

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DE MAYARO VIRUS (MAYV)
E ANÁLISE DOS POTENCIAIS EFEITOS ANTIVIRAIS DE INIBIDORES DE VIAS DE
SINALIZAÇÃO *in vitro* e *in vivo*

DIOGO CORRÊA MENDONÇA

Belo Horizonte

2022

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DE MAYARO VIRUS (MAYV)
E ANÁLISE DOS POTENCIAIS EFEITOS ANTIVIRAIS DE INIBIDORES DE VIAS DE
SINALIZAÇÃO *in vitro* e *in vivo*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais como requisito final para
obtenção do título de Doutor em
Microbiologia

Aluno: Diogo Corrêa Mendonça

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte

2022

043

Mendonça, Diogo Corrêa.

Caracterização do ciclo de multiplicação de Mayaro Virus (MAYV) e análise dos potenciais efeitos antivirais de inibidores de vias de sinalização *in vitro* e *in vivo* [manuscrito] / Diogo Corrêa Mendonça. – 2022.

127 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim.

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

1. Microbiologia. 2. Alphavirus. 3. Microscopia Eletrônica de Transmissão. 4. Quinases de Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno. 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
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE **DIOGO CORRÊA MENDONÇA**

Nº REGISTRO: **2018698014**

Às 14:00 horas do dia 14 de fevereiro de 2022, reuniu-se remotamente, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Pedro Augusto Alves (IRR)/Fiocruz Minas), Breno de Mello Silva (UFOP), José Carlos de Magalhães (UFSJ) e o Prof. Dr. Cláudio Antonio Bonjardim – Orientador, para julgar o trabalho final “Caracterização do ciclo de multiplicação de Mayaro virus (MAYV) e análise dos potenciais efeitos antivirais de inibidores de vias de sinalização in vitro e in vivo”, do aluno Diogo Corrêa Mendonça, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Cláudio Antonio Bonjardim, 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. 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.

Belo Horizonte, 14 de fevereiro de 2022.

Membros da Banca:

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Dr. Pedro Augusto Alves

Dr. Breno de Mello Silva

Dr. José Carlos de Magalhães

De acordo:

Prof. Dr. Cláudio Antonio Bonjardim

(Orientador)

Profa. Daniele da Glória de Souza

*(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)*

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 PróReitoria 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.

A todos os funcionários da UFMG, em particular os técnicos do Centro de Microscopia pelo processamento das amostras e ajuda com as análises das imagens.

Aos professores do Laboratório de Vírus: Dra. Erna G. Kroon, Dra. Giliane S. Trindade, Dr. Jônatas S. Abrahão e Dra. Betânia P. Drumond por toda sua contribuição na minha formação como profissional, pelos inúmeros conselhos e ajuda durante todo o meu tempo de laboratório.

A todos os meus colegas do Laboratório de Vírus, em particular os membros do grupo GTS: Nídia, Hugo, Luiz e Mari pelas nossas ótimas reuniões, conversas e muitas horas de laboratório tarde da noite.

Aos meus grandes amigos que levarei para vida: Izabela, Lívia, Paulo, Lucas, Erik e Léo, que foram de imensa importância tanto pessoal quanto profissional.

Ao meu orientador Dr. Cláudio A. Bonjardim, por ter me recebido, me ensinado desde conceitos básicos de virologia até como ser uma pessoa e profissional melhor. Aos seus conselhos, sua paciência e seu enorme conhecimento que foram essenciais para minha formação.

A minha família, que sem eles eu jamais teria chegado até aqui. Meu pai que sempre fez tudo que pode para me proporcionar todas as oportunidades que precisei. A minha mãe que nunca deixou de me apoiar, e sempre disposta a me ajudar a resolver problemas, e ao meu irmão que foi sempre meu melhor amigo.

A todo mundo que contribuiu de alguma forma não só pro meu doutorado, mas para minha vida.

A mais sincera e pura forma de agradecimento.

Obrigado.

