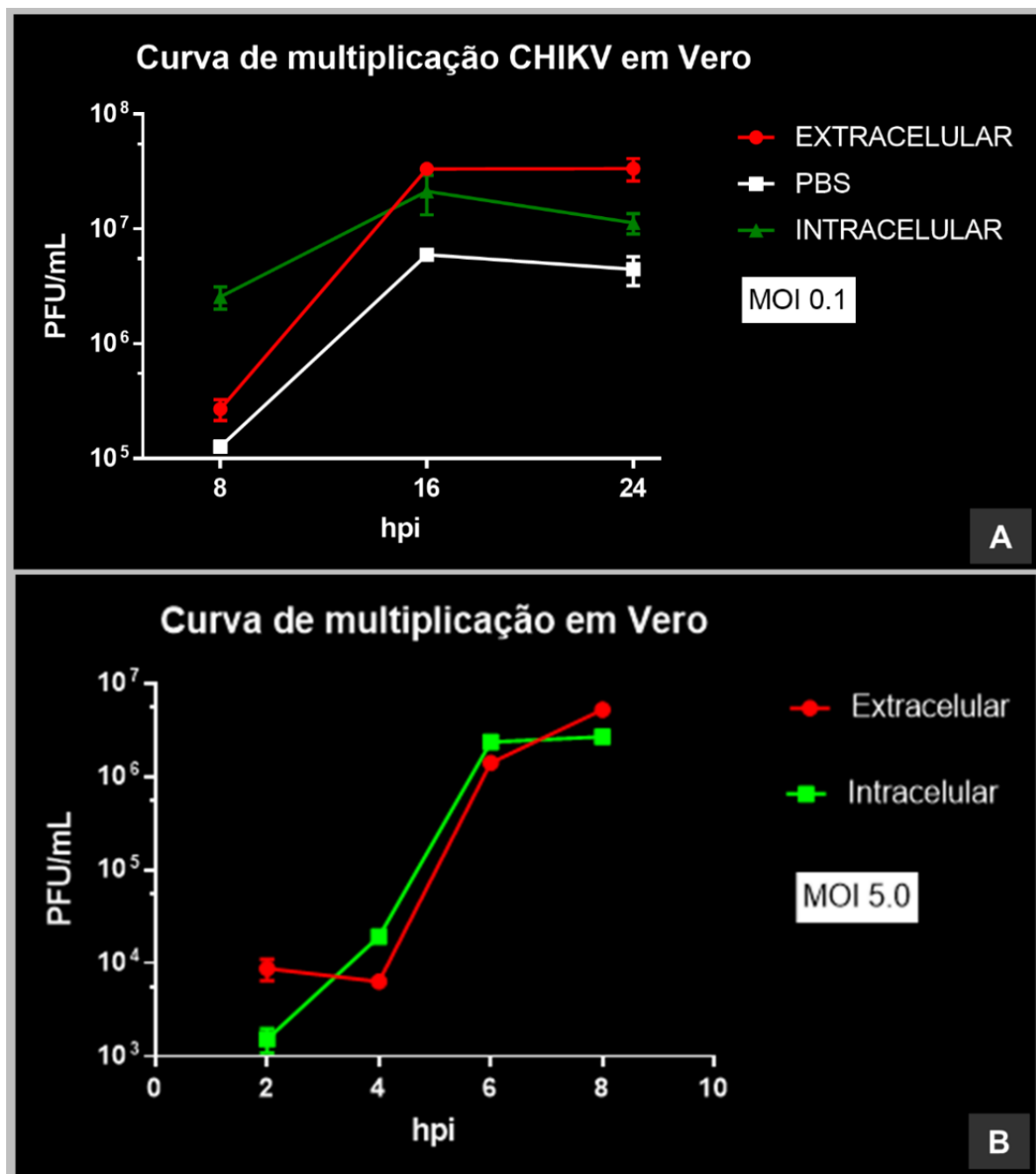
Com o objetivo de confirmar que o sobrenadante foi retirado com PBS, após a lavagem o PBS foi titulado. O PBS apresentou títulos semelhantes aos títulos do sobrenadante e títulos altos para cada tempo, 8 hpi:  $1,2 \times 10^5$  PFU/mL; 16 hpi:  $5,9 \times 10^6$  PFU/mL e 24 hpi:  $4,4 \times 10^6$  PFU/mL, enquanto o título extracelular foi de  $2,7 \times 10^5$ ,  $3,3 \times 10^7$  e  $3,3 \times 10^7$  PFU/mL para 8, 16 e 24 hpi, respectivamente.

Além dessa curva em baixa MOI, uma MOI maior (5,0) foi testada para realizar as mesmas condições de infecção da presença viral da fábrica e confirmar a produção viral em tempos precoces. A MOI 5,0 foi utilizada baseada na distribuição de Poisson que estima que 99% das células são infectadas nessa MOI (CONDIT, 2013). Foi utilizado um tempo inicial de 4 hpi, visto que de acordo com a literatura os alfavírus produzem a primeira progênie de 4 a 6 horas pós-infecção e o CHIKV a partir de 5 hpi (CHAIN; DOANE; MCLEAN, 1966; GRIFFIN, 2013). Uma curva de ciclo único foi realizada, titulando: (I) sobrenadante e (II) conteúdo intracelular em tempos iniciais de infecção (2, 4, 6, e 8 hpi).

Como resultado, os vírus infecciosos intracelulares excedem os sobrenadantes até 6 hpi (**Figura 33B**). Nessa curva é possível notar que nos tempos de 2, 4, 6 e 8 hpi o conteúdo do sobrenadante (extracelular) do CHIKV foi de  $8,7 \times 10^3$ ;  $6,3 \times 10^3$ ;  $1,4 \times 10^6$  e  $5,2 \times 10^6$  PFU/mL, respectivamente (**Figura 33B**). Por fim, para avaliar quando o vírus inicia a produção de RNA, uma RT-qPCR foi realizada, infectando células Vero à MOI 0,1 e analisando os tempos iniciais. Como resultado, foi observado que os vírus iniciam a produção de RNA, em grande quantidade, a partir de 3 hpi (**Figura 34**). Esse resultado está de acordo com a descrição da literatura no qual diz que o complexo de replicação começa a ser montado a partir das 2 hpi, indicando o início rápido da replicação do genoma (FROLOVA *et al.*, 2010), em concordância com a produção de progênie que se inicia a partir de 4 hpi, evidenciando que a síntese de RNA é anterior a esse período (GRIFFIN, 2013).

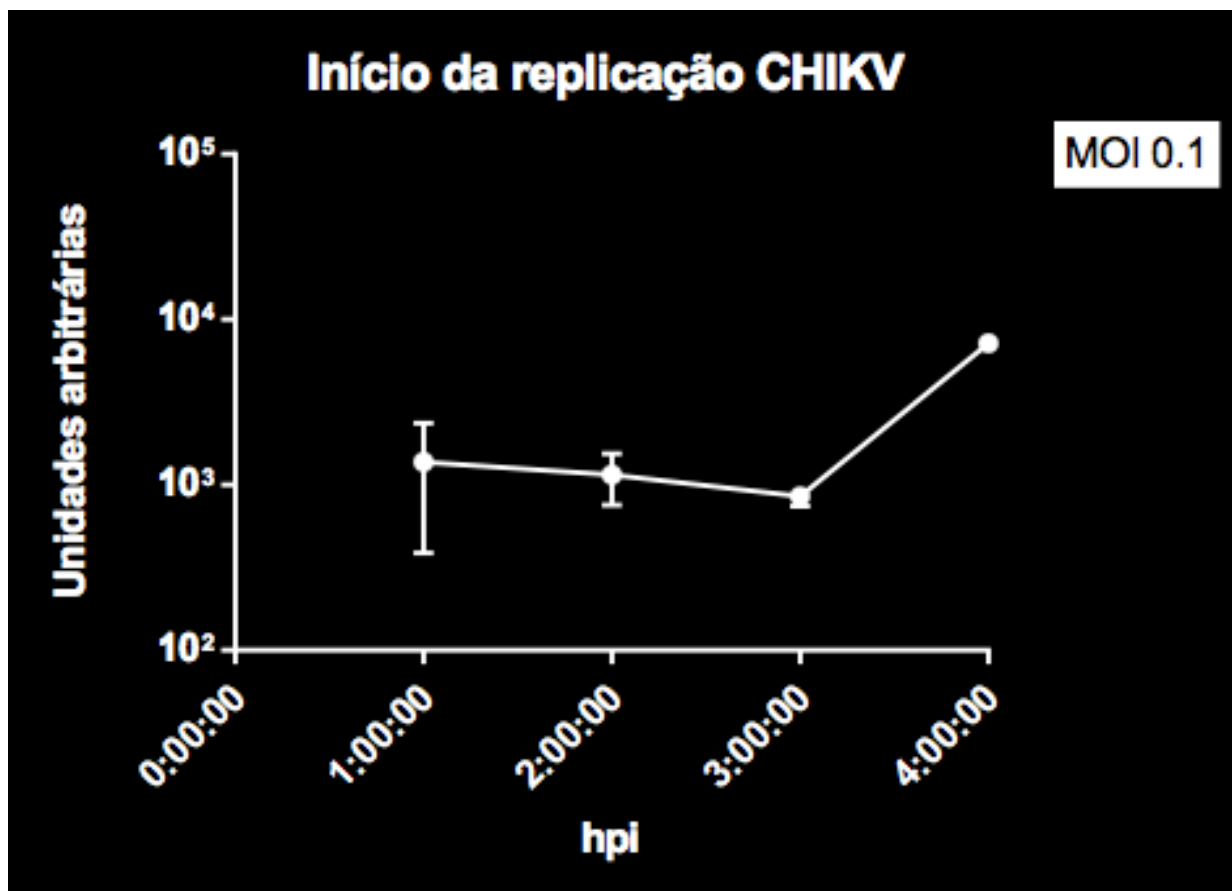
Os resultados com alta MOI na curva de ciclo único e o resultado de quantificação de RNA, corroboram dados da literatura relacionados à produção da primeira progênie viral. A partir de 5 ou 6 hpi, a produção viral aumenta em 3-log, um crescimento expressivo. Na MOI 5,0 o conteúdo extracelular passa a superar o conteúdo intracelular a partir de 8 hpi, diferentemente do observado em MOI baixa.

Uma curva de multiplicação foi descrita na literatura para o CHIKV em Vero, descartando o sobrenadante (HIGASHI *et al.*, 1967). Nela os pesquisadores fizeram o mesmo procedimento similar descrito aqui para determinação do título intracelular, porém, o conteúdo foi chamado de vírus associado à célula. Essa curva de vírus associado à célula corrobora o comportamento encontrado em nossa curva de multiplicação, com a fase de declínio ocorrendo a partir de 16 hpi. No entanto, devido aos altos títulos virais encontrados em todos os parâmetros analisados aqui (sobrenadante, intracelular e PBS pós-lavagem), é reforçado que além de conter partículas associadas à membrana, sugere-se que a maior parte das partículas é indicativa vírus intracelulares com capacidade infecciosa.



**Figura 33 – Curva de multiplicação (A) e ciclo único (B) em Vero**

PBS, intra e extracelular em MOI 0,1 e 5,0. A) Células Vero foram infectadas com CHIKV na MOI de 0,1 e três tempos foram coletados (8, 16 e 24 hpi). Linha vermelha, titulação do conteúdo extracelular; linha verde, titulação do conteúdo intracelular e linha branca titulação do PBS utilizado para a lavagem da monocamada. B) Células Vero foram infectadas com CHIKV na MOI de 5,0 e quatro tempos foram coletados (2, 4, 6 e 8 hpi). Linha vermelha, titulação do conteúdo extracelular e linha verde, titulação do conteúdo intracelular.



**Figura 34 – Curva de replicação genômica do CHIKV.**

Células Vero foram infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI 0,1), sendo seu RNA extraído e quantificado por RT-qPCR após 1, 2, 3 e 4 horas pós-infecção (hpi).

Nossos resultados dão suporte à noção de que o processo de envelopamento do CHIKV, pode ocorrer não apenas via brotamento da partícula viral por meio da membrana plasmática. Surpreendentemente, foram encontradas evidências microscópicas que podem abrir questões acerca do envelopamento do CHIKV. Pela primeira vez, as partículas de CHIKV são observadas adquirindo envelope sem participação do processo de brotamento, e uma única partícula liberando por exocitose em células de vertebrados.

Por meio de ensaio biológico foi confirmada a infecciosidade dos vírus intracelulares maduros, uma vez que um grande número de partículas na titulação intracelular conseguiu formar placa. Propõe-se que o CHIKV possa obter um envelope e estar maduro antes de deixar a célula hospedeira, em um processo alternativo ao brotamento. Essa alternativa estaria presente em menor quantidade se comparada a maioria dos vírus imaturos (apenas capsídeos), os quais foram liberados por brotamento. É possível que essa forma de obtenção de envelope possa

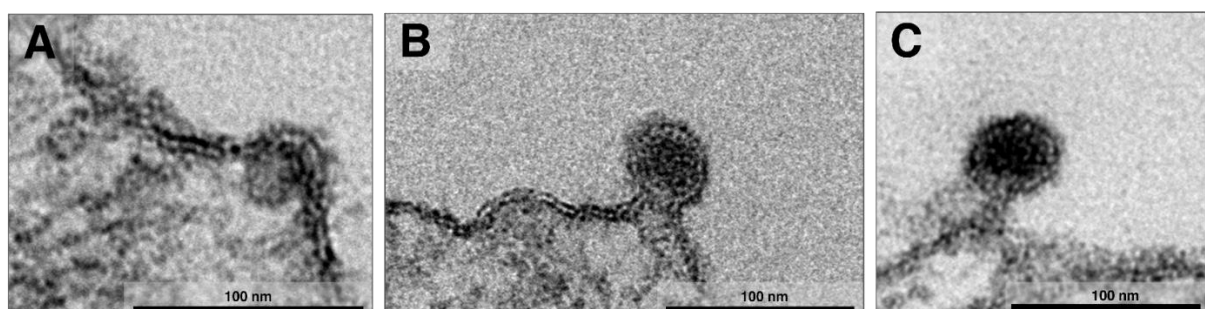
gerar diferentes partículas de vírus, como já é observado no vaccínia vírus que produz: vírions intracelulares maduros (IMV), vírions com envelope intracelular (IEV), vírions com envelope associados a células (CEV) e vírions com envelope extracelular (EEV) (CHUNG *et al.*, 2006). Mais experimentos utilizando marcadores de membrana e inibidores de brotamento poderiam ser realizados para elucidar melhor esse mecanismo.

#### 6.2.5 – Liberação

É conhecido que os alfavírus são liberados nas células hospedeiras por meio de brotamento (BROWN; WAN; KIELIAN, 2018), porém, principalmente as fases finais do ciclo de multiplicação do CHIKV, não estão totalmente elucidadas (SCHNIERLE, 2019; SOLIGNAT *et al.*, 2009).

Para melhor avaliar o processo de liberação, células Vero foram infectadas com CHIKV à MOI 0,1 e 5,0. Inicialmente, a liberação via brotamento foi confirmada, e imagens sequenciais do processo foram organizadas didaticamente no tempo de 16 hpi (MOI 0,1).

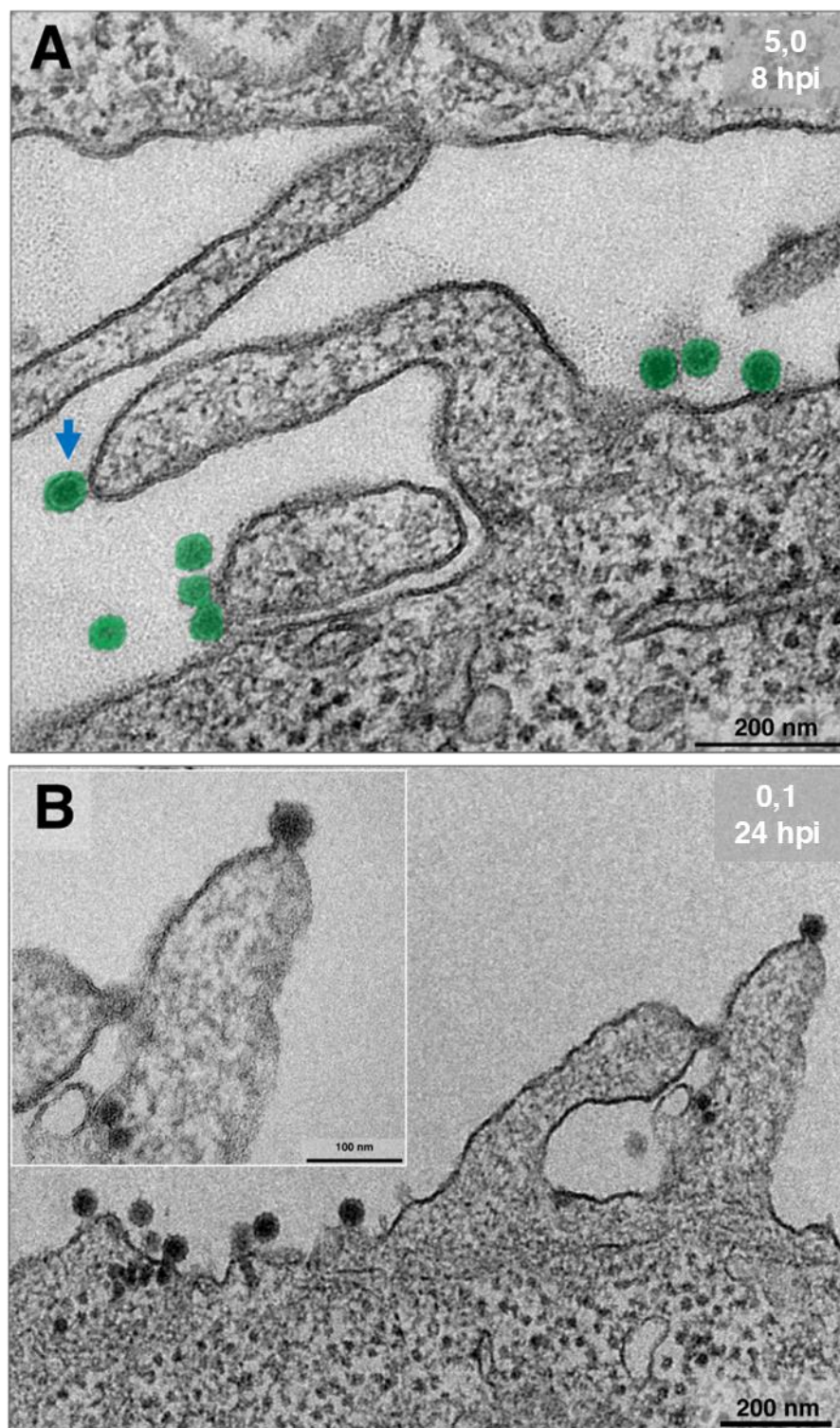
Em sequência, um capsídeo maduro inicia o processo de liberação ao se ligar às glicoproteínas na membrana celular (**Figura 35A**), a membrana torna-se o envelope viral (**Figura 35B**) e a partícula imatura torna-se um vírus maduro, deixando a célula (**Figura 35C**).



**Figura 35 – Liberação via brotamento de partícula de CHIKV.**

Células Vero infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 à 16 horas pós-infecção (hpi) e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Capsídeo imaturo adquirindo envelope a partir da membrana plasmática. B) Partícula quase formada após adquirir o envelope da membrana plasmática. C) Processo final de brotamento em fase final de envelopamento.

Curiosamente, também foram encontrados vírus em processo de liberação do hospedeiro celular por meio de protrusões atípicas da membrana celular, em uma infecção assincrônica por CHIKV realizada a 24 hpi (MOI 0.1) e sincrônica a 8 hpi (MOI 5.0) analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Como resultado, foram encontradas protrusões de membrana celular contendo uma única partícula na ponta (**Figura 36A**). Notavelmente, nesta libertação, os vírus parecem deixar a célula hospedeira por um processo como o brotamento, mas de alguma forma induzem a formação de protrusões (**Figura 36B**).

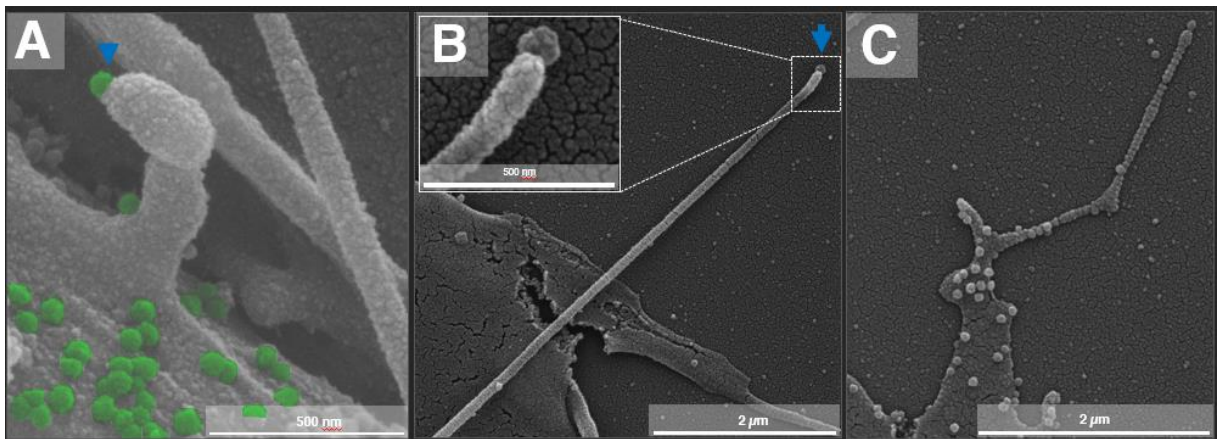


**Figura 36 – Liberação via protusão membranar de CHIKV.**

Células Vero infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 5,0 à 8 horas pós-infecção (hpi) e 0,1 à 24 hpi, e fixadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET). A) Uma protusão membranar contendo uma partícula na ponta (seta azul), também estão presentes outras partículas na parte externa da célula (em verde). B) Duas protusões membranas com partículas sendo liberaas na ponta (em destaque), outras partículas estão presentes da membrana plasmática.



Além do experimento com MET, a presença das protrusões foi verificada por MEV. Para isso, células Vero foram infectadas pelo CHIKV à MOI 0,1 em tempos precoces (5 hpi). Por meio dessa abordagem, a presença de protrusões foi confirmada (**Figura 37A**), sendo visualizadas protrusões longas contendo uma única partícula na sua ponta (**Figura 37B**) e contendo muitas partículas distribuídas ao longo da protrusão (**Figura 37C**).

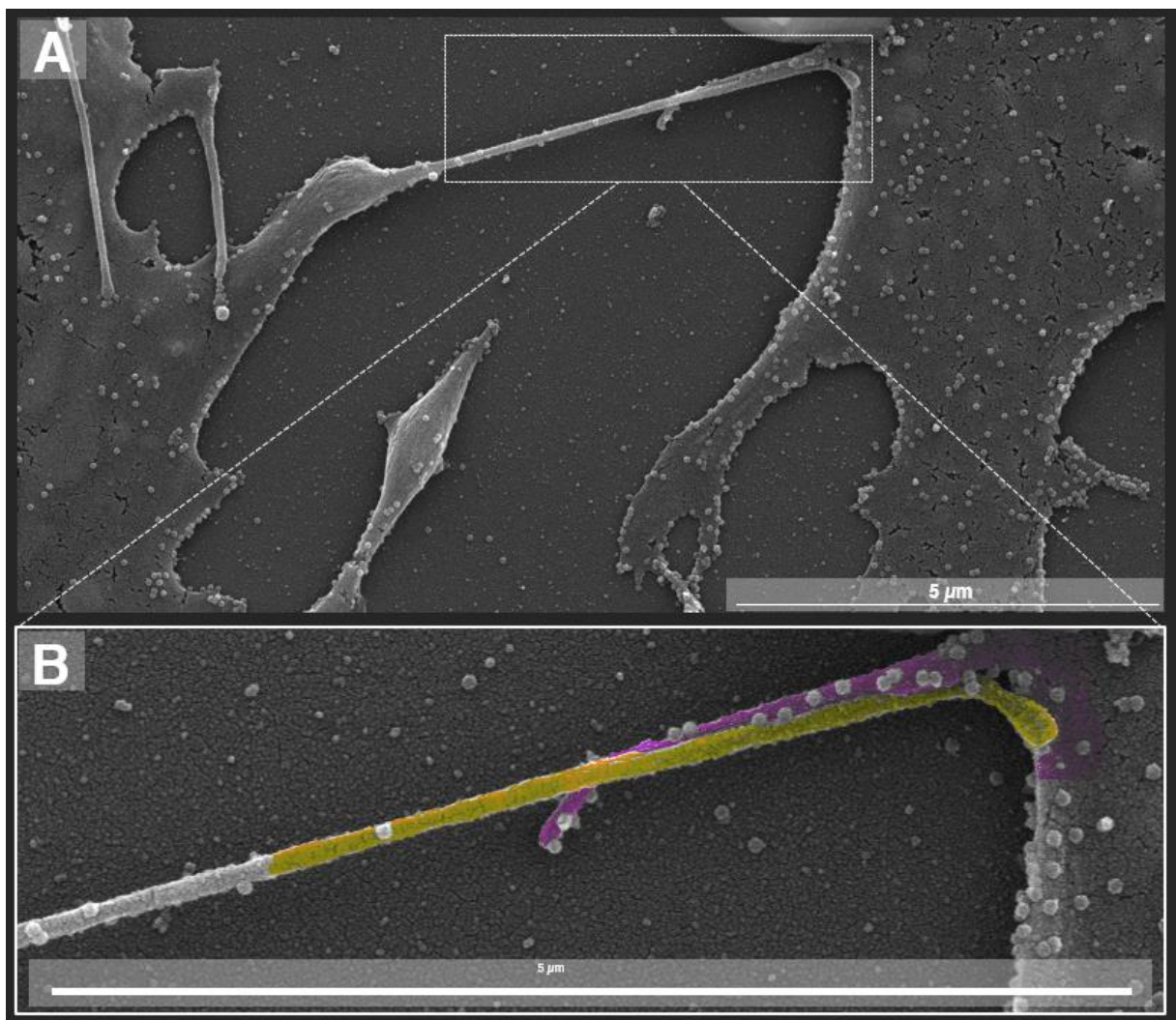


**Figura 37 – Liberação via protrusão membranar de CHIKV em microscopia eletrônica de varredura (MEV).**

Células Vero infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 5 horas pós-infecção (hpi) e fixadas para MEV. A) Protrusão membranar contendo um vírus na ponta (seta azul), também com outras partículas (em verde) presentes na superfície celular. B) Uma longa protrusão contendo uma única partícula na ponta (em destaque; seta azul). C) Partículas distribuídas ao longo da protrusão membranar, também contendo uma partícula na ponta.

Para investigar as protrusões em processo de carregamento de partículas em direção a outra célula, uma infecção em células Vero a um MOI 0,1 por 5 hpi foi realizada e analisada por MEV. Foi observado uma ligação entre duas células por meio de protrusões contendo partículas virais (**Figura 38A**). Ambas as células estavam infectadas e muitas partículas virais foram observadas em ambas as protrusões de cada célula (**Figura 38B**).





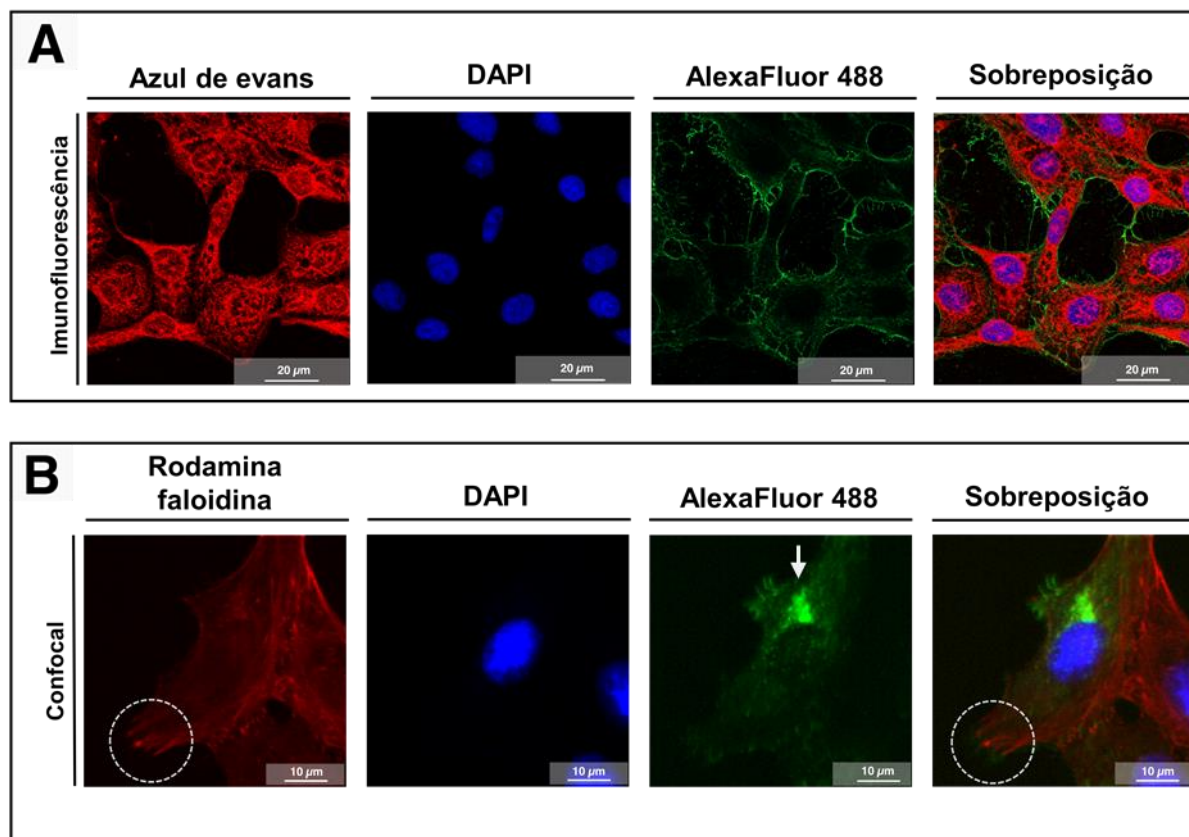
**Figura 38 – Protrusões membranares em células Vero contendo partículas de CHIKV.**

Células Vero infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 8 hpi e fixadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV). A) Duas células infectadas com CHIKV apresentam partículas dispostas na superfície da membrana plasmática; as células estão conectadas por meio de protrusões membranares. B) Essas protrusões, também contendo partículas virais são destacadas em amarelo e roxo para cada célula, destacando a conexão intercelular.

Para confirmar a presença das partículas de CHIKV nas conexões entre as células, foi realizado um ensaio de imunofluorescência, para isso, células Vero foram infectadas pelo CHIKV à MOI 0.1 por 16 hpi. O citoesqueleto foi marcado com azul de Evans e as ligações intercelulares foram analisadas. As proteínas de CHIKV (verde) se encontram distribuídas, principalmente em regiões periféricas da célula, distantes do núcleo (azul). Na sobreposição nota-se a intensa distribuição de proteínas virais nas regiões de ligações entre as células (**Figura 39A**).

Por fim, para avaliar se a composição proteica das protrusões era baseada em actina e se partículas virais estariam presentes nas pontas dessas projeções, foi realizada uma microscopia confocal.

A suspeita de composição de actina é fundamentada em outros vírus que são liberados por projeções de actina, denominadas caudas de actina (ZHANG; WILCOCK; SMITH, 2000). Para o ensaio, uma infecção em células Vero à MOI 0,1 por 16 hpi foi realizada e as imagens foram analisadas. Para a marcação específica dos filamentos de actina, as células infectadas foram coradas com rodamina conjugada à faloidina – um marcador específico de citoesqueleto de actina – e projeções de actina foram observadas (**Figura 39B, círculo branco pontilhado – marcação vermelha**). Também foram marcadas as partículas virais (verde) e núcleo (azul) (**Figura 39B**). Nota-se que existe um acúmulo de proteínas virais próximas ao núcleo sugestiva de fábrica viral (seta branca). Curiosamente, a imagem sobreposta exhibe os filamentos de actina apresentando e algumas proteínas virais na região das pontas, o que pode ser sugestivo de mecanismo de libertação da cauda da actina (**círculo pontilhado branco, Figura 39B**). Apesar desse achado, mais evidências são necessárias para a conclusão do questionamento sobre a natureza das projeções induzidas pelo CHIKV.



**Figura 39** – Células Vero infectadas com CHIKV e marcada com anticorpos e corantes específicos.

Células Vero infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção (MOI) 0,1 por 16 horas pós-infecção (hpi) e preparadas para imunofluorescência ou microscopia confocal. **A)** Imunofluorescência mostrando citoesqueleto celular (azul de Evans), o núcleo das células (DAPI), as proteínas do CHIKV distribuídas nas células infectadas (AlexaFluor 488) e todas as imagens em sobreposição. **B)** Microscopia confocal mostrando filamentos de actina, em destaque, projeções de actina (Rodamina conjugada à faloidina), o núcleo das células (DAPI), as proteínas virais (AlexaFluor 488) e a sobreposição apresentando em destaque a colocalização das proteínas virais nas pontas das projeções de actina.

As caudas de actinas sugeridas nesse trabalho como mecanismo de liberação alternativo para o CHIKV são comuns em outros vírus, como o vaccína vírus que transporta uma única partícula na ponta da cauda (ANDRADE *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2012). Estas projeções são visualizadas em alta MOI a 8 hpi por MET (**Figura 36A**) e em números altos em baixa MOI a 5 hpi em MEV (**Figura 37A**).

Não foi possível encontrar nenhuma protrusão em processo de carreamento de partícula a uma célula não infectada. Sugere-se que estas caudas de actina podem potencializar a disseminação do CHIKV entre as células, além de ser uma das causas para a formação de grandes placas de lise pelo vírus. O tamanho das placas de lise em razão das caudas de actina é observado no vaccínia vírus, no qual o vírus mutante, ou a deficiência celular envolvida no processo, e o vírus selvagem, não são capazes de polimerizar as caudas de actina, forma uma pequena placa de lise (ANDRADE *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2012).

## 7 CONCLUSÕES

- O Trametinibe demonstrou atividade antiviral inibindo a multiplicação de CHIKV em células Vero entre 2 a 3-log.

- O Trametinibe inibiu ou retardou a produção de partículas totais de CHIKV observadas por MET; não foi possível, no entanto, identificar a fase do ciclo de multiplicação viral afetada.

- Em modelos *in vivo* utilizando-se camundongos A129/KO, não foi possível observar a proteção pelo Trametinibe da letalidade da infecção causada pelo CHIKV.

- A penetração de partículas sugestiva de macropinocitose foi relatada para o CHIKV com uma ou múltiplas partículas.

- Fábricas virais do CHIKV foram observadas e partículas envelopando por meio de membranas intracelulares foram notificadas, até nosso conhecimento, pela primeira vez.

- Dois novos processos de liberação foram relatados: exocitose e liberação por protrusão, sugestiva de cauda de actina.

## REFERÊNCIAS

AASKOV, J. *et al.* Lineage replacement accompanying duplication and rapid fixation of an RNA element in the nsP3 gene in a species of alphavirus. *Virology* 410(2): 353-359. 2011.

AGARWAL, T.; ASTHANA, S.; BISSOYI, A. Molecular modeling and docking study to elucidate novel chikungunya virus nsP2 protease inhibitors. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 77(4): 453. 2015.

AGGARWAL, M. *et al.* Crystal structure of aura virus capsid protease and its complex with dioxane: new insights into capsid-glycoprotein molecular contacts. *PloS one* 7(12): e51288. 2012.

ALBARNAZ, J.D. *et al.* MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: implication as an antiviral therapeutic target. *Antiviral research* 111: 82-92. 2014.

ALBULESCU, I. C. *et al.* Suramin inhibits chikungunya virus replication through multiple mechanisms. *Antiviral Research*, 2015.

ANDRADE, A.A. *et al.* The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochemical Journal* 381(2): 437-446. 2004.

ASATI, V.; MAHAPATRA, D.K.; BHARTI, S.K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. *European journal of medicinal chemistry* 109: 314-341. 2016.

BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. *Journal of Visualized Experiments*, 2014.

BARRETO-VIEIRA, D. F. *et al.* Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. *PLOS ONE*, v. 12, n. 9, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184397>>.

BARTH, O. M. Atlas of dengue viruses morphology and morphogenesis. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2000.

BONJARDIM, C. A. Viral Exploitation of the MEK/ERK Pathway - A Tale of Vaccinia Virus and Other Viruses. *Virology*, v. 507, p. 267–275, jul. 2017a.

BONJARDIM, *et al.*, Composições farmacêuticas compreendendo compostos de inclusão entre inibidores farmacológicos da via mek/erk e ciclodextrinas para o tratamento de doenças virais. INPI: nº: BR 13 2017 020173 1, 30 pgs. 2017b

BORA, L. Homology modeling and docking to potential novel inhibitor for chikungunya (37997) protein nsP2 protease. *Journal of Proteomics & Bioinformatics* 2012. 2012.

CAUNT, C.J. *et al.* MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nature Reviews Cancer* 15(10): 577-592. 2015.

CDC, C.F.D.C.A.P. Chikungunya virus. geografic distribution Disponível em:<, Acesso em: 19 de abril de 2016a.

CDC. Countries and territories where chikungunya cases have been reported

(as of May 29, 2018). Disponível em: <[https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/Chik\\_World\\_Map\\_05-29-18-P.pdf](https://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/Chik_World_Map_05-29-18-P.pdf)>. 2019.

CDC. Mosquito life cycle. Disponível em: <[www.cdc.gov/chikungunya](http://www.cdc.gov/chikungunya)>, Acesso em: 19 de abril de 2016b.

CHAPMAN, M.S.; MINER, J.N. Novel mitogen-activated protein kinase kinase inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs* 20(2): 209-220. 2011.

DAS, T. *et al.* Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. *Journal of General Virology* 96(2): 294-310. 2015.

FDA US. Mekinist (trametinib) tablets: prescribing information; 2013. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2013/204114s000lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/204114s000lbl.pdf). Acesso em 2018.

MAGALHÃES, J.C. *et al.* A Mitogenic Signal Triggered at an Early Stage of Vaccinia Virus Infection IMPLICATION OF MEK/ERK AND PROTEIN KINASE A IN VIRUS MULTIPLICATION. *Journal of Biological Chemistry* 276(42): 38353-38360. 2001.

DEEBA, F. *et al.* Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host pathogen interaction and vaccine strategies. *Pathogens and disease* 74(3): ftv119. 2016.

DELANG, L. *et al.* Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014.

DOCHI, T. *et al.* Trametinibe suppresses HIV-1 replication by interfering with



the disassembly of human immunodeficiency virus type 1 capsid core. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017.

DONALISIO, M.R.; FREITAS, A.R.R. Chikungunya no Brasil: um desafio emergente. *REV BRAS EPIDEMIOL* 18(1): 283-285. 2015.

ENSERINK, M. Chikungunya: no longer a third world disease. *Science*.318(5858): 1860-1861. 2007.

FARIA, N.R. *et al.* Epidemiology of chikungunya virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. 2015.

FEIBELMAN, K. M. *et al.* Identification of small molecule inhibitors of the Chikungunya virus nsP1 RNA capping enzyme. *Antiviral Research*, 2018.

FOY, N.J. *et al.* Hypervariable domains of nsP3 proteins of New World and Old World alphaviruses mediate formation of distinct, virus-specific protein complexes. *Journal of virology* 87(4): 1997-2010. 2013.

FRANZ, S. *et al.* Susceptibility of chikungunya virus to inactivation by heat and commercially and world Health organization-recommended biocides. *Journal of Infectious Diseases*, 2018.

FROLOVA, E. I. *et al.* Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane. *Journal of Virology*, 2010.

GARDNER, C. L. *et al.* Interferon-alpha/beta deficiency greatly exacerbates arthritogenic disease in mice infected with wild-type chikungunya virus but not with the cell culture-adapted live-attenuated 181/25 vaccine candidate. *Virology*, 2012.

GARDNER, J. *et al.* Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice □. JOURNAL OF VIROLOGY, 2010.

GEDERS, T.W.; SMITH, J.L.; KUHN, R.J. Role for conserved residues of Sindbis virus nonstructural protein 2 methyltransferase-like domain in regulation of minus-strand synthesis and development of cytopathic infection. Journal of virology 82(15): 7284-7297. 2008.

GÖERTZ, G. P. *et al.* Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2017.

GRIFFIN, D. E. ALPHAVIRUSES. In: Fields Virology. 6TH. ed. [s.l: s.n.]p. 655.

HAGA, I. R. *et al.* Carbenoxolone-mediated cytotoxicity inhibits Vaccinia virus replication in a human keratinocyte cell line. Scientific Reports, 2018.

HALSTEAD, S.B. Reappearance of chikungunya, formerly called dengue, in the Americas. Emerging infectious diseases 21(4): 557. 2015.

HIGASHI, N. *et al.* Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells. Virology, 1967.

HO, Y. J. *et al.* Micafungin is a novel anti-viral agent of chikungunya virus through multiple mechanisms. Antiviral Research, 2018.

HO, Y. J. *et al.* Suramin inhibits chikungunya virus entry and transmission. PLoS ONE, 2015.

HONÓRIO, N.A. *et al.* Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. 2015.

HUANG, Y.-J. S. *et al.* Temperature Tolerance and Inactivation of Chikungunya Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2015.

HUBÁLEK, Z.; RUDOLF, I.; NOWOTNY, N. Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Adv Virus Res* 89: 201-275. 2014.

JAIN, M.; RAI, S.; CHAKRAVARTI, A. Chikungunya: a review. *Tropical doctor*.38(2): 70-72. 2008.

JOSE, J.; SNYDER, J.E.; KUHN, R.J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future microbiology* 4(7): 837-856. 2009.

KARLAS, A. *et al.* A human genome-wide loss-of-function screen identifies effective chikungunya antiviral drugs. *Nature Communications*, 2016.

KAUR, P. *et al.* Inhibition of Chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013.

KAUR, P.; LEE, R. C. H.; CHU, J. J. H. Infectious viral quantification of chikungunya virus—virus plaque assay. In: *Methods in Molecular Biology*. [s.l: s.n.]

KHAN, M. *et al.* Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in Vero cells. *Journal of Medical Virology*, 2010.

KOLCH, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews Molecular cell biology* 6(11): 827-837. 2005.

KOLCH, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochemical Journal* 351(2): 289-305. 2000.

KREJBICH-TROTOT, P. *et al.* Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virology journal* 8(1): 1. 2011.

KROON, E. G. *et al.* Natural Vaccinia Virus Infection: Diagnosis, Isolation, and Characterization. *Current Protocols in Microbiology*, 2016.

KUCHARZ, E.J.; CEBULA-BYRSKA, I. Chikungunya fever. *European journal of internal medicine* 23(4): 325-329. 2012.

LABADIE, K. *et al.* Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *The Journal of clinical investigation* 120(3): 894-906. 2010.

LAKE, D.; CORRÊA, S.A.; MÜLLER, J. Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 1-17. 2016.

LAM, S. *et al.* Expression of plasmid-based shRNA against the E1 and nsP1 genes effectively silenced Chikungunya virus replication. *PLoS one* 7(10): e46396. 2012.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992.

LANGSJOEN, R. M. *et al.* Chikungunya Virus Strains Show Lineage-Specific Variations in Virulence and Cross-Protective Ability in Murine and Nonhuman Primate Models. *mBio*, 2018.

LEE, A.W. *et al.* Single-cell, phosphoepitope-specific analysis demonstrates cell type-and pathway-specific dysregulation of Jak/STAT and MAPK signaling associated with in vivo human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 82(7): 3702-3712. 2008.

LEE, R. C. H. *et al.* Mosquito Cellular Factors and Functions in Mediating the Infectious entry of Chikungunya Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013.

LI, L. *et al.* Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature* 468(7324): 705-708. 2010.

LITTLE, A.; SMITH, P.; COOK, S. Mechanisms of acquired resistance to ERK1/2 pathway inhibitors. *Oncogene* 32(10): 1207-1215. 2013.

LIUMBRUNO, G.M. *et al.* The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood Transfus* 6(4): 199-210. 2008.

LUCAS-HOURANI, M. *et al.* A phenotypic assay to identify Chikungunya virus inhibitors targeting the nonstructural protein nsP2. *Journal of biomolecular screening* 18(2): 172-179. 2013.

LUNDSTROM, K. Alphavirus vectors as tools in neuroscience and gene therapy. *Virus research* 216: 16-25. 2016.

MCCUBREY, J.A. *et al.* Emerging MEK inhibitors. *Expert opinion on emerging*

drugs 15(2): 203-223. 2010.

MCINERNEY, G.M. *et al.* Semliki Forest virus produced in the absence of the 6K protein has an altered spike structure as revealed by decreased membrane fusion capacity. *Virology* 325(2): 200-206. 2004.

MCSWEEGAN, E. *et al.* The Global Virus Network: Challenging chikungunya. *Antiviral research* 120: 147-152. 2015.

MEBRATU, Y.; TESFAIGZI, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle* 8(8): 1168-1175. 2009.

MONTERO, A. [Chikungunya fever-A new global threat]. *Medicina clinica* 145(3): 118-123. 2015.

MS. SVS. Boletim Epidemiológico: Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika) até a Semana Epidemiológica 38 de 2020. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/25/2020-013-Monitoramento-dos-casos-de-arboviroses-publicacao-25-11-2020.pdf>>.

MUKHOPADHYAY, S. *et al.* Mapping the structure and function of the E1 and E2 glycoproteins in alphaviruses. *Structure* 14(1): 63-73. 2006.

NGUYEN, P.T.; YU, H.; KELLER, P.A. Identification of chikungunya virus nsP2 protease inhibitors using structure-base approaches. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 57: 1-8. 2015.

NUNES, M.R.T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus

in Brazil. *BMC medicine* 13(1): 1. 2015.

ONG, R.-Y.; LUM, F.-M.; NG, L.F. The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections. *Future Virology* 9(3): 313-330. 2014.

OO, A. *et al.* Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. *Antiviral Research*, 2018.

PARK, E.; GRIFFIN, D.E. The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology* 388(2): 305-314.2009.

PASTORINO, B. *et al.* Effect of chemical stabilizers on the thermostability and infectivity of a representative panel of freeze dried viruses. *PLoS ONE*, 2015.

PETERSEN, L.R.; POWERS, A.M. Chikungunya: epidemiology. *F1000Research* 5. 2016.

AKHRYMUK, I.; KULEMZIN, S. V.; FROLOVA, E. I. Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II. *Journal of Virology*, 2012.

ANDRADE, Luciana G *et al.* Vaccinia virus dissemination requires p21-activated kinase 1. *Archives of virology*, v. 161, n. 11, p. 2991–3002, 2016.

BARTHOLOMEEUSEN, Koen *et al.* A chikungunya virus trans-replicase system reveals the importance of delayed nonstructural polyprotein processing for efficient replication complex formation in mosquito cells. *Journal of virology*, v. 92, n. 14, 2018.

BEKERMAN, E.; EINAIV, S. Combating emerging viral threats. *Science*, 2015.

BERNARD, Eric *et al.* Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: Role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS ONE*, v. 5, n. 7, 2010.

BOGUSKI, Mark S.; MANDL, Kenneth D.; SUKHATME, Vikas P. *Repurposing with a difference. Science*. [S.l: s.n.], 2009

BORGES, Iara *et al.* Trapping the Enemy: *Vermamoeba vermiformis* Circumvents Faustovirus Mariensis Dissemination by Enclosing Viral Progeny inside Cysts. *Journal of Virology*, v. 93, n. 14, p. e00312-19, 15 jul. 2019. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/93/14/e00312-19.abstract>>.

BROWN, Rebecca S; WAN, Judy J; KIELIAN, Margaret. The alphavirus exit pathway: what we know and what we wish we knew. *Viruses*, v. 10, n. 2, p. 89, 2018.

CAMINI, Fernanda Caetano *et al.* Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral research*, v. 158, p. 8–12, 2018.

CAMPOS, Rafael Kroon *et al.* Adenoviral-Vectored Mayaro and Chikungunya Virus Vaccine Candidates Afford Partial Cross-Protection From Lethal Challenge in A129 Mouse Model. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 2020.

CHAIN, M. M.; DOANE, F. W.; MCLEAN, D. M. Morphological development of Chikungunya virus. *Canadian journal of microbiology*, v. 12, n. 5, p. 895–900, 1966. Disponível em: <<https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/m66-122>>. Acesso em: 11 nov. 2020.

CHAN, Yi-Hao; LUM, Fok-Moon; NG, Lisa. Limitations of Current in Vivo Mouse Models for the Study of Chikungunya Virus Pathogenesis. *Medical Sciences*, 2015.

CHEN, Rubing *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jan. 2018.

CHUNG, Che-Sheng *et al.* Vaccinia Virus Proteome: Identification of Proteins in Vaccinia Virus Intracellular Mature Virion Particles. *Journal of Virology*, v. 80, n. 5, p. 2127 LP – 2140, 1 mar. 2006. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/80/5/2127.abstract>>.

CONDIT, Richard C. Principles of Virology. *Fields Virology*. 6TH. ed. [S.l: s.n.], 2013. p. 36.

COUDERC, Thérèse *et al.* A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. *PLOS Pathogens*, v. 4, n. 2, p. 1–12, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040029>>.

DING, Siyuan *et al.* STAG2 deficiency induces interferon responses via cGAS-STING pathway and restricts virus infection. *Nature Communications*, 2018.

DOCHI, Takeo *et al.* Trametinib suppresses HIV-1 replication by interfering with the



disassembly of human immunodeficiency virus type 1 capsid core. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017.

ERASMUS, Jesse H *et al.* A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nature medicine*, v. 23, n. 2, p. 192, 2017.

FERRAZ, Ariane Coelho *et al.* Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. *Antiviral research*, v. 168, p. 76–81, 2019.

FERREIRA, P G *et al.* Detection of the antiviral activity of epicatechin isolated from *Salacia crassifolia* (Celastraceae) against Mayaro virus based on protein C homology modelling and virtual screening. *Archives of virology*, v. 163, n. 6, p. 1567–1576, 2018.

FROLOV, Ilya; SCHLESINGER, Sondra. Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *Journal of Virology*, v. 68, n. 3, p. 1721–1727, 1994.

FROLOVA, E. I. *et al.* Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane. *Journal of Virology*, 2010.

GIGANTE, Alba *et al.* Antiviral activity of [1,2,3]triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones against chikungunya virus targeting the viral capping nsP1. *Antiviral Research*, v. 144, p. 216–222, 2017. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354217300591>>.

GRIFFIN, D. E. ALPHAVIRUSES. *Fields Virology*. 6TH. ed. [S.l.: s.n.], 2013. p. 655.

GUAN, Chunmei *et al.* A review of current large-scale mouse knockout efforts. *genesis*, v. 48, n. 2, p. 73–85, 2010.

HELLSTRÖM, Kirsi *et al.* Partially uncleaved alphavirus replicase forms spherule structures in the presence and absence of RNA template. *Journal of virology*, v. 91, n. 18, 2017.

HERNANDEZ, Raquel; BROWN, Dennis T.; PAREDES, Angel. Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. *Advances in Virology*, 2014.

HOORNWEG, Tabitha E *et al.* Dynamics of chikungunya virus cell entry unraveled by single-virus tracking in living cells. *Journal of virology*, v. 90, n. 9, p. 4745–4756, 2016.

HUA, Ching *et al.* Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 13, n. 8, p. 1–19, 2019.

HUANG, Sui *et al.* Immune response in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor.

*Science*, 1993.

HYDE, Jennifer L. *et al.* The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs - Non-coding is not non-functional. *Virus Research*, 2015.

JIN, Jing *et al.* Neutralizing Antibodies Inhibit Chikungunya Virus Budding at the Plasma Membrane. *Cell Host & Microbe*, v. 24, n. 3, p. 417- 428.e5, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312818303883>>.

KIELIAN, Margaret; REY, Félix A. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 67–76, 2006.

KRIEGER, Sophie E *et al.* Echovirus 1 entry into polarized Caco-2 cells depends on dynamin, cholesterol, and cellular factors associated with macropinocytosis. *Journal of virology*, v. 87, n. 16, p. 8884–8895, ago. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23740983>>.

KUJALA, Pekka *et al.* Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *Journal of virology*, v. 75, n. 8, p. 3873–3884, 2001.

LAM, Shirley *et al.* Expression of plasmid-based shRNA against the E1 and nsP1 genes effectively silenced Chikungunya virus replication. 2012.

LANI, Rafidah *et al.* Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. *Scientific reports*, v. 5, p. 11421, 2015.

LEE, Jia-Yee; BOWDEN, D Scott. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clinical microbiology reviews*, v. 13, n. 4, p. 571–587, 2000.

MAK, Tak W.; PENNINGER, Josef M.; OHASHI, Pamela S. KNOCKOUT MICE: A PARADIGM SHIFT IN MODERN IMMUNOLOGY. *Nature Reviews Immunology*, 2002.

MARÉCHAL, Valérie *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *Journal of Virology*, v. 75, n. 22, p. 11166 LP – 11177, 15 nov. 2001. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/75/22/11166.abstract>>.

MARK T. HEISE; HERBERT W. VIRGIN. Pathogenesis of Viral Infection. In: KNIPE, D.M., AND HOWLEY, P.M. (Org.). . *Fields Virology*. Sixth ed. Philadelphia, PA 19103 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2013. p. 254–285.

MEIER, Oliver *et al.* Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *The Journal of cell biology*, v. 158, n. 6, p. 1119–1131, 16 set. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12221069>>.

MERCER, Jason; HELENIUS, Ari. R E V I E W Virus entry by macropinocytosis. v. 11, n. 5, 2009.

MERCER, Jason; HELENIUS, Ari. Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells. *Science*, v. 320, n. 5875, p. 531 LP – 535, 25 abr. 2008. Disponível em:

<<http://science.sciencemag.org/content/320/5875/531.abstract>>.

MÜLLER, Ulrike *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 1994.

NG, Lisa F.P. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annual Review of Virology*, 2017.

NICOLA, Anthony V.; MCEVOY, Anna M.; STRAUS, Stephen E. Roles for Endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Virology*, v. 77, n. 9, p. 5324–5332, 2003.

OLIVEIRA, Leonardo C. De *et al.* The small molecule AZD6244 inhibits dengue virus replication in vitro and protects against lethal challenge in a mouse model. *Archives of Virology*, v. 165, n. 3, p. 671–681, 2020.

ONG, R.-Y.; LUM, F.-M.; NG, L.F. The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections. *Future Virology* 9(3): 313-330. 2014.

OO, A. *et al.* Deciphering the potential of baicalin as an antiviral agent for Chikungunya virus infection. *Antiviral Research*, 2018.

PARASHAR, Deepti *et al.* Altered microRNA expression signature in Chikungunya-infected mammalian fibroblast cells. *Virus Genes*, 2018.

PEREIRA, Anna C T C *et al.* A vaccinia virus-driven interplay between the MKK4/7-JNK1/2 pathway and cytoskeleton reorganization. *Journal of virology*, v. 86, n. 1, p. 172–184, 2012.

PIETILÄ, Maija K; HELLSTRÖM, Kirsi; AHOLA, Tero. Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus research*, v. 234, p. 44–57, 2017.

PUSHPAKOM, Sudeep *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature reviews Drug discovery*, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2019.

RATHORE, Abhay P.S. *et al.* Chikungunya virus nsP3 & nsP4 interacts with HSP-90 to promote virus replication: HSP-90 inhibitors reduce CHIKV infection and inflammation in vivo. *Antiviral Research*, 2014.

RETENO, Dorine Gaëlle *et al.* Faustovirus, an Asfarvirus-Related New Lineage of Giant Viruses Infecting Amoebae. *Journal of Virology*, v. 89, n. 13, p. 6585 LP – 6594, 1 jul. 2015. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/89/13/6585.abstract>>.

- SCHNIERLE, Barbara S. Cellular attachment and entry factors for chikungunya virus. *Viruses*, v. 11, n. 11, p. 1078, 2019.
- SCHRÄDER, Tobias *et al.* The clinically approved MEK inhibitor Trametinib efficiently blocks influenza A virus propagation and cytokine expression. *Antiviral Research*, 2018.
- SELVAMANI, Sakthi Priya; MISHRA, Ritu; SINGH, Sunit K. Chikungunya virus exploits miR-146a to regulate NF- $\kappa$ B pathway in human synovial fibroblasts. *PLoS ONE*, 2014.
- SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. *Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. Journal of Clinical Investigation*. [S.l: s.n.], 2017
- SIMPSON, Elizabeth M. *et al.* Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nature Genetics*, 1997.
- SNYDER, J. E. *et al.* Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. *Journal of Virology*, 2013.
- SOLIGNAT, Maxime *et al.* Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009.
- SPUUL, Pirjo *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *Journal of virology*, v. 84, n. 15, p. 7543–7557, ago. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20484502>>.
- STRAUSS, J H; STRAUSS, E G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, 1994.
- SUBUDHI, Bharat Bhusan *et al.* *Current strategies for inhibition of Chikungunya infection. Viruses*. [S.l: s.n.], 2018
- THAA, Bastian *et al.* Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and Chikungunya Viruses Is Dependent on nsP3 and Connected to Replication Complex Internalization. *Journal of Virology*, 2015.
- UTT, Age *et al.* Versatile trans-replication systems for chikungunya virus allow functional analysis and tagging of every replicase protein. *PLoS ONE*, 2016.
- VARGHESE, Finny S *et al.* The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Journal of virology*, 2016.
- VON MAGNUS, Preben. Incomplete forms of influenza virus. *Advances in virus*

*research*. [S.l.]: Elsevier, 1954. v. 2. p. 59–79.

WADA, Yuji *et al.* Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. *Virology*, 2017.

WALKER, Peter J. *et al.* Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). *Archives of Virology*, v. 165, n. 11, p. 2737–2748, 1 nov. 2020.

WANG, Fuan *et al.* Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nature immunology*, v. 5, n. 12, p. 1266–1274, 2004.

WONG, Kai Zhi; CHU, Justin Jang Hann. *The interplay of viral and host factors in chikungunya virus infection: Targets for antiviral strategies*. *Viruses*. [S.l.: s.n.]. , 2018

WRIGHT, Cameron J.M.; MCCORMACK, Paul L. Trametinib: First global approval. *Drugs*, 2013.

YAMAGUCHI, Takayuki *et al.* Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *International journal of oncology*, v. 39, n. 1, p. 23–31, 2011.

ZAMBROWICZ, Brian P.; SANDS, Arthur T. *Knockouts model the 100 best-selling drugs - Will they model the next 100?* *Nature Reviews Drug Discovery*. [S.l.: s.n.]. , 2003

ZHAO, Lan-Juan *et al.* Interferon alpha regulates MAPK and STAT1 pathways in human hepatoma cells. *Virology Journal*, v. 8, n. 1, p. 157, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-157>>.

RIVERO, H.J.V. (TESE) Avaliação da atividade antiviral de selumetinib, trametinib, saracatinib e bosutinib contra o Dengue virus, Zika virus E Yellow fever virus: foco nas etapas do ciclo de multiplicação do isolado zika PE-243; 2019

RIVERO, H.J.V. et al.; Antiviral effect of the small molecule trametinib (mekinist) against zika, dengue and yellow fever vírus. Journal: Archives of Virology - SUBMETIDO.

PLANZ, O. Development of cellular signaling pathway inhibitors as new antivirals against influenza. *Antiviral research* 98(3): 457-468. 2013.

PLESCHKA, S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biological chemistry* 389(10): 1273-1282. 2008.

POHJALA, L. *et al.* Inhibitors of alphavirus entry and replication identified with a stable Chikungunya replicon cell line and virus-based assays. *PLoS One* 6(12): e28923. 2011.

PORTER, K. R. *et al.* A serological study of Chikungunya virus transmission in Yogyakarta, Indonesia: Evidence for the first outbreak since 1982. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2004.

POWERS, A.M. *et al.* Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology* 81(2): 471-479. 2000.

PRESTI, A.L. *et al.* Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 7(12): 925-932. 2014.

PRESTI, A.L. *et al.* Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016.

REITER, P. Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7(2): 261-273. 2007.

RIEMERSMA, K. K. *et al.* Chikungunya Virus Fidelity Variants Exhibit Differential Attenuation and Population Diversity in Cell Culture and Adult Mice. *Journal of Virology*, 2018.

RIVERO, H.J.V. (TESE) Avaliação da atividade antiviral de selumetinib, trametinib, saracatinib e bosutinib contra o Dengue virus, Zika virus E Yellow fever virus: foco nas etapas do ciclo de multiplicação do isolado zika PE-243; 2019.

RIVERO, H.J.V. et al.; Antiviral effect of the small molecule trametinib (mekinist) against zika, dengue and yellow fever vírus. Journal: Archives of Virology -SUBMETIDO.

RODRÍGUEZ, M.E. *et al.* Raf/MEK/ERK pathway activation is required for Junin virus replication. Journal of General Virology 95(4): 799-805. 2014.

ROSKOSKI, R. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. Pharmacological research 66(2): 105-143. 2012.

ROTHAN, H. A. *et al.* A combination of doxycycline and ribavirin alleviated chikungunya infection. PLoS ONE, 2015.

ROTHAN, H. A. *et al.* Mefenamic acid in combination with ribavirin shows significant effects in reducing chikungunya virus infection in vitro and in vivo. Antiviral Research, 2016.

ROUSSEL, A. *et al.* Structure and interactions at the viral surface of the envelope protein E1 of Semliki Forest virus. Structure 14(1): 75-86. 2006.

RUPP, J.C. *et al.* Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. Journal of General Virology 96(9): 2483-2500. 2015.

RUPP, J.C.; JUNDT, N.; HARDY, R.W. Requirement for the amino-terminal domain of Sindbis virus nsP4 during virus infection. Journal of virology 85(7):

3449-3460. 2011.

RYMAN, K.D.; KLIMSTRA, W.B. Host responses to alphavirus infection. *Immunological reviews* 225(1): 27-45. 2008.

RYMAN, K.D.; KLIMSTRA, W.B.; JOHNSTON, R.E. Attenuation of Sindbis virus variants incorporating uncleaved PE2 glycoprotein is correlated with attachment to cell-surface heparan sulfate. *Virology* 322(1): 1-12. 2004.

SAHA, A. *et al.* Vector-delivered artificial miRNA effectively inhibited replication of Chikungunya virus. *Antiviral Research*, 2016.

SANTHOSH, S. *et al.* Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus. *Journal of Clinical Virology* 39(3): 188-193. 2007.

SANZ, M.A.; CARRASCO, L. Sindbis Virus Variant with a Deletion in the 6K Gene Shows Defects in Glycoprotein Processing and Trafficking: Lack of Complementation by a Wild-Type 6K Gene intrans. *Journal of virology* 75(16): 7778-7784. 2001.

SCHAECHTER, M. *Encyclopedia of microbiology*, Academic Press. 2009.

SCHILTE, C. *et al.* Type I IFN controls chikungunya virus via its action on non-hematopoietic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 2010.

SCHRÄDER, T. *et al.* The clinically approved MEK inhibitor Trametinibe efficiently blocks influenza A virus propagation and cytokine expression. *Antiviral Research*, 2018.



SCHWARTZ, O.; ALBERT, M.L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology* 8(7): 491-500. 2010.

SILVA, P.N. *et al.* Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochemical Journal* 398(1): 83-95. 2006.

SIMMONS, M. *et al.* Development and Validation of a Quantitative, One-Step, Multiplex, Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Detection of Dengue and Chikungunya Viruses. *Journal of Clinical Microbiology* 54(7): 1766-1773. 2016.

SJÖBERG, M.; LINDQVIST, B.; GAROFF, H. Activation of the alphavirus spike protein is suppressed by bound E3. *Journal of virology* 85(11): 5644-5650.2011.

SKOGING, U.; LILJESTRÖM, P. Role of the C-terminal tryptophan residue for the structure-function of the alphavirus capsid protein. *Journal of molecular biology* 279(4): 865-872. 1998.

SMITH, C.C. The herpes simplex virus type 2 protein ICP10PK: a master of versatility. *Front Biosci* 10: 2820-2831. 2005.

SMITH, G. L.; VANDERPLASSCHEN, A.; LAW, M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus *Journal of General Virology*, 2002. .

SOURISSEAU, M. *et al.* Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLOS Pathogens*, v. 3, n. 6, p. 1–14, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030089>>.

SREEKANTH, G.P. *et al.* SB203580 Modulates p38 MAPK Signaling and Dengue Virus-Induced Liver Injury by Reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2

Phosphorylation. PloS one 11(2): e0149486. 2016.

STAPLEFORD, K. A. *et al.* Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2016.

STAPLES, J.E.; FISCHER, M. Chikungunya virus in the Americas—what a vectorborne pathogen can do. New England Journal of Medicine 371(10): 887-889. 2014.

STRAUSS, E.G. *et al.* Identification of the active site residues in the nsP2 proteinase of Sindbis virus. Virology 191(2): 932-940. 1992.

STRONG, J.E. *et al.* Stimulation of Ebola virus production from persistent infection through activation of the Ras/MAPK pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences 105(46): 17982-17987. 2008.

TANG, B.L. The cell biology of Chikungunya virus infection. Cellular microbiology 14(9): 1354-1363. 2012.

TEIXEIRA, M.G. *et al.* East/Central/South african genotype chikungunya virus, Brazil, 2014. Emerging infectious diseases 21(5): 906. 2015.

TEO, T.-H. *et al.* Caribbean and La Réunion Chikungunya Virus Isolates Differ in Their Capacity To Induce Proinflammatory Th1 and NK Cell Responses and Acute Joint Pathology. Journal of Virology, 2015.

THIBERVILLE, S.-D. *et al.* Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. Antiviral research 99(3): 345-370. 2013.

TOMAR, S. *et al.* Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *Journal of virology* 80(20): 9962-9969. 2006.

TORRES, N.I.; CASTILLA, V.; WACHSMAN, M. DHEA inhibits measles virus through a mechanism independent of its ability to modulate the Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Future Virology* 7(11): 1115-1125. 2012.

TSETSARKIN, K.A.; WEAVER, S.C. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by chikungunya virus and its epidemic emergence. *PLoS Pathog* 7(12): e1002412. 2011.

TUITTILA, M.; HINKKANEN, A.E. Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence. *Journal of general virology* 84(6): 1525-1533. 2003.

VANEY, M.-C.; DUQUERROY, S.; REY, F.A. Alphavirus structure: activation for entry at the target cell surface. *Current opinion in virology* 3(2): 151-158. 2013.

VARGHESE, F. S. *et al.* Discovery of berberine, abamectin and ivermectin as antivirals against chikungunya and other alphaviruses. *Antiviral Research*, 2016.

VASILJEVA, L. *et al.* Identification of a Novel Function of the Alphavirus Capping Apparatus RNA 5'-TRIPHOSPHATASE ACTIVITY OF Nsp2. *Journal of Biological Chemistry* 275(23): 17281-17287. 2000.

VIJAYAKUMAR, K. *et al.* Economic impact of chikungunya epidemic: out-of-pocket health expenditures during the 2007 outbreak in Kerala, India. *South-east Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health* 44(1): 54-61. 2013.

WANG, Y.; SAWICKI, S.G.; SAWICKI, D.L. Sindbis virus nsP1 functions in negative-strand RNA synthesis. *Journal of virology* 65(2): 985-988. 1991.

WEARING, H.J.; ROBERT, M.A.; CHRISTOFFERSON, R.C. Dengue and chikungunya: modelling the expansion of mosquito-borne viruses into naïve populations. *Parasitology* 143(7): 860. 2016.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. *New England Journal of Medicine*, 2015.

WEAVER, S.C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. *Trends in microbiology* 21(8): 360-363. 2013.

WEAVER, S.C.; FORRESTER, N.L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral research* 120: 32-39. 2015.

WEAVER. Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis* 8(6): e2921. 2014.

WENGLER, G. *et al.* Entry of alphaviruses at the plasma membrane converts the viral surface proteins into an ion-permeable pore that can be detected by electrophysiological analyses of whole-cell membrane currents. *Journal of general virology* 84(1): 173-181. 2003.

WHO, W.H.O. Chikungunya. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>>, Acesso em: 8 abril 2016 2016.

WILSON, M.E.; SCHLAGENHAUF, P. Aedes and the triple threat of DENV,

CHIKV, ZIKV–Arboviral risks and prevention at the 2016 Rio Olympic games. *Travel medicine and infectious disease* 14(1): 1-4. 2016.

WU, P.-K.; PARK, J.-I. (2015). MEK1/2 inhibitors: molecular activity and resistance mechanisms. *Seminars in oncology*, Elsevier.

YANG, T.-C. *et al.* Japanese encephalitis virus down-regulates thioredoxin and induces ROS-mediated ASK1-ERK/p38 MAPK activation in human promonocyte cells. *Microbes and Infection* 12(8): 643-651. 2010.

ZASSADOWSKI, F. *et al.* Regulation of the transcriptional activity of nuclear receptors by the MEK/ERK1/2 pathway. *Cellular signalling* 24(12): 2369-2377. 2012.

ZHAO, L.-J. *et al.* Interaction of L-SIGN with Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 Up-Regulates Raf–MEK–ERK Pathway. *Cell biochemistry and biophysics* 66(3): 589-597. 2013.

## RELAÇÃO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E DE OUTRAS ATIVIDADES

### Artigos publicados

**1 Coautoria:** Jônatas S Abrahão; Lívia Sacchetto; Izabela M Rezende; Rodrigo Rodrigues, Ana Paula C Crispim; César Moura; Diogo C Mendonça; Erik Reis; Fernanda Souza; Gabriela Fernanda G Oliveira; Iago Domingos; Paulo Victor M Boratto; Pedro Henrique B Silva; Victoria F Queiroz; Talita B Machado; Luis Adan F Andrade; Karine L Lourenço; Thais Silva; Grazielle P Oliveira; Viviane S Alves; Pedro A Alves; Erna G Kroon; Giliane S Trindade; Betania P Drumond. Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil. Journal: Science of the Total Environment. v. 756, p. 142645, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142645> (Anexo 1)

**2 Coautoria:** de Souza, Gabriel Augusto Pires; Queiroz, Victória Fulgêncio; Lima, Maurício Teixeira; **Reis, Erik Vinicius de Sousa**; Coelho, Luiz Felipe Leomil; Abrahão, Jônatas Santos. Virus goes viral: an educational kit for virology classes. Virology Journal, v. 17, p. 13, 2020. doi: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-1291-9> (Anexo 2)

**3 Coautoria:** Souza, Fernanda; Rodrigues, Rodrigo; **Reis, Erik**; Lima, Maurício; La Scola, Bernard; Abrahão, Jônatas. In-depth analysis of the replication cycle of Orpheovirus. Virology Journal, v. 16, p. 158, 2019. doi: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1268-8> (Anexo 3)

### Artigos submetidos para publicação

1 Hugo José Valencia Rivero; Mara Camila Arantes Marques de Aguiar; Mariana Araujo Costa; Diogo Correia Mendonça; **Erik Vinicius Reis**; Nidia Esther Colquehuanca Arias; Betânia Paiva Drumond; Claudio Antonio Bonjardim. Antiviral effect of the small molecule trametinib (mekinist) against

zika, dengue and yellow fever vírus. Journal: Archives of Virology

**2** Diogo Mendonça; Leonardo de Oliveira; Hugo Valencia, **Erik Reis**; Claudio Bonjardim. Analysis of co-infection of dengue virus serotypes and zika virus: replication efficiency and viral interference. Journal: Journal of Virological Methods.

### **Formação complementar**

**1** 2020-2020 Writing in the Sciences (online course). Stanford University, Stanford, USA.

**2** 2020-2020 Fundamentals of Graphic Design (online course) (32 hours). California Institute of the Arts/Coursera, USA

**3** 2019-2019 Training in the Use and Management of Laboratory Animals (online course) (60 hours). Universidade de São Paulo, USP/REBIOTERIO - CNPq, São Paulo, BRA.

**4** 2019-2019 Training In Confocal Microscopy using Zeiss Software (4 hours). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

**5** 2018-2018 Animal Experimentation - The Mouse As A Model (45 hours). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

### **Rervisor de pródigo**

**1** New Microbes and New Infections

**2** Journal of Medical Virology

### 3 Brazilian Journal of Microbiology

#### **Organização de Eventos**

1 XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia - XII Encontro de Virologia do Mercosul. UFMG, BH, MG, BR. 2017.

2 II encontro científico do Laboratório de Vírus, comemoração de 55 anos. BH-MG, 2017.

3 IV Simpósio de Microbiologia da UFMG. UFMG, BH, MG, BR. 2017.

#### **Atividades de extensão**

1 Investigação do RNA do SARS-CoV-2 em superfícies de áreas públicas de Belo Horizonte, com parceria da Prefeitura de Belo Horizonte, durante a pandemia da COVID-19. Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia/ICB, UFMG, BR. Coordenadores: Jonatas Abrahão, Betânia Drumond, Giliane Trindade. 2020.

2 Diagnóstico molecular do SARS-CoV-2 em amostras de pacientes para auxiliar a Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais durante a pandemia da COVID-19. Coordenadores: Jonatas Abrahão, Betânia Drumond, Giliane Trindade. Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia/ICB, UFMG, BR. 2020.

#### **Mesa Redonda**

VIII Curso de Férias do PPGBIOCEL. COVID - 19: Do vírus a pandemia, o que sabemos? Coronavírus - conceitos da infecção à transmissão. 2020. (Curso de Férias).



## **Palestras**

1 7/7 da Biomedicina. RT- PCR: A Técnica Padrão Ouro para Covid-19. 2020. (Encontro)

2 I Simpósio de Conhecimento Científico no Âmbito da Saúde.SARS-CoV-2: entendendo o comportamento do vírus. 2020. (Simpósio).

## **Coorientações:**

*Iniciação científica:* Beatriz Marques Damas. Avaliação de inibidores farmacológicos contra o chikungunya vírus em modelos murinos, em Minas Gerais. Início: fevereiro/2019. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Universidade Federal de Minas Gerais.

## **Apresentação de Trabalhos**

1 XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA, XII ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL. ANALYSIS OF MAPK MEK/ERK SIGNALING PAHTWAY INHIBITORS AS ANTIVIRAL CANDIDATES AGAINST CHIKUNGUNYA VIRUS. 2017. (Pôster)

2 VI simpósio de microbiologia da UFMG: microbiologia interligada. AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE DE INIBIDOR FARMACOLÓGICO DA VIA DE MEK/ERK NA INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA VIRUS. 2019. (Pôster).

## **Eventos**

1 XXVIII congresso brasileiro de virologia, XII encontro de virologia do mercosul, BH-MG, 2017

**2** II encontro científico do Laboratório de Vírus, comemoração de 55 anos. BH-MG, 2017

**3** VI simpósio de microbiologia da UFMG, BH-MG, 2019

# APÊNDICE

**A) ENSAIOS BIOLÓGICOS DE PADRONIZAÇÃO**

**B) ENSAIOS MOLECULARES DE CARACTERIZAÇÃO**

## A) ENSAIOS BIOLÓGICOS DE PADRONIZAÇÃO

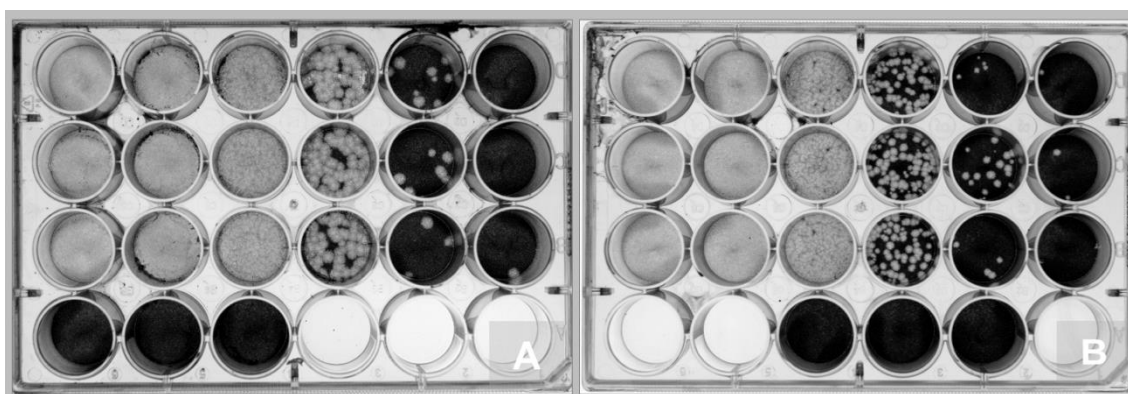
Como passos iniciais, uma padronização das técnicas foi realizada junto com o ensaio molecular para confirmação do genoma viral, sendo realizado para garantir que o PT estivesse em condições de experimentação (Apêndice). Após os testes, ensaios biológicos com Trametinibe foram realizados para avaliar o desempenho do inibidor frente à infecção pelo CHIKV.

### A1) Padronização da titulação viral

Para o início dos experimentos com CHIKV foi primeiro realizada a padronização da quantificação de partículas infecciosas virais. Para essa quantificação foi adotado o método de ensaio de placa. As células escolhidas para esse teste, foram as células Vero que são células reconhecidamente permissivas a uma ampla gama de vírus. A princípio, as condições testadas para esse ensaio foram baseadas na titulação já realizada para outros arbovírus. Então, condições foram testadas com CMC 1,5% e infecção por 4 d após a visualização de ECP. As placas formadas foram grandes, maiores que as placas formadas pelos DENV em células Vero. Isso dificultou a contagem das mesmas para o resultado da titulação. A partir daí foram alterados os parâmetros visando aprimorar esse teste. Três dias de incubação e CMC 1% foram testados em placas de 24 e 6 poços. Nessas condições as placas formadas ainda estavam grandes, apesar de algumas poderem ser contabilizadas (**Figura 40A**) Para padronização final foram testadas as condições: CMC 1% e dois dias de incubação do vírus antes da fixação. Como resultado, o tamanho das placas diminuiu, permitindo a contagem de placas isoladas mais facilmente. Além disso, o tempo de incubação mais curto permitiu que a quantificação fosse realizada em menos tempo, otimizando o resultado final dos experimentos antecedentes à titulação (**Figura 40B**). Outras condições também foram testadas (dados não mostrados). Por fim, foi decidido trabalhar com placas de 24 poços utilizando CMC 1% com a infecção em 2 d. Isso possibilitou a economia de materiais e aumento da capacidade de titulação de muitas amostras.

Outras abordagens são encontradas na literatura. Algumas dessas compreendem: titulação por TCID<sub>50</sub> em Vero com tempo de incubação de 5 d (SOURISSEAU *et al.*, 2007) e BHK-21 com 4-5 d de incubação (HO *et al.*, 2018). Também é realizada titulação utilizando células BHK-21 em meio RPMI-1640 com incubação por 3 d por ensaio de placa em placas de 24 poços (KAUR; LEE; CHU,

2016). Alguns autores utilizam uma variação do uso do CMC para celulose microcristalina e CMC-sódio para o ensaio de titulação viral (BAER; KEHN-HALL, 2014; RIEMERSMA *et al.*, 2018). Para ensaios de inibição do CHIKV são realizados testes com titulação por ensaio de placa e ensaio de TCID<sub>50</sub> (OO *et al.*, 2018). Em alguns casos o tempo de incubação é de 3 d para células Vero em placas de 24 poços (SAHA *et al.*, 2016; FEIBELMAN *et al.*, 2018). Apesar de existirem técnicas com 2 d de incubação para titulação (HO *et al.*, 2015), elas são feitas com células BHK-21. Ou seja, o protocolo desenvolvido se mostrou rápido na detecção das placas otimizando o tempo de trabalho para a titulação do CHIKV utilizando células Vero que são pouco fastidiosas.



**Figura 40 – Titulação por ensaio de placa para o chikungunya vírus (CHIKV) em células Vero.**

Placas de 24 poços com monocamada de células Vero infectadas com CHIKV incubadas com CMC 1%. A) Placas em condições de três dias de incubação e B) placas em condições de dois dias de incubação.

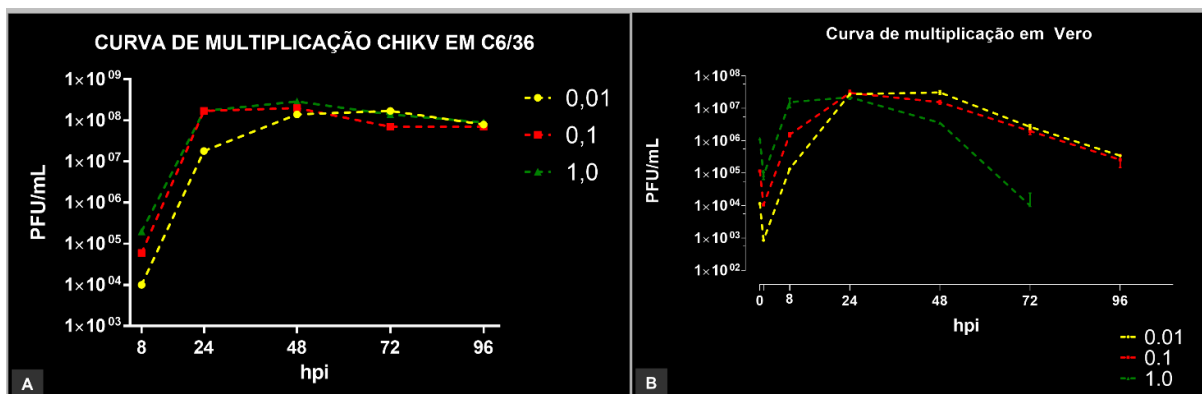
A2) Curva de multiplicação em células C6/36, Vero e produção do pool trabalho de chikungunya vírus.

Após a padronização da titulação viral e confirmação da célula Vero como uma célula permissiva ao CHIKV, foi realizada a produção das curvas de multiplicação e a produção do PT do vírus. A partir do PS foi realizada uma curva de multiplicação em células C6/36. A avaliação do desempenho do vírus nessa célula foi necessária para se definir o tempo de multiplicação do vírus e suas fases do crescimento: fase exponencial, estacionária e declínio. Três MOIs foram utilizadas para este ensaio (0,01, 0,1 e 1,0). Como resultado, o vírus demonstrou multiplicação rápida se comparado com outros arbovírus e vírus de RNA. A fase exponencial aumenta

rapidamente para as três MOIs atingindo pico em 48 hpi (0,01) e 24 hpi (0,1 e 1,0). Nos tempos analisados não foi possível observar a fase de declínio, mostrando estabilidade na produção de partículas até 96 hpi em células de invertebrado C6/36 (**Figura 41A**). O tempo de 96 hpi (4 dias) foi escolhido arbitrariamente dentro dos tempos presentes durante o platô para a produção do PT. A produção desse PT foi feita com as mesmas células utilizando a MOI 0,01, a qual minimizaria a produção de partículas defectivas do vírus, obtendo-se o título no PT de  $7 \times 10^7$  PFU/mL.

Após verificar que o CHIKV infecta às células Vero durante a padronização da titulação, o crescimento do vírus foi avaliado nessas células. O objetivo desse experimento foi avaliar as fases exponenciais da multiplicação do CHIKV em células de vertebrados, sendo que quatro MOIs foram testadas. Foram realizadas três curvas (duas delas são apresentadas) para que o desempenho do CHIKV fosse avaliado. A multiplicação viral em células Vero demonstrou comportamento semelhante em alguns pontos ao observado nas células de mosquito. Como esperado, a duração da fase exponencial foi diferente para cada MOI, quanto maior a MOI menor a fase exponencial. A multiplicação atingiu o pico para todas as MOIs em 24 hpi. A fase de declínio ocorreu a partir das 48 hpi para todas as MOIs (**Figura 41B**). A MOI 0,1 (**Figura 41B**) foi a MOI selecionada para a maior parte dos experimentos subsequentes, pois ela apresenta a maior faixa de crescimento exponencial, nos possibilitando analisar o efeito dos IFs durante diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral. Essa baixa MOI ainda permite uma possível vantagem em ensaios como de imunofluorescência, em que a visualização do resultado poderia ser dificultada por uma grande produção de partículas virais.

As curvas de multiplicação apresentaram o mesmo comportamento descrito para o CHIKV de acordo com a literatura (TEO *et al.*, 2015; STAPLEFORD *et al.*, 2016; GÖERTZ *et al.*, 2017). Houve variação da curva de multiplicação do CHIKV realizada em Vero, mas essa variação foi devido a alteração dos parâmetros de infecção. Como na curva descrita por Higashi *et al.* (1967) em que o pico é atingido às 12 hpi e dura até às 16 hpi, tempo no qual é iniciada a fase de declínio. Porém é utilizado um inóculo de  $10^8$  TCID<sub>50</sub> para  $3 \times 10^6$  células, o que gera quase uma MOI de 100.



**Figura 41 – Curva de multiplicação do CHIKV em células C6/36 e Vero.**

A) Células C6/36 infectadas com três multiplicidades de infecção (MOI): 0,01 (linha amarela), 0,1 (linha vermelha) e 1,0 (linha verde). Os tempos testados foram de 8, 24, 48, 72 e 96 horas pós-infecção (hpi). B) Células Vero infectadas com três MOI: 0,01 (linha amarela), 0,1 (linha vermelha) e 1,0 (linha verde). Os tempos testados foram de 8, 24, 48, 72 e 96 hpi.

### A3) Teste de termolabilidade

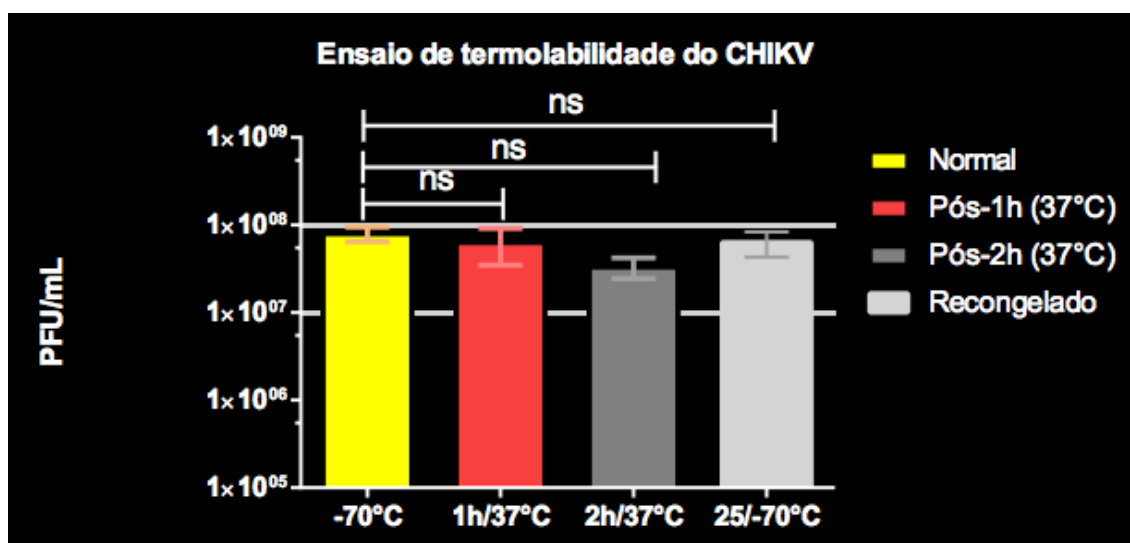
De acordo com alguns autores a partícula viral do CHIKV é bastante estável em condições de temperatura até 58°C (KHAN *et al.*, 2002; PIALOUX *et al.*, 2007). Foi testada a resistência do vírus com o objetivo metodológico de excluir a etapa na qual há a utilização de gelo durante a titulação viral. Esse ensaio foi nomeado de ensaio de termolabilidade no qual foi testada essa resistência à certas variações de temperatura dependente do tempo de exposição. Quatro condições foram avaliadas (**Figura 42**):

- 1) alíquota normal, retirada do ultrafreezer -70°C;
- 2) Mesma alíquota (1) foi incubada por 1 h na estufa a 37°C;
- 3) Mesma alíquota (1) foi incubada por mais 1 h a 37°C e
- 4) Outra alíquota retirada do congelador, descongelada e recongelada.

Na condição 1, a média do título observada foi de  $8 \times 10^7$  PFU/mL. Com o vírus após 1 h a 37°C, obteve-se o título de  $6 \times 10^7$  demonstrando sua resistência nesta condição. Após 2 h a 37°C, o título decaiu a  $3,3 \times 10^7$ , ou seja, apenas meia unidade logarítmica. E a amostra na qual foi recongelada o título foi de  $6,3 \times 10^7$ , sem nenhuma perda significativa do título viral.

Um trabalho descreve a resistência do vírus com incubação por 5 min até temperaturas até 70 °C sem inativação total do vírus nesse tempo (FRANZ *et al.*, 2018). Já outro demonstra que o método padrão de inativação do soro por calor à 56

°C só é suficiente para inativar as partículas infecciosas do CHIKV depois de 160 min (HUANG *et al.*, 2015). Em outro trabalho é verificada a resistência do vírus de forma liofilizada e com a presença de formulações estabilizantes. Uma dessas formulações contem SFB 25% (PASTORINO *et al.*, 2015). Com base nos trabalhos verificados a resistência do CHIKV é interessantemente maior que boa parte dos vírus de RNA de interesse humano o que pode aumentar a duração das partículas virais à intempéries do corpo, como febre.



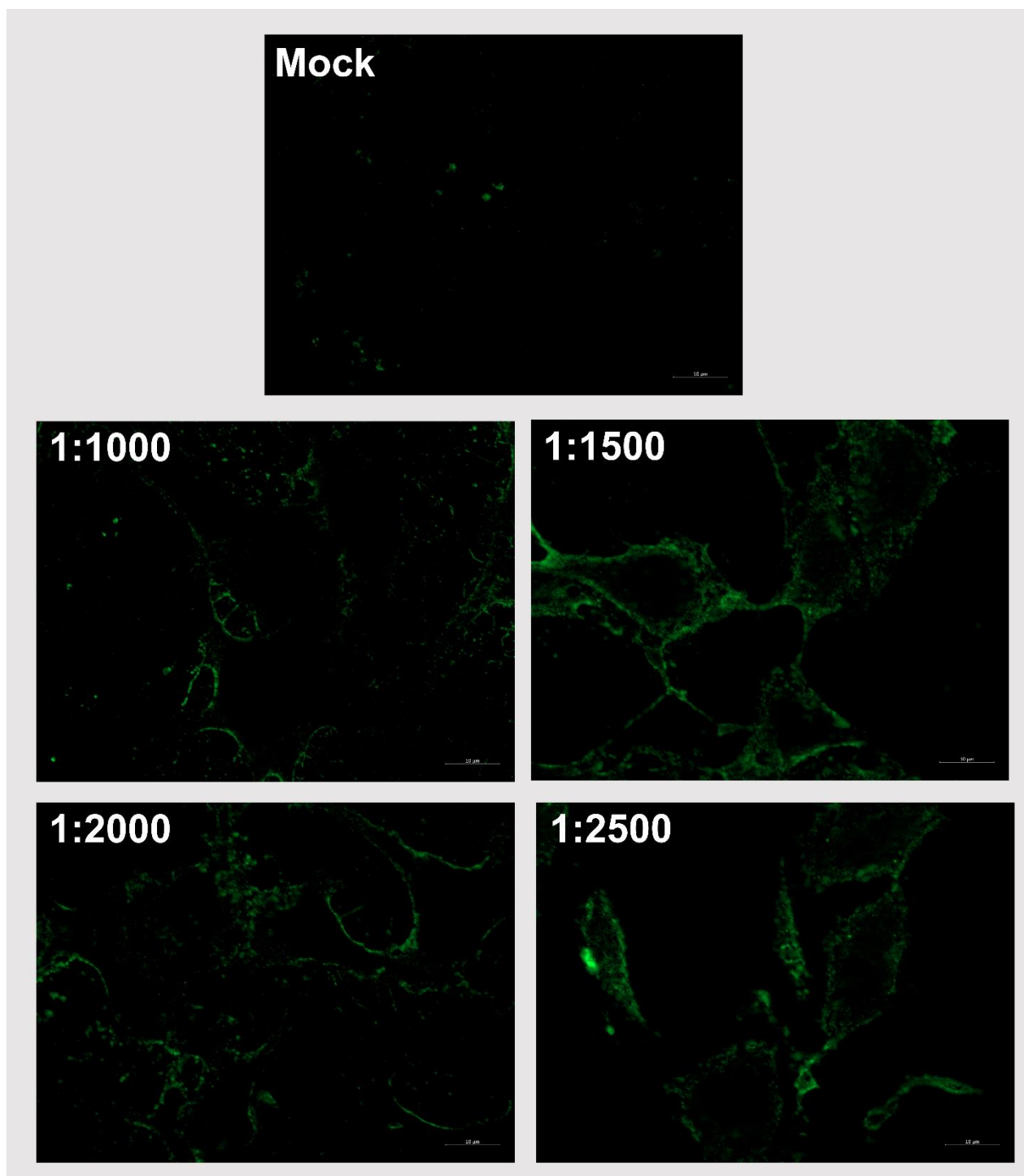
**Figura 42 – Ensaio de termolabilidade do CHIKV.**

Alíquotas do *pool* trabalho (PT) do CHIKV foram tituladas após terem passado por variações de temperatura. Em amarelo, alíquota descongelada do ultrafreezer -70 °C e titulada. Em vermelho, essa mesma alíquota foi deixada a 37 °C em estufa por 1 h e depois titulada. Em cinza escuro, essa mesma alíquota foi deixada por mais 1 h e depois titulada. Em cinza claro, uma alíquota foi descongelada por 25 min e recongelada em freezer -70 °C e depois foi descongelada novamente e titulada.

#### A4) Produção de anticorpos primários policlonais em camundongos

Primeiro a produção dos anticorpos primários anti-CHIKV foi realizada por nós, no biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG (item 4.7.1). O passo seguinte foi padronizar a diluição desses anticorpos, realizando um teste inicial com diluições de: 1:1000; 1:1500; 1:2000 e 1:2500 (**Figura 43**). Como resultado, não houve diferença visível entre as diluições utilizadas, o que permitiu a utilização de qualquer uma das diluições testadas.



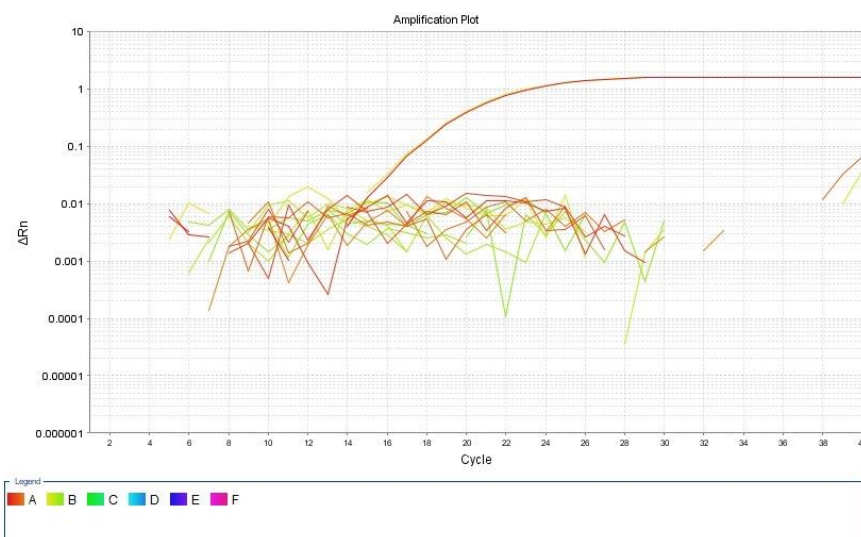


**Figura 43 – Teste de diluição do anticorpo primário anti-chikungunya vírus (anti-CHIKV).**

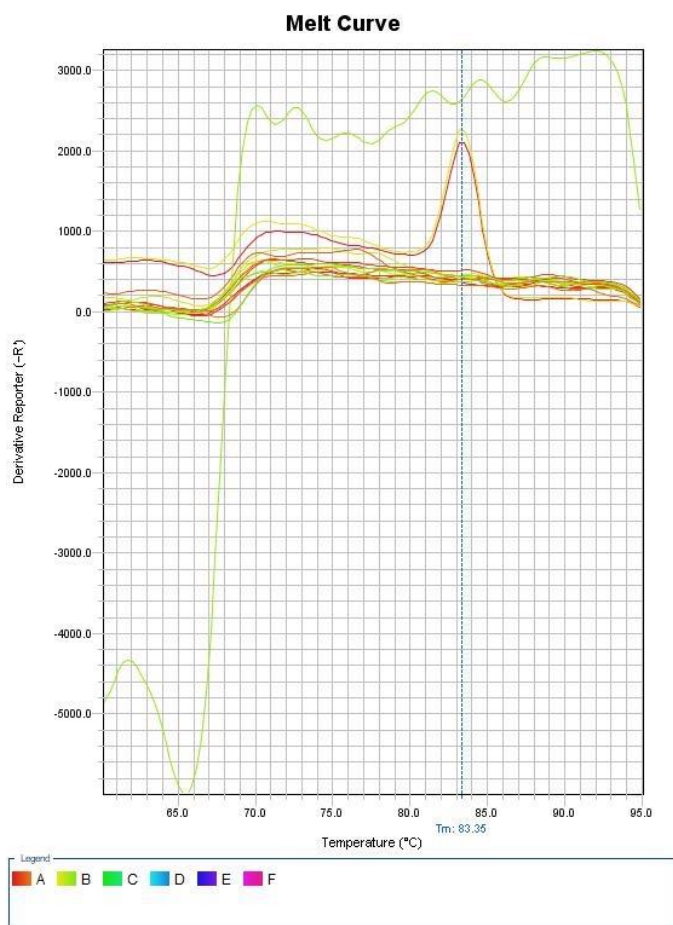
Células Vero foram infectadas com CHIKV à multiplicidade de infecção 0,1 por 24 horas pós-infecção (hpi) e preparadas para ensaio de imunofluorescência. O anticorpo primário anti-CHIKV foi produzido em camundongos convencionais e testado diluído em PBS/albumina sérica bovina (BSA) 1%, diluído: 1:1000; 1:1500; 1:2000 e 1:2500. Células mock infectadas não foram infectadas com CHIKV e obtiveram as mesmas condições das demais células.

## B) ENSAIOS MOLECULARES DE CARACTERIZAÇÃO

A - Teste de contaminação para o Pool Trabalho de CHIKV. Feito para ZIKV, DENV-1 ao 4, YFV e MAYV.

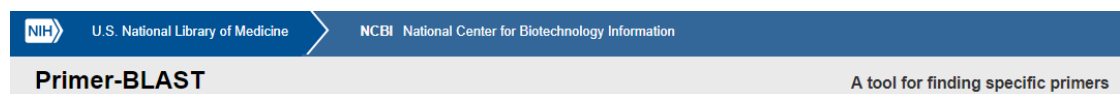
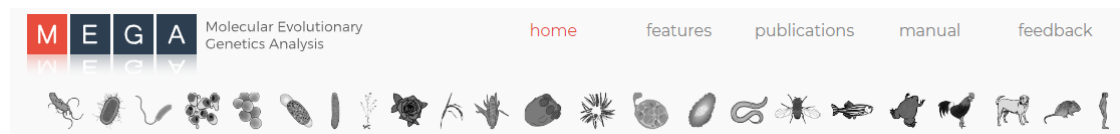


*Amplificação somente do pool trabalho (PT).*



*Somente o pool trabalho (PT) apresentou  $T_m$  83,35°C*

## B - Construção e teste dos primers



[GET HELP](#) [SIGN IN](#)

0 ITEMS \$0.00

PRODUCTS & SERVICES ▾ SUPPORT & EDUCATION ▾ TOOLS ▾ COMPANY ▾

### OligoAnalyzer

Sequence 5' MOD ▾ INTERNAL ▾ 3' MOD ▾ MIXED BASES ▾

Bases 0 CLEAR SEQUENCE

Try the new batch mode here

**Parameter sets**

SpecSheet (Default) ▾

Target type: DNA ▾

Oligo Conc: 0.25  $\mu$ M

Na<sup>+</sup> Conc: 50 mM

Mg<sup>2+</sup> Conc: 0 mM

dNTPs Conc: 0 mM

[Instructions](#) | [Definitions](#) | [Feedback](#)

- ANALYZE
- HAIRPIN
- SELF-DIMER
- HETERO-DIMER
- NCBI BLAST
- TM MISMATCH
- ADD TO ORDER

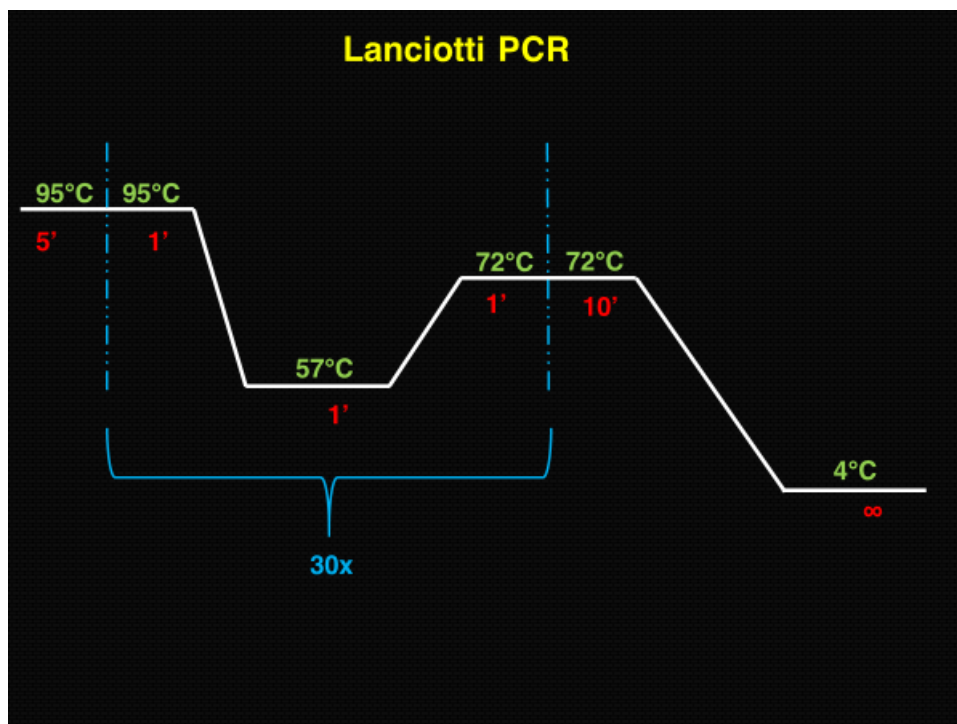
*Programas utilizados para a construção dos iniciadores.*

**Primer pair 4**

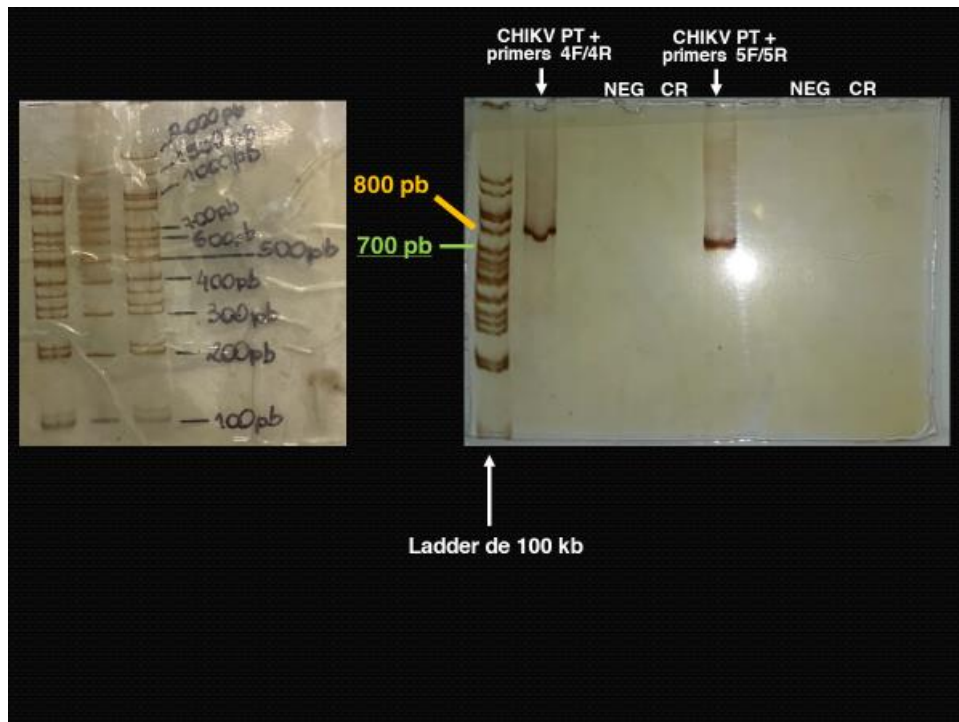
	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AGCACATGTGGAGAAGTCCG	Plus	20	415	434	60.04	55.00	8.00	2.00
Reverse primer	TATGTGGCTCTCGGAGGGT	Minus	20	1255	1236	59.96	55.00	6.00	3.00
Product length	841								

**Primer pair 5**

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	AAAACCGTCATCCCGTCTCC	Plus	20	254	273	60.04	55.00	3.00	0.00
Reverse primer	GACGACCCTAGTAAAGCCG	Minus	20	968	949	59.90	60.00	4.00	3.00
Product length	715								

*Iniciadores selecionados*

*PCR utilizada para avaliar o funcionamento dos iniciadores*



Eletroforese em que o produto da PCR gera bandas respectivas ao tamanho esperado do produto dos iniciadores 4 e 5.

# **ANEXOS**

## Anexo 1

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142645>

## ARTICLE IN PRESS

STOTEN-142645; No of Pages 6

Science of the Total Environment xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)

## Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil: A potential tool for monitoring the circulation of infected patients

Jônatas Santos Abrahão <sup>a,\*</sup>, Lívia Sacchetto <sup>a</sup>, Izabela Maurício Rezende <sup>a</sup>, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues <sup>a,b,\*,\*\*</sup>, Ana Paula Correia Crispim <sup>a</sup>, César Moura <sup>a</sup>, Diogo Correa Mendonça <sup>a</sup>, Erik Reis <sup>a</sup>, Fernanda Souza <sup>a</sup>, Gabriela Fernanda Garcia Oliveira <sup>a</sup>, Iago Domingos <sup>a</sup>, Paulo Victor de Miranda Boratto <sup>a</sup>, Pedro Henrique Bastos Silva <sup>a</sup>, Victoria Fulgêncio Queiroz <sup>a</sup>, Talita Bastos Machado <sup>a</sup>, Luis Adan Flores Andrade <sup>a</sup>, Karine Lima Lourenço <sup>a</sup>, Thaís Silva <sup>c</sup>, Grazielle Pereira Oliveira <sup>a</sup>, Viviane de Souza Alves <sup>a</sup>, Pedro Augusto Alves <sup>c</sup>, Erna Geessien Kroon <sup>a</sup>, Giliane de Souza Trindade <sup>a</sup>, Betânia Paiva Drumond <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> René Rachou Institute – FIOCRUZ, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## HIGHLIGHTS

- COVID-19 has caused over 4.4 million cases in Brazil by the end of September 2020.
- The presence of SARS-CoV-2 in public surfaces can result in new infections.
- RT-qPCR was used for assessing the presence of viral genome in the environment.
- SARS-CoV-2 was detected especially in surfaces near hospitals and public squares.
- Constant surveillance of the virus in the environment is essential for disease control.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 July 2020

Received in revised form 22 September 2020

Accepted 23 September 2020

Available online xxxxx

Editor: Jay Gan

## Keywords:

COVID-19

Coronavirus

Genome detection

Environment surveillance

## ABSTRACT

The world is experiencing the worst global health crisis in recent decades since December/2019 due to a new pandemic coronavirus. The COVID-19 disease, caused by SARS-CoV-2, has resulted in more than 30 million cases and 950 thousand deaths worldwide as of September 21, 2020. Determining the extent of the virus on public surfaces is critical for understanding the potential risk of infection in these areas. In this study, we investigated the presence of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area in Brazil. Forty-nine of 933 samples tested positive (5.25%) for SARS-CoV-2 RNA, including samples collected from distinct material surfaces, including metal and concrete, and distinct places, mainly around hospital care units and public squares. Our data indicated the contamination of public surfaces by SARS-CoV-2, suggesting the circulation of infected patients and the risk of infection for the population. Constant monitoring of the virus in urban areas is required as a strategy to fight the pandemic and prevent further infections.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

\* Corresponding author.

\*\* Correspondence to: R.A.L. Rodrigues, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

E-mail addresses: [jonatas.abraha@gmail.com](mailto:jonatas.abraha@gmail.com), [jsa@icb.ufmg.br](mailto:jsa@icb.ufmg.br) (J.S. Abrahão), [rodriguesra07@gmail.com](mailto:rodriguesra07@gmail.com) (R.A.L. Rodrigues).<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142645>

0048-9697/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article as: J.S. Abrahão, L. Sacchetto, I.M. Rezende, et al., Detection of SARS-CoV-2 RNA on public surfaces in a densely populated urban area of Brazil: A potent..., Science of the Total Environment, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142645>



## Anexo 2

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-1291-9>Souza et al. *Virology Journal* (2020) 17:13  
<https://doi.org/10.1186/s12985-020-1291-9>

Virology Journal

## RESEARCH

## Open Access

## Virus goes viral: an educational kit for virology classes

Gabriel Augusto Pires de Souza<sup>1†</sup>, Victória Fulgêncio Queiroz<sup>1†</sup>, Maurício Teixeira Lima<sup>1†</sup>, Erik Vinicius de Sousa Reis<sup>1</sup>, Luiz Felipe Leomil Coelho<sup>2</sup> and Jônatas Santos Abrahão<sup>1\*</sup> **Abstract**

**Background:** Viruses are the most numerous entities on Earth and have also been central to many episodes in the history of humankind. As the study of viruses progresses further and further, there are several limitations in transferring this knowledge to undergraduate and high school students. This deficiency is due to the difficulty in designing hands-on lessons that allow students to better absorb content, given limited financial resources and facilities, as well as the difficulty of exploiting viral particles, due to their small dimensions. The development of tools for teaching virology is important to encourage educators to expand on the covered topics and connect them to recent findings. Discoveries, such as giant DNA viruses, have provided an opportunity to explore aspects of viral particles in ways never seen before. Coupling these novel findings with techniques already explored by classical virology, including visualization of cytopathic effects on permissive cells, may represent a new way for teaching virology. This work aimed to develop a slide microscope kit that explores giant virus particles and some aspects of animal virus interaction with cell lines, with the goal of providing an innovative approach to virology teaching.

**Methods:** Slides were produced by staining, with crystal violet, purified giant viruses and BSC-40 and Vero cells infected with viruses of the genera *Orthopoxvirus*, *Flavivirus*, and *Alphavirus*. Slides with amoebae infected with different species of giant viruses and stained with hemacolor reagents were also produced.

**Results:** Staining of the giant viruses allowed better visualization of the viral particles, and this technique highlights the diversity in morphology and sizes among them. Hemacolor staining enabled visualization of viral factories in amoebae, and the staining of infected BSC-40 and Vero cell monolayers with crystal violet highlights plaque-forming units.

**Conclusions:** This kit was used in practical virology classes for the Biological Sciences course (UFMG, Brazil), and it will soon be made available at a low-cost for elementary school teachers in institutions that have microscopes. We hope this tool will foster an inspiring learning environment.

**Keywords:** Virology, Virology education, Microbiology education, biology education, Didactic material, Giant viruses, Mimivirus, Poxvirus, Flavivirus, Alphavirus

\* Correspondence: [jonatas.abraha@gmail.com](mailto:jonatas.abraha@gmail.com)

†Gabriel Augusto Pires de Souza, Victória Fulgêncio Queiroz and Maurício Teixeira Lima contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Anexo 3

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1268-8>Souza et al. *Virology Journal* (2019) 16:158  
<https://doi.org/10.1186/s12985-019-1268-8>

Virology Journal

## RESEARCH

## Open Access

## In-depth analysis of the replication cycle of Orpheovirus

Fernanda Souza<sup>1</sup>, Rodrigo Rodrigues<sup>1</sup>, Erik Reis<sup>1</sup>, Maurício Lima<sup>1</sup>, Bernard La Scola<sup>2,3</sup> and Jônatas Abrahão<sup>1\*</sup>**Abstract**

**Background:** After the isolation of *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), the study and search for new giant viruses has been intensified. Most giant viruses are associated with free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba*; however other giant viruses have been isolated in *Vermamoeba vermiformis*, such as Faustovirus, Kaumobavirus and Orpheovirus. These studies have considerably expanded our knowledge about the diversity, structure, genomics, and evolution of giant viruses. Until now, there has been only one Orpheovirus isolate, and many aspects of its life cycle remain to be elucidated.

**Methods:** In this study, we performed an in-depth characterization of the replication cycle and particles of Orpheovirus by transmission and scanning electron microscopy, optical microscopy and IF assays.

**Results:** We observed, through optical and IF microscopy, morphological changes in *V. vermiformis* cells during Orpheovirus infection, as well as increased motility at 12 h post infection (h.p.i.). The viral factory formation and viral particle morphogenesis were analysed by transmission electron microscopy, revealing mitochondria and membrane recruitment into and around the electron-lucent viral factories. Membrane traffic inhibitor (Brefeldin A) negatively impacted particle morphogenesis. The first structure observed during particle morphogenesis was crescent-shaped bodies, which extend and are filled by the internal content until the formation of multi-layered mature particles. We also observed the formation of defective particles with different shapes and sizes. Virological assays revealed that viruses are released from the host by exocytosis at 12 h.p.i., which is associated with an increase of particle counts in the supernatant.

**Conclusions:** The results presented here contribute to a better understanding of the biology, structures and important steps in the replication cycle of Orpheovirus.

**Keywords:** Orpheovirus, Vermamoeba, Giant viruses, Replication cycle

**Background**

Giant viruses belong to a complex group of viruses commonly referred to as nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDVs). The group gained notoriety after the isolation of *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV), which has large particles (~ 750 nm) capable of infecting amoebae of the genus *Acanthamoeba* [1]. The study and search for new giant viruses has been intensified, and these viruses were uncovered in different samples and environments, considerably expanding our knowledge about their diversity and ubiquity [2, 3]. Most

giant viruses such as Mimivirus, Marseillevirus, Pandoravirus and Cedratvirus are associated with free-living amoebae of the genus *Acanthamoeba*; however, other giant viruses have been isolated in *Vermamoeba vermiformis*, such as Faustovirus and Kaumobavirus [4, 5].

In 2018, a new virus, Orpheovirus IHUMI-LCC2 (hence forward called Orpheovirus), was described that is capable of infecting *V. vermiformis*, which was isolated from rat faecal samples collected in France. These viruses have ovoid-shaped particles, as observed for Cedratvirus, Pandoravirus, and Pithovirus, ranging from 900 to 1100 nm in length and approximately 500 nm in diameter. These viruses are also marked by the presence of a circular double-stranded DNA genome of 1,473,573 bp, encoding 1512 predicted genes of which 57.5% are ORFans [6]. Regarding the predicted

\* Correspondence: [jonatas.abraho@gmail.com](mailto:jonatas.abraho@gmail.com)<sup>1</sup>Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2019 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## Anexo 4

Submetido para publicação

**Archives of Virology**

Official Journal of the Virology Division of the International Union of Microbiological Societies

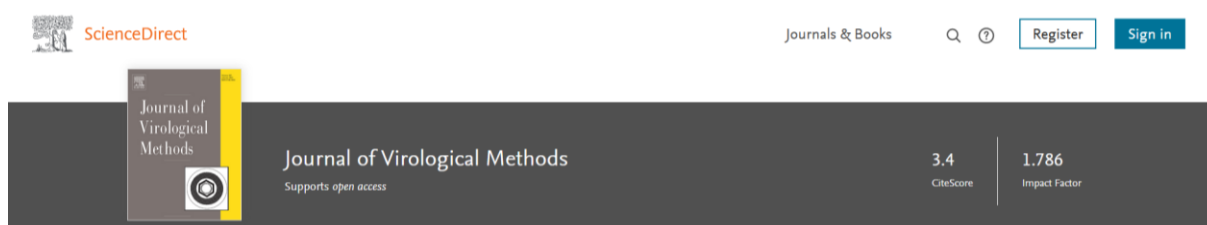
ANTIVIRAL EFFECT OF THE SMALL MOLECULE TRAMETINIB (MEKINIST) AGAINST ZIKA,  
DENGUE AND YELLOW FEVER VIRUS

Hugo J. Valencia<sup>1,2§\*</sup>, Mara C. A. M. de Aguiar<sup>1,2</sup>, Mariana A. Costa<sup>1,2,§</sup>, Diogo C. Mendonça<sup>1,2</sup>, Erik V. Reis<sup>1,2</sup>, Nídia E. C. Arias<sup>1,2</sup>, Betânia P. Drumond<sup>2</sup> and Cláudio A. Bonjardim<sup>1,2</sup>

(1) Grupo de Transdução de Sinal/Flavivírus, (2) Laboratório de Vírus, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

## Anexo 5

Submetido para publicação



ANALYSIS OF CO-INFECTION OF DENGUE VIRUS SEROTYPES AND ZIKA VIRUS: REPLICATION EFFICIENCY AND VIRAL INTERFERENCE.

Diogo Mendonça; Leonardo de Oliveira; Hugo Valencia, Erik Reis; Claudio Bonjardim.

## Anexo 6

Manuscrito em preparação (a tentativa de submissão será feita na revista *Journal of virology*):



**IN-DEPTH MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CHIKUNGUNYA VIRUS LIFE CYCLE.**

Erik V S Reis; Beatriz M Damas; Diogo C Mendonça; Jonatas S Abrahão; Claudio A Bonjardim.

**ABSTRACT**

The chikungunya virus (CHIKV) is an enveloped virus with an RNA positive strand genome, transmitted between sperm vertebrates and arthropod vectors such as *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, comprising three genotypes. CHIKV enters cells through clathrin-dependent endocytosis, denuding the capsid and genome and immediately leading to the translation of the non-structural proteins that form the replication complex termed spherules. Throughout the infection it mounts cytopathic vacuoles, and in the final stage it is released via budding, acquiring the envelope through the plasma membrane. There are many gaps to be explored in the CHIKV life cycle, which can help to clarify events in the biology of the virus and support the development of new antiviral therapies. In this work, we confirmed already described data, and we brought novel details about the CHIKV life cycle stages. Through electron and scanning microscope evidence, immunofluorescent and biological assays, we analyze CHIKV cell infection events. Here, we described an entry process suggestive of macropinocytosis, particles enveloping through intracellular membranes in viral factory, release by exocytosis and protrusions suggestive of actin tails. These findings help to fill some obscurities of the CHIKV life cycle, improving the perception of virus-host interactions and may also help in the establishment of new antiviral targets.



## INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) emergence was reported in 1952 in Tanganyika territory district current Tanzania region, Africa, as the cause of a disease associated with fever and severe joint pain in humans (1, 2). The *Chikungunya virus* species belongs to the realm *Riboviria*, kingdom *Orthornavirae*, phylum *Kitrinoviricota*, class *Alsuviricetes*, order *Martellivirales*, family *Togaviridae* and genus *Alphavirus* according to the international committee on taxonomy of viruses (ICTV) (3). Virion has ~70 nm with an envelope originated from the host cell membrane coating a ~ 40 nm capsid containing an 11.8 kb positive single-strand RNA molecule (4–6).

It has been described that the CHIKV life cycle occurs faster than other RNA arboviruses, and the first virions are formed about 5 hours post-infection in vertebrate cells (7, 8). Virus entry in the host cell is clathrin-mediated (9, 10). At early times of infection, CHIKV induces the formation of vesicular structures, termed spherules, formed by CHIKV replication complex (nonstructural proteins [nsP1-4]) in association with the cell membrane; later in infection, spherules internalizes creating compartments known as cytopathic vacuoles type I (CPV-I) (11). After structural proteins synthesis and assembly in the cytoplasm, immature particles pass through the endoplasmic reticulum-Golgi pathway. Capsid proteins, together with host vesicles, form cytopathic structures, termed cytopathic vacuoles type II (CPV-II) (12). Virions obtain envelopes from the host cell membrane after released by budding (13).

Most studies describe the CHIKV life cycle based on general alphavirus, primarily the genus type species, Sindbis virus (14). However, several characteristics differentiate species between alphavirus: nucleotide/amino acid sequences, disease association, and vector and host association (15). To date, the entire CHIKV life cycle remains unclear. Specifics stages: entry, assembly, maturation, budding process, and, mainly, the final processes of the cycle are incompletely resolved (16, 17). Also, protein receptors, proteins involved in virus production, and the role of CPV-II are still unknown (14, 17). Several works exhibit electron microscopy evidence of CHIKV (17–19), but, to our knowledge, there are no studies that display in-depth CHIKV life cycle stages morphological analysis. These studies would help understand the virus biology and the virus's life cycle (20).

In this work, we confirmed already described data; and we brought novel details about the CHIKV life cycle stages. Through electron and scanning microscope evidence, immunofluorescent and biological assays, we analyze CHIKV cell infection events. We confirmed entry by macropinocytosis described by previous work (21); we reported CHIKV particles obtaining envelope intracellularly, and we demonstrated release via exocytosis and actin tails. We brought structured and well-characterized images as an attempt to shed new

light on CHIKV biology.



## RESULTS

### **Entry: Chikungunya virus enters in Vero cells by process involving coated and uncoated vesicles.**

It has been demonstrated that alphaviruses penetrate host cells mainly by clathrin-mediated endocytosis, although there is evidence that CHIKV can enter muscular cells by micropinocytosis (21). Even though works have promoted notable advances in CHIKV biology, there are few CHIKV cell entry images. Here, we show an electron micrographs of Vero cells after 8 hours post-infection (hpi) by CHIKV at a multiplicity of infection (MOI) 5.0 (Figure 1A to C), and at 16 hpi at MOI 0.1 (Fig. 1D to H).

In this images, we observed CHIKV particles entries by two distinct approaches. In one of them, virion entry through membrane invagination to form an endocytic coated vesicle in Vero cell (Fig. 1A), and clathrin molecules surround the vesicle in formation (Fig. 1B). After the virion complete entry, a coated endosome carries a CHIKV (Fig. 1C). Erasmus and colleagues showed the same patterns of clathrin-coated vesicle in electron micrographs (22). In the other approach, CHIKV entry by macropinocytosis related endosomes with a single particle. Virion induces a formation of membrane protrusion (lamellipodia) of ~700 nm that exposes the virus on the apical tip (Fig. 1D), carries the virus toward the basal portion to form a vesicle (Fig. 1E), and forms an uncoated vesicle (macropinosome) with ~300 nm (Fig. 1F). Interestingly, multiple particles also induce macropinocytosis forming a lamellipodia with ~800 nm. The basal portion of this lamellipodia, invaginates and collects CHIKV particles (Fig. 1G). As result, a macropinosome are formed with ~300 nm that carries the viruses together and starts the particles' envelope denudation (Fig. 1H).

### **Structures of replication: spherules appear in different regions of the cell and distinct formation of CPV-I.**

The nsPs constitute the replication complex of alphaviruses and form a membrane structure know as spherule that anchors the cell membrane externally through a narrow neck (23). This structure produces an intermediary double-strand RNA inside (24). Previous studies already displayed micrographs of spherules for other alphaviruses (25, 26) and CHIKV (27). However, we observed CHIKV spherules with a variated disposition in the infected cell. This spherules conformation appears in both times: at 4 hpi at an MOI 5.0, and 8 hpi at an MOI 0.1 in infected Vero cells (Fig. 2). In most of the cells, these structures, with varied sizes (~60 to 100 nm), are distributed polarized for an extended part of the cell membrane (Fig. 2A). However, we found some spherules concentrated internally next to the cell membrane (Fig. 2B) and mixed inter- and externally into the cell membrane (Fig. 2C). These

distributions are atypical comparing to the other studies (13, 25), which show the standard distribution of spherules, anchored by the neck on the cell membrane surface (Fig. 2D). In general alphaviruses, these spherules internalize in the late phase of the infection, forming CPV-I and continue the RNA production throughout the infection. Interestingly, in CHIKV infection, it has been described that most of the spherules remain on the cell surface for a longer time (28). Here, we found CPV-I presenting  $\sim 1.3 \mu\text{m}$ , housing disordered spherules (Fig. 2E), and capsid proteins (Fig. 2F). Curiously, differing from the CPV-I pattern described previously, in which the spherules coated the vesicle internally, and there are not capsids presented (18).

**Protein synthesis: Chikungunya virus forms different types of cytopathic vacuoles in Vero cells.**

CHIKV produces many particles exploiting the host cell protein machinery intensely. Structural protein nsP2 coordinates host translation's shutoff, prioritizing viral protein translation (29). Structural proteins have been described as a fashion organized distribution for CHIKV (18). This association, termed honeycomb, is presented as a fashion in viral factories (30) or a release strategy (18). Higashi and colleagues previously show structural proteins establishing different cytopathic structures producing vacuoles membraned (19). Here, we confirm this vacuole's presence and introduce other types; also, we show the honeycomb fashion of capsid precursors. In a CHIKV Vero cells infection at 8 hpi at an MOI 5.0, coordinated capsid protein establishes a honeycomb fashion next to mitochondria (Fig. 3A). Additionally, the virus produces structures with hand-a like shape, containing capsids (Fig. 3B) and membrane closed shape (Fig. 3C and D). These membraned closed structures can contain few (Fig. 3C) or multiple capsids (Fig. 3D). CHIKV also produces other shape patterns varying in compartments number (Fig. 3E), capsid distribution, and membranes' absence (Fig. 3F) or presence (Fig. 3G). Although most of these structures present individually per cell, we also found more than one present in the same infected cell (Fig. 3H).

**Morphogenesis: chikungunya virus can acquire an envelope without budding.**

Alphaviruses obtain the cell membrane's lipid envelope by budding, where the immature virus can become a virion (14). We were investigating images of an asynchronous CHIKV infection in Vero cells and, strikingly, we observed some viral particles acquiring envelope without budding release. These particles obtained envelopes in a membrane delimited viral factory at 8 hpi at an MOI 5.0 (Fig. 4A and 4B). For comparison, we show the envelopes highlighted (Fig. 4C) and a mature CHIKV particle with  $\sim 60 \text{ nm}$  (Fig. 4D). Interestingly, we observed a different release method, by exocytosis, in addition to the classical budding, in which an uncoated vesicle carries a mature virus (Fig. 4E).

In the next step, we decided to investigate particles' infectivity; we infected Vero cells generating a growth curve – MOI 0.1 – by titration plaque assay. To analyze, we measure virus production: (I) only in the supernatant, (II) only in the monolayer, and (III) only in the PBS employed to wash the monolayer and remove the supernatant viruses. As a result, the number of viruses in the monolayer (intracellular) at 8 hpi was ~1 log bigger than the supernatant number; and just in 16 hpi, the supernatant viruses exceed the intracellular ones (Fig. 5A). To evaluate when the virus starts the RNA production, we carried out an RT-qPCR, also infecting Vero cells at MOI 0.1 and analyzing early times. As a result, we observed that the viruses begin RNA production, in a large amount, from 3 hpi (Fig. 5B), confirming a previous virus's growth alphaviruses study that reports a first viral production starting from 5 hpi (8). Finally, to perform the same conditions of infection of the viral factory presence, we did a growth curve at MOI 5.0 titrating (I) supernatant and (II) monolayer in early infection times (2, 4, 6, and 8 hpi). As a result, intracellular infectious viruses exceed the supernatant ones until 6 hpi (Fig. 5C).

**Release: Vero cells produces protrusions to release chikungunya virus in addition to budding.**

Alphaviruses release by budding from host cells (31), but it remains unclear the complete final steps of CHIKV infection (16, 17). To evaluate the release process, we infected Vero cells with CHIKV at MOI 0.1 and 5.0. First, we confirmed release by budding, and we organized didactically in sequence images of this infection at 16 hpi (MOI 0.1). In sequence, a mature capsid run into the cell membrane cytoplasmic surface (Fig. 6A), the membrane became a viral envelope (Fig. 6B), and an immature particle became a mature virus, leaving the cell (Fig. 6C).

Surprisingly, we also found viruses releasing the cell host by an atypical cell membrane protrusion, investigating an asynchronous CHIKV infection carried out at 24 hpi (MOI 0.1) and 8 hpi (MOI 5.0) analyzed by scanning electron microscopy (TEM). As a result, we found membrane cell protrusion carrying a single particle at the apical tip (Fig. 6D). After that, we explored and infection at a low MOI (0.1) at early times (5 hpi) analyzed by scanning electron microscopy (SEM), and we confirmed the protrusion (Fig. 6E). Notably, in this release, viruses seem to leave the cell host by a process like budding but somehow induce a protrusion formation (Fig. 6F). Also, we found long protrusions, visualized by SEM, containing a single particle at the tip (Fig. 6G) and containing many particles distributed along the protrusion (Fig. 6H).

To investigate the protrusion carrying the virus in contact with another cell, we carried out an infection in Vero cells at an MOI 0.1 at 5 hpi and analyzed by SEM. Also, we carried out infection at MOI 0.1 at 16 hpi evaluated by immunofluorescence in Vero cells.

As a result, we observed the connection between two cells with protrusions carrying virus particles (Fig. 7A). In immunofluorescence, we highlighted the cell connections, stained with blue Evans (Fig. 7B), the CHIKV distributed in peripheric regions of the cell (Fig. 7C), in regions distant from the nucleus (Fig. 7D), and the colocalization of the virus and connections between the cells (Fig. 7E).

We decided to investigate the protrusions' actin nature since other viruses release by actin protrusions, termed actin tails (32). To this, we carried out a Vero cells infection at an MOI 0.1 at 16 hpi and performed a confocal assay. We stained infected cells with rhodamine-conjugated phalloidin (a specific actin marker) (Fig. 7F); also, we stained viral particles (Fig. 7G) and nucleus (Fig. 7H). Interestingly, the merged image shows actin filaments and viral particles at the tip, suggesting an actin tail release mechanism (Fig. 7I).

## DISCUSSION

There are intriguing obscure questions and answers to explore regarding many viruses' biology in the virosphere. Several of these questions were raised about the CHIKV life cycle, mainly because of the vast hosts and cell types profile number CHIKV can infect. CHIKV is known since 1952, but never his biology has completed understanding (14). Here, we brought evidence images of structures and CHIKV life cycle stages that confirm classical findings but also open questions about unclear points. These data demonstrate structured images and other assays regarding the CHIKV life cycle made by electron and scanning micrographs and confirming by biological assay.

CHIKV entry is classically based in alphavirus studies that show clathrin-mediated endocytosis requires low pH for successful infection (34). Although clathrin-mediated is much consolidated in CHIKV entry, macropinocytosis entry already was recently found in muscular cells (21). To date, this novel entry process is unconfirmed in other cell lines and micrographs. A considerable number of DNA or RNA viruses with or without an envelope utilizes macropinocytosis to enter the host cell (36). Some of these viruses are vaccinia virus (37), adenovirus (38), Echovirus 1 (39), human immunodeficiency virus (40), and rubella virus (41). These viruses forming a macropinosome size and shape varied alternating between 0.5 to 10  $\mu\text{m}$  (36). Here, we exhibit electron micrographs of macropinocytosis entry and macropinosome carrying CHIKV (Fig. 1). These uncoated intracellular vacuoles (Fig. 1F and 1H) are like that encounter in herpes virus infection (42). Moreover, we showed that both single and multiple CHIKV particles could enter vertebrate cells (Vero cells) by macropinocytosis (Fig. 1D to 1H). Interestingly, this data confirms that CHIKV can penetrate the vertebrate cells through more than one entry process. We show macropinocytosis in asynchronous infection (MOI 0.1) in times of 16 hpi and 24 hpi; maybe, this mechanism induction represents an alternative of traditional endocytosis to accelerate viral infection due to the high viral production of CHIKV. This event could contribute to the fast replication cycle. Perhaps, CHIKV utilizes other entry mechanisms because of CHIKV's vast cell types and hosts (vertebrate/invertebrate) (35, 43). Despite that, more in-depth studies are necessary to investigate precise times and specific triggers of macropinocytosis in CHIKV infection.

Early in the infection, about two hours post-infection, translation by host ribosomal of nsPs1-4 form the replication complex and starts the RNA replication. This complex and the cell membrane compose an evagination with a flask format termed spherule (13). Spherules stand in the outer part of the cell membrane, and the replication complex mounts in their narrow neck. This external localization helps an RNA double-stranded intermediary, produced by nsPs, to evade from pattern recognition receptors as retinoic acid-inducible

gene I (RIG-I) (14). Along the infection course, these spherules are internalized and form a vacuolar structure termed CPV-I that contains lysosomal and endosomal markers (11). This CPV-I forms a large vesicular structure surrounded in the surface internally by spherules that continues the RNA production (18). Intriguingly, here, we detected some spherules distributed in different positions: next to the cell membrane and within the cytoplasm (Fig. 2B) and combined within and outside the cytoplasm (Fig. 2C), besides the usual composition (Fig. 2A and 2D). We also found a different presentation of CPV-I presenting polarization of spherules and disarranged capsid proteins within the vacuole (Fig. 2E to 2F). We suggest this CPV-I encountered in this work may represent an initial form of CHIKV viral factory, although more studies with specific membrane markers need to be made to confirm this.

During the protein synthesis stage, CHIKV produces cytopathic structures comprising mainly capsid (C) protein (19). Late in infection, structural proteins form a CPV-II, a vacuolar structure housing envelope (E) proteins and coated by capsids that are believed to release by budding (14). These structures are produced in both vertebrate and invertebrate cell infection (18). Here, we presented many additional images of cytopathic vacuole structures presenting or not membranes and with capsid proteins arranged in different compositions (Fig. 3). Besides these structures, capsids can form a honeycomb fashion presented in giant viruses (30, 44), and even showed to CHIKV but in late phase as mature virions released by exocytosis (18). We believe these many CPV-II structures variation can represent an alternative form that can enhance virus assembly and even promote an alternative release, such as exocytosis of multiple particles. However, to confirm this hypothesis, are necessary studies evaluating precise times and synchronous infection (high MOI) in sequence to visualize this final step.

It has been described that the alphaviruses only acquire the envelope by budding process from the cell membrane. There is no other way reported, as far as we know (34). Surprisingly, we found microscope evidence that can open questions about CHIKV enveloping process (Fig. 4B, 4C, and 4 E). For the first time, to our knowledge, CHIKV particles are showed acquiring envelope intracellularly (Fig. 4B), and a single particle releasing by exocytosis – late phase of the infection and uncoated vesicle – in vertebrate cells (Fig. 4E). Our biological assay confirmed the infectivity of these intracellular mature viruses once a high number of particles in the monolayer can form plaque (Fig. 5A and 5C). We propose CHIKV can obtain an envelope and be mature before leaving the cell host. This process can be an alternative particle maturation production, whereas the most immature viruses (only capsids) were released by budding. This alternative maturation could produce different

virus particles as seen in vaccinia virus that produces: intracellular mature virions (IMV), intracellular enveloped virions (IEV), cell-associated enveloped virions (CEV), and extracellular enveloped virions (EEV) (45). More experiments employing membrane markers and budding inhibitors could be carried out to understand some of this mechanism.

Also, in the final stage of infection, interestingly, we observed another CHIKV release, by protrusions of actin nature (Fig. 7I), suggesting actin tails (Fig. 6D to 6H), which are common in other viruses as vaccinia virus that carries a single particle in the tip of the tail (46). These extensions are visualized at high MOI at 8 hpi by TEM (Fig. 6D) and in high numbers at low MOI at 5 hpi in SEM (Fig. 6E). Curiously, we only found different cells already infected, connected by these tails carrying multiple particles (Fig. 7A). We believe this process can potentiate the virus dissemination between cells; we believe CHIKV large plaques can be due to actin tails' participation, such as occurs with vaccinia virus in which the virus mutant is unable to polymerize actin tails form a small plaque (32).

There are still some unanswered questions about CHIKV biology, and a vast field needs to be explored. This study confirmed classic patterns and found other structures regarding CHIKV life cycle stages: macropinocytosis entry; enveloped infectious particles intracellularly; single-particle exocytosis; and virion release by actin tails. Future studies and strategies will further increase our comprehension of CHIKV infection. Although the varied MOI and infection times, we show microscopy evidence of novel procedures other than classic ones regarding the CHIKV life cycle. We hope to fill some unclear points in the CHIKV life cycle and contribute to the basic science in the extensive virology field to comprehend virus behavior and host pathogenesis better.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture, virus growth curve, one-step growth curve, and titration and RT-qPCR assays.**

Vero cells (ATCC CCL-81) were cultured in Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco, USA) supplemented with 5 % (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Cultilab – Campinas, SP, Brazil) and antibiotics (40 µg/ml Streptomycin, 200 U/ml Penicillin and 1.5 µg/ml Fungizone) and incubated in 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C. The virus used in this work was CHIKV, belonging to the ECSA genotype and was a generous gift from Dr. Maurício Lacerda Nogueira from the Faculty of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, São Paulo - Brazil.

To perform growth curve and one-step growth curve, Vero cells (approximately 1 x 10<sup>6</sup> cells per bottle (with 25 cm<sup>2</sup>) were infected with CHIKV at a multiplicity of infection (MOI) 0.1 and 5.0 and incubated at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub>. The adsorption was performed by 1 h; the volumes were completed to 4 mL with MEM. The supernatants, PBS, and or monolayer were collected at pre-selected times (8, 16, and 24 hpi [hpi] for MOI 0.1 and 2, 4, 6, and 8 hpi for MOI 5.0). For the supernatant curve: 200 µL of the supernatant was collected and titrated (described below). For the PBS curve: the remaining medium was discarded and washed with PBS 1X four times. This PBS was collected and titrated (described below). Furthermore, for the monolayer (intracellular) curve: after washing with PBS and without any remaining PBS, 300 µL of MEM were aliquoted and frozen in a -70 °C ultra-freezer; these monolayers were frozen and thawed three times, scraped with tips, and collected in 1.5 mL microtubes. These tubes were centrifuged at 13,000 x g for 5 min, and the supernatant was collected in 0.6 mL microtubes. After that, the contents of these tubes were titrated. The titration was performed by plaque assay with viral suspension, after serial dilution method (10<sup>-1</sup> to 10<sup>-6</sup>), was inoculated in a monolayer of Vero cells, grown in 24-well plates (1.5 x 10<sup>5</sup> cells per well) and with uninfected wells maintained for cell control. After 1 h of adsorption at 37 °C, 1 mL of 199 medium was added per well, supplemented with 2 % FBS and containing 1.0 % carboxymethylcellulose (CMC, Synth) plates were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for two days, then 1 mL of 10 % formalin solution was added for 24 h at room temperature (RT) for fixation. The next day, solution was discarded. Afterward, the monolayer was stained with a solution containing 1% (w/v) of violet crystal in PBS to count the lysis plaques, and the viral titer was expressed by the number of plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). Graphs were constructed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software).

### **Transmission electron microscopy and scanning electron microscopy.**



For transmission electron microscopy (TEM), Vero cells were infected as described in the previous section at an MOI of 0.1 and MOI 5.0 fixed at various times post-infection (for MOI 0.1: 8, 16 and 24 hpi and MOI 5.0: 4 and 8 hpi) with 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium phosphate buffer for 2h at RT. Cells were post-fixed with 2% osmium tetroxide and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were then analyzed under TEM (Spirit Bi-otwin FEI, 120 kV) at the Center of Microscopy of UFMG, Brazil.

For scanning electron microscopy (SEM), Vero cells infected at an MOI of 0.1 were added to round glass coverslips covered with poly-L-lysine and at 4 and 8 hpi fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer for 2 h at RT. The samples were then washed three times with 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed with 1.0% osmium tetroxide for 1h at RT. After a second fixation, the samples were washed three times, with 0.1 M cacodylate buffer and immersed in 0.1% tannic acid for 20 min. The samples were then washed in cacodylate buffer and dehydrated by serial passages in ethanol solutions at concentrations ranging from 35% to 100%. Samples were then subjected to critical point drying using CO<sub>2</sub>, placed in stubs, and metalized with a 5-nm gold layer. The analyses were completed using scanning electronic microscopy (FEG Quanta 200 FEI) at the Center of Microscopy of UFMG, Brazil.

#### **Immunofluorescence and confocal assays.**

For immunofluorescence (IF) assay,  $1,5 \times 10^5$  Vero cells were added to round glass blades, and after incubation for 24 h at 37 °C 5 % CO<sub>2</sub>, the cells were infected at an MOI of 0.1. After 24 hpi, we fixed with acetone for 10 min at -20 °C. After fixation, cells were then incubated with 3% bovine serum albumin (BSA)-PAS for 30 min, followed by three rinses with PBS. After that, cells were stained with polyclonal anti-CHIKV whole particle antibodies produced in mice – 1:1000 diluted in PBS – at 4 °C overnight, followed by three rinses with PBS. After a 1h of incubation with AlexaFluor 488-conjugated anti-mouse IgG – 1:400 diluted in PBS – at 37°C, followed by three rinses with PBS, the cells were also incubated with 4,6-diamino-2phenylindole (DAPI) (Sigma, São Paulo, Brazil) – 1:1000 diluted in PBS – for 1 h at RT. After three rinses with PBS, the cells were incubated with rhodamine-conjugated phalloidin (Invitrogen) – 1:1000 diluted in PBS – for 1 h at RT. Uninfected cells (control) were also fixed and prepared, as described above. Fluorescently labeled cells were observed using an Axio Imager Z2-Apotome 2 microscope (Zeiss) at the Center of Microscopy of UFMG, Brazil. The Zen Lite software from Zeiss microscopy was used for image processing. For the confocal assay, the same protocol described for IF as performed. Briefly,  $4 \times 10^3$  Vero cells per well in 24 well plates were infected with CHIKV at MOI 0.1 and fixed 24 hpi; images were obtained in confocal microscopy Zeiss 5 LIVE at the center

of image acquisition and processing of UFMG, Brazil. Images are processing at Zeiss software ZEN 3.0 blue edition.

## FIGURE LEGENDS

**FIG 1 Chikungunya virus mechanism of cell entry.** Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at MOI 0.1 at 8 and 24 hours post-infection (hpi), and a transmission electron microscopy (TEM) was performed. (A to C) clathrin-mediated endocytosis. (A) two CHIKV particles are starting a clathrin-mediated endocytosis with a dotted rectangle showing a (B) zoom of particle fusion with an endosome and (C) a CHIKV single particle into an endosome surrounded with clathrin proteins. (D to H) macropinocytosis. (D) Membrane protrusion ~700 nm (lamellipodia) with a single virus particle on the apical tip. (E) an early vesicle forms to incorporate a single CHIKV particle and (F) forms a macropinosome with a single particle – in red –. (G) multiple CHIKV particles start an entry into the cell (H), forming a macropinosome with multiple particles and starting particle denudation. The images show electron micrographs with their scale indicated by the bars.

**FIG 2 Chikungunya virus spherule formation and internalization.** Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at a multiplicity of infection (MOI) 0.1 at 8 and 24 hours post-infection (hpi) and a transmission electron microscopy (TEM) was performed. (A to D) Spherules externalization. (A) Spherules varied ~60 to 100 nm – in red – next to the cell membrane, starting an externalization. (B) three spherules external and two internal – in red – before a complete externalization process. (C and D) Spherules – in red – distributed over the cell membrane. (E and F) spherules internalized. (E) a cytopathic vacuole type one (CPV-I) – in yellow – is formed after spherules internalization – in red – with a zoom (F) also is present in CPV-I capsid proteins – arrow blue – and externally CHIKV particles formed – arrow red –. The images show electron micrographs with their scale indicated by the bars.

**FIG 3 Chikungunya virus capsid protein composition and cytopathic structures.** Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at a multiplicity of infection (MOI) 0.1 at 16 and 24 hours post-infection (hpi) and MOI 5.0 at 8 hpi, after a transmission electron microscopy (TEM) was performed. (A) Honeycomb capsid protein fashion – in red – stand next to mitochondria – in purple –. (B to D) Cytopathic structure formation with hand-like in the process of closure (B), closed with some capsids (C) and closed with a large amount of CHIKV capsids (D). (E to H) CHIKV infection varies cytopathic structures. Electron micrographs are shown with their scale indicated by the bars.

**FIG 4 Chikungunya virus morphogenesis and exocytosis.** Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at a multiplicity of infection (MOI) 0.1 at 16 hours post-infection (hpi) and MOI 5.0 at 8 hpi, after a transmission electron microscopy (TEM) was performed. (A to C) A structure viral factory with CHIKV particles acquiring an envelope

intracellularly. A zoom (B) of image A shows capsids with and without envelopes in progression (C) highlighted in yellow. (D) A complete, mature CHIKV particle. (E) Exocytic vesicle carrying a CHIKV. Electron micrographs are shown with their scale indicated by the bars.

**FIG 5 Chikungunya virus particles infectious and RNA growth curves.** (A) Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at a multiplicity of infection (MOI) 0.1 at 8, 16, and 24 hours post-infection (hpi) to perform an infectious particles growth curve. The graph shows the exponential growth of infectious CHIKV particles; we titrated three viral content of the infection: the first content was just supernatant – circular gray line –; the second was the PBS utilized for washing four times the monolayer – square light gray line –, and the last one just the monolayer (intracellular) content – black triangle line –. These results were expressed in plaque-forming units per milliliter (PFU/mL). At 8 hpi the amount of viral intracellular content is larger than supernatant and is surpassed at 24 hpi. (C) Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at a multiplicity of infection (MOI) 5.0 at 2, 4, 6, and 8 hpi to perform an infectious particles one-step growth curve. Figure shows supernatant – circular gray line – and monolayer (intracellular) – black square line – virus content, results expressed in PFU/mL. Here, the viruses are produced from 4 hpi, and a quick multiplication of CHIKV is confirmed. (B) Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at a multiplicity of infection (MOI) 0.1 1, 2, 3, and 4 hpi to perform an RNA growth curve by RT-qPCR. RNA growth curve confirms this fast virus production by rapid RNA replication from 3 hpi. Error bars indicate standard deviations.\*,  $P < 0.05$  (two-tailed Student's t-test). Data are representative of three independent experiments with similar results.

**FIG 6 Chikungunya virus release by budding and actin tail mechanisms.** Vero cells were infected with chikungunya virus (CHIKV) at a multiplicity of infection (MOI) 0.1 at 16 and 24 hours post-infection (hpi) and MOI 5.0 at 8 hpi, after a transmission electron microscopy (TEM) was performed. Furthermore, for scanning electron microscopy (SEM), cells were infected by CHIKV with MOI 0.1 at 8 hpi. (A to C) Release of CHIKV by budding, acquiring the early envelope through cell membrane (A), finishing the envelope formation (B), and almost completing the release (C). (D to H) Release by actin tail. An actin tail with a single CHIKV particle – blue arrow – on the tip and other particles near the cell surface – in green – is shown by transmission micrograph (D) and a scanning micrograph (E). The transmission micrograph shows two actin tails with a single CHIKV particle on the tip (F). Scanning micrograph shows a long actin tail with a single particle on the tip – blue arrow –. Scanning micrograph shows multiple particles over the cell surface and some particles along the tail with a particle on the tip (H).

**FIG 7 Virus distribution and connection between cells by actin tails.** Vero cells

were infected by chikungunya virus (CHIKV) with a multiplicity of infection (MOI) 0.1 at 8 hpi, and a scanning electron microscopy (SEM) was performed. Two actin tails from different cells – in orange: cell one and purple: cell two – connected with multiple viruses along with the tails (A). Vero cells were infected by CHIKV with MOI 0.1 at 16 hpi, and immunofluorescence and confocal assay were performed. (B to E) Immunofluorescence of CHIKV infection shows the cytoskeleton stained with Evans blue – in red – (B), the virus distribution over the cell surface and connections linked with AlexaFluor 488 – in green – (C), the nuclei stained with DAPI – in blue – (D) and colocalization of virus and cell connections (E). (F to I) Confocal microscopy shows the actin filaments forming cell projections stained with rhodamine-conjugated phalloidin – in red – highlighted in white dot circle (F), CHIKV distribution linked with AlexaFluor 488 – in green – (G), the nuclei stained with DAPI – in blue – (H) and colocalization of CHIKV on the tip of actin filaments – white dot circle – (I).

## REFERENCES

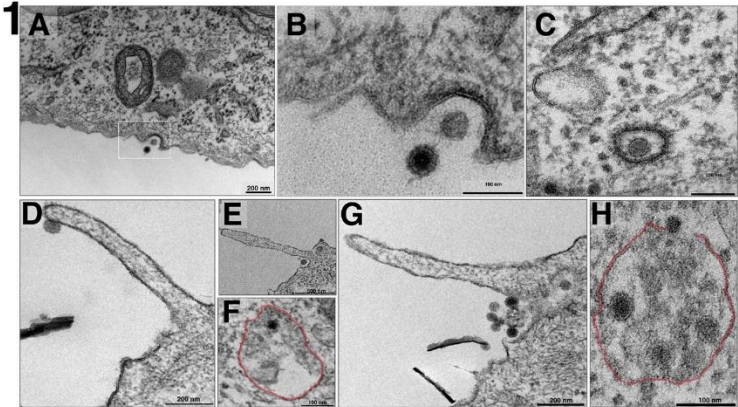
1. Lumsden WHR. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(55\)90081-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(55)90081-X).
2. ROBINSON MC. 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.
3. Koonin EV, Dolja VV, Krupovic M, Varsani A W, YI, Yutin N, Zerbini M KJ. 2019. Create a megataxonomic framework, filling all principal taxonomic ranks, for realm Riboviria.
4. Chen L, Wang M, Zhu D, Sun Z, Ma J, Wang J, Kong L, Wang S, Liu Z, Wei L, He Y, Wang J, Zhang X. 2018. Implication for alphavirus host-cell entry and assembly indicated by a 3.5Å resolution cryo-EM structure. *Nat Commun* 9.
5. Zhang Y-N, Deng C-L, Li J-Q, Li N, Zhang Q-Y, Ye H-Q, Yuan Z-M, Zhang B. 2019. Infectious Chikungunya Virus (CHIKV) with a Complete Capsid Deletion: a New Approach for a CHIKV Vaccine. *J Virol* 93.
6. Metz SW, Gardner J, Geertsema C, Le TT, Goh L, Vlak JM, Suhrbier A, Pijlman GP. 2013. Effective Chikungunya Virus-like Particle Vaccine Produced in Insect Cells. *PLoS Negl Trop Dis* 7:2124.
7. Griffin DE. 2013. ALPHAVIRUSES, p. 655. *In* *Fields Virology*, 6TH ed.
8. Chain MM, Doane FW, McLean DM. 1966. Morphological development of Chikungunya virus. *Can J Microbiol* 12:895–900.
9. Ooi YS, Stiles KM, Liu CY, Taylor GM, Kielian M. 2013. Genome-Wide RNAi Screen Identifies Novel Host Proteins Required for Alphavirus Entry. *PLoS Pathog* 9:1–10.
10. Wichit S, Hamel R, Bernard E, Talignani L, Diop F, Ferraris P, Liegeois F, Ekchariyawat P, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Thomas F, Merits A, Choumet V, Roques P, Yssel H, Briant L, Missé D. 2017. Imipramine Inhibits Chikungunya Virus Replication in Human Skin Fibroblasts through Interference with Intracellular Cholesterol Trafficking. *Sci Rep* 7:3145.
11. Spuul P, Balistreri G, Kääriäinen L, Ahola T. 2010. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol* 2010/05/19. 84:7543–7557.
12. Ivanova L, Schlesinger MJ. 1993. Site-directed mutations in the Sindbis virus E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. *J Virol* 67:2546 LP – 2551.
13. Jin J, Galaz-Montoya JG, Sherman MB, Sun SY, Goldsmith CS, O'Toole ET, Ackerman

- L, Carlson L-A, Weaver SC, Chiu W, Simmons G. 2018. Neutralizing Antibodies Inhibit Chikungunya Virus Budding at the Plasma Membrane. *Cell Host Microbe* 24:417-428.e5.
14. Silva LA, Dermody TS. 2017. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*.
  15. Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey LL, Powers A, Weaver SC. 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *J Gen Virol* 99:761–762.
  16. Schnierle BS. 2019. Cellular attachment and entry factors for chikungunya virus. *Viruses* 11:1078.
  17. Solignat M, Gay B, Higgs S, Briant L, Devaux C. 2009. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology* 393:183–197.
  18. Chen KC, Kam Y-W, Lin RPT, Ng MM-L, Ng LFP, Chu JHJ. 2013. Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. *Virol J* 10:169.
  19. Higashi N, Matsumoto A, Tabata K, Nagatomo Y. 1967. Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells. *Virology* [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90093-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90093-1).
  20. Buzón P, Maity S, Roos WH. 2020. Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 12:e1613.
  21. Hua C, Lee R, Hussain KM, Chu JJH. 2019. Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. *PLoS Negl Trop Dis* 13:1–19.
  22. Erasmus JH, Auguste AJ, Kaelber JT, Luo H, Rossi SL, Fenton K, Leal G, Kim DY, Chiu W, Wang T. 2017. A chikungunya fever vaccine utilizing an insect-specific virus platform. *Nat Med* 23:192.
  23. Bartholomeeusen K, Utt A, Coppens S, Rausalu K, Vereecken K, Ariën KK, Merits A. 2018. A chikungunya virus trans-replicase system reveals the importance of delayed nonstructural polyprotein processing for efficient replication complex formation in mosquito cells. *J Virol* 92.
  24. Utt A, Quirin T, Saul S, Hellström K, Ahola T, Merits A. 2016. Versatile trans-replication systems for chikungunya virus allow functional analysis and tagging of every replicase protein. *PLoS One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151616>.
  25. Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S, Frolov I. 2010. Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane. *J Virol* <https://doi.org/10.1128/jvi.01441-10>.

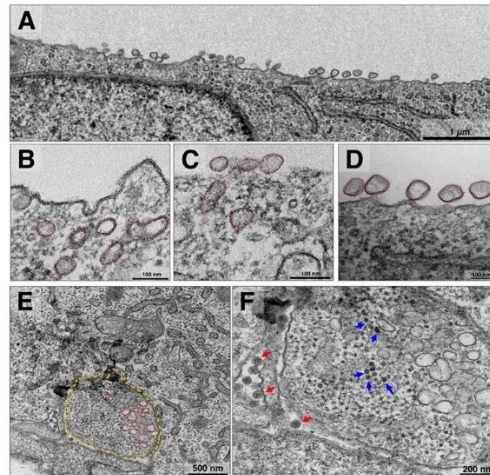
26. Kujala P, Ikäheimonen A, Ehsani N, Vihinen H, Auvinen P, Kääriäinen L. 2001. Biogenesis of the Semliki Forest virus RNA replication complex. *J Virol* 75:3873–3884.
27. Hellström K, Kallio K, Utt A, Quirin T, Jokitalo E, Merits A, Ahola T. 2017. Partially uncleaved alphavirus replicase forms spherule structures in the presence and absence of RNA template. *J Virol* 91.
28. Thaa B, Biasiotto R, Eng K, Neuvonen M, Götte B, Rheinemann L, Mutso M, Utt A, Varghese F, Balistreri G, Merits A, Ahola T, McInerney GM. 2015. Differential Phosphatidylinositol-3-Kinase-Akt-mTOR Activation by Semliki Forest and Chikungunya Viruses Is Dependent on nsP3 and Connected to Replication Complex Internalization. *J Virol* <https://doi.org/10.1128/JVI.01579-15>.
29. Frolov I, Schlesinger S. 1994. Comparison of the effects of Sindbis virus and Sindbis virus replicons on host cell protein synthesis and cytopathogenicity in BHK cells. *J Virol* 68:1721–1727.
30. Borges I, Rodrigues RAL, Dornas FP, Almeida G, Aquino I, Bonjardim CA, Kroon EG, La Scola B, Abrahão JS. 2019. Trapping the Enemy: *Vermamoeba vermiformis*; Circumvents Faustovirus Mariensis Dissemination by Enclosing Viral Progeny inside Cysts. *J Virol* 93:e00312-19.
31. Brown RS, Wan JJ, Kielian M. 2018. The alphavirus exit pathway: what we know and what we wish we knew. *Viruses* 10:89.
32. Zhang W-H, Wilcock D, Smith GL. 2000. Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence. *J Virol* 74:11654–11662.
33. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, Kohl A, Rudd PA, Taylor A, Herrero LJ. 2017. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis* 17:e107–e117.
34. Sourisseau M, Schilte C, Casartelli N, Trouillet C, Guivel-Benhassine F, Rudnicka D, Sol-Foulon N, Roux K Le, Prevost M-C, Fsihi H, Frenkiel M-P, Blanchet F, Afonso P V, Ceccaldi P-E, Ozden S, Gessain A, Schuffenecker I, Verhasselt B, Zamborlini A, Saïb A, Rey FA, Arenzana-Seisdedos F, Desprès P, Michault A, Albert ML, Schwartz O. 2007. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLOS Pathog* 3:1–14.
35. Bernard E, Solignat M, Gay B, Chazal N, Higgs S, Devaux C, Briant L. 2010. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: Role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One* 5.
36. Mercer J, Helenius A. 2009. REVIEW Virus entry by macropinocytosis 11.



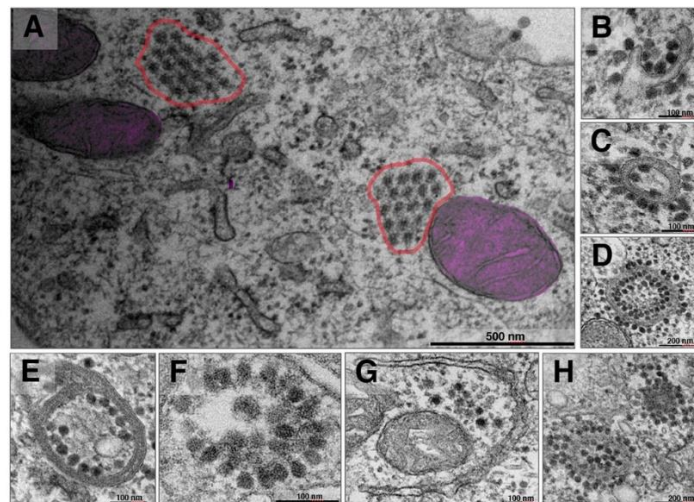
37. Mercer J, Helenius A. 2008. Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells. *Science* (80- ) 320:531 LP – 535.
38. Meier O, Boucke K, Hammer SV, Keller S, Stidwill RP, Hemmi S, Greber UF. 2002. Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol*2002/09/09. 158:1119–1131.
39. Krieger SE, Kim C, Zhang L, Marjomaki V, Bergelson JM. 2013. Echovirus 1 entry into polarized Caco-2 cells depends on dynamin, cholesterol, and cellular factors associated with macropinocytosis. *J Virol*2013/06/05. 87:8884–8895.
40. Maréchal V, Prevost M-C, Petit C, Perret E, Heard J-M, Schwartz O. 2001. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis. *J Virol* 75:11166 LP – 11177.
41. Lee J-Y, Bowden DS. 2000. Rubella virus replication and links to teratogenicity. *Clin Microbiol Rev* 13:571–587.
42. Nicola A V., McEvoy AM, Straus SE. 2003. Roles for Endocytosis and Low pH in Herpes Simplex Virus Entry into HeLa and Chinese Hamster Ovary Cells. *J Virol* 77:5324–5332.
43. Hoornweg TE, van Duijl-Richter MKS, Nuñez NVA, Albulescu IC, van Hemert MJ, Smit JM. 2016. Dynamics of chikungunya virus cell entry unraveled by single-virus tracking in living cells. *J Virol* 90:4745–4756.
44. Reteno DG, Benamar S, Khalil JB, Andreani J, Armstrong N, Klose T, Rossmann M, Colson P, Raoult D, La Scola B. 2015. Faustovirus, an Asfarvirus-Related New Lineage of Giant Viruses Infecting Amoebae. *J Virol* 89:6585 LP – 6594.
45. Chung C-S, Chen C-H, Ho M-Y, Huang C-Y, Liao C-L, Chang W. 2006. Vaccinia Virus Proteome: Identification of Proteins in Vaccinia Virus Intracellular Mature Virion Particles. *J Virol* 80:2127 LP – 2140.
46. Cudmore S, Cossart P, Griffiths G, Way M. 1995. Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378:636–638.



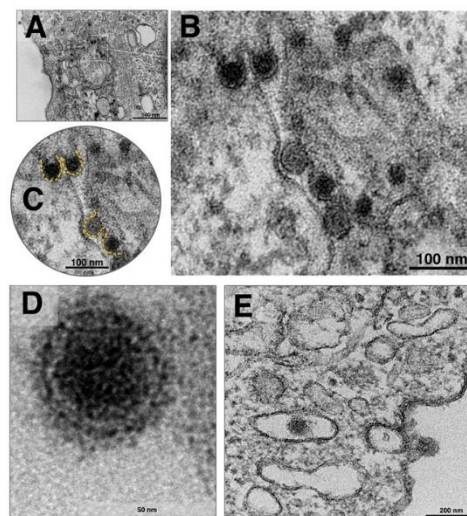
2



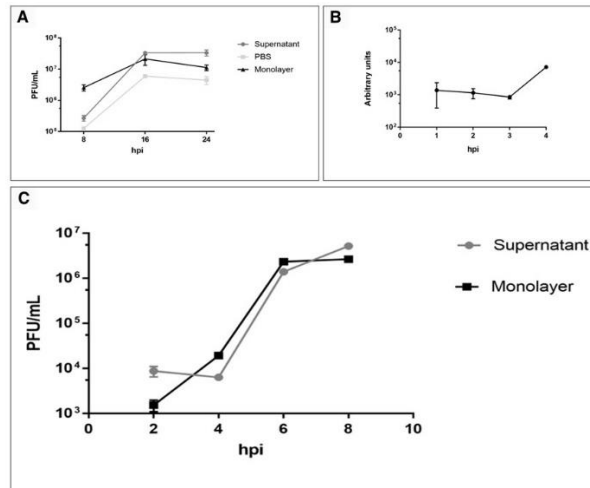
3



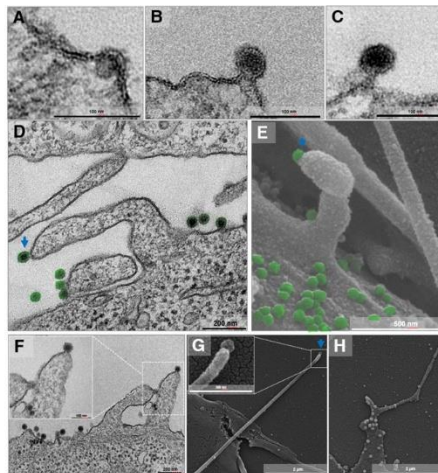
4



5



6



7