RESUMO

Mayaro vírus (MAYV) pertence ao gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae*, que também inclui o CHIKV. MAYV é encontrado principalmente nas Américas Centrais e do Sul, e é transmitido por mosquitos do gênero *Haemagogus* causando uma doença febril seguida de artrite e artralgia debilitante, similar a causada pelo CHIKV. A febre do Mayaro pode levar a sequelas que tem impacto direto na capacidade produtiva do paciente por longos períodos o que pode levar a um prejuízo humano e econômico grave, como o que já ocorreu com o CHIKV nos últimos anos. A febre do Mayaro é considerada uma doença negligenciada devido aos poucos dados epidemiológicos e no Brasil é considerada um potencial risco de saúde pública com números de casos aumentando todo ano. Como para a maior parte das arboviroses, não existe tratamento ou vacina para o MAYV, e o desenvolvimento delas se faz necessário frente a uma futura epidemia. Um dos objetivos desse trabalho foi caracterizar as etapas do ciclo de multiplicação de MAYV estabelecendo uma linha temporal de eventos, além de avaliar o efeito de inibidores farmacológicos (IFs) no seu ciclo de multiplicação tanto *in vitro* quanto *in vivo* modelo animal. Para a caracterização do ciclo foram realizadas curvas de multiplicação com MOI 10 – 0.1, analisadas através de titulação por ensaio de placa, RT-qPCR e microscopia eletrônica de transmissão (MET). O vírus apresentou um ciclo de multiplicação rápido, caracterizado por um período de eclipse em torno das 4 horas pós infecção (h.p.i.), seguido de aumento exponencial na quantidade de partículas virais com duração entre 3 e 18 horas e fase estacionária após 24 horas. Imagens de MET utilizando MOI 10, revelaram que a penetração na célula ocorreu entre 30 m.p.i. e 1 h.p.i., o desnudamento ocorreu 2-3 h.p.i., a formação de esférulas 4 h.p.i. e do vacúolo citoplasmático II (CPV-II) 5 h.p.i., a liberação de partículas ocorreu após 4 h.p.i. aumentando exponencialmente 6 h.p.i. Esses resultados nos possibilitaram estabelecer uma linha temporal de eventos durante o ciclo de multiplicação do MAYV incluindo algumas etapas ainda não caracterizadas, reorganização de ribossomos e formação de grupos precursores virais pré-formação de esférulas e liberação de partículas por exocitose via formas gigantes. Nos ensaios com IFs foram testados IFs de MAPKs com redução de 90% nos títulos virais 15 h.p.i. em MOI 0.1 para os inibidores Trametinib (MEK/ERK) e JNK-VIII além da observação na redução de 82% no número de partículas intracelulares verificada na MET (Trametinib). Realizamos também experimentos piloto em modelo animal utilizando camundongos C57BL/6 e em modelo de infecção com animais com 15-18 dias de idade infectados com MAYV, e o Trametinib foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade em 75% na

dose diária administrada (2mg/kg), a qual se mostrou bem tolerável para C57BL/6. Além disso, verificamos um retardo no surgimento de sinais clínicos, que foi acompanhado por redução na carga genômica observada no fígado (42%), baço (59%) e cérebro (100%). Em conclusão, nosso trabalho demonstra o potencial antiviral do IFs: 1- Trametinib (*in vitro* e *in vivo*) e 2- do JNK VIII (*in vitro*) contra o MAYV e caracteriza etapas do seu ciclo de multiplicação, em particular imagens obtidas através da MET, inéditas para o MAYV.

Palavras-chave: alphavírus. Mayaro vírus, Trametinib, JNK VIII, MET

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) belongs to the genus *Alphavirus*, family *Togaviridae*, that also includes CHIV. MAYV is mainly found on Central and South America and is transmitted by mosquitos from the *Haemagogus* genus causing a febrile illness followed by a debilitating arthritis and arthralgia similar to the one caused by CHIV. The Mayaro fever can lead to sequelae that have a direct impact on the patient's productive capacity for long periods of time which can lead to serious economic damage, such as that which has occurred with CHIKV in recent years. The Mayaro fever is considered a neglected disease due to the few epidemiological data and in Brazil it is considered a potential public health risk with increasing numbers of cases increasing every year. As with most arboviruses, there is no treatment or vaccine for MAYV, and their development is necessary in the face of a future epidemic. The main objectives are characterizing the stages of MAYV replication cycle establishing a event tiemeline and to evaluate the potential of Pharmacological Inhibitors (PIs) against infection with MAYV *in vitro* and *in vivo* in animal model. For the characterization, multiplication curves with MOI 10 – 0.1 were made for analysis by titration in plaque assay, qPCR and transmission electron microscopy (TEM). The virus had a rapid cycle, a period of eclipse around 4 h.p.i. followed by an exponential increase in the number of particles lasting between 3 and 18 hours and a stationary phase after 24 hours. TEM images using MOI 10 revealed particles penetrating the cell between 30 m.p.i. and 1 h.p.i., uncoating 2-3 h.p.i, appearance of spherules 4 h.p.i., and cytoplasmic vacuole II (CPV-II) 5 h.p.i., liberation started 4 h.p.i. increasing exponentially 6 h.p.i. With our data we were able to stablish a chronological order of events during MAYV replication including uncharacterized steps as ribosome reorganization, early clusters of viral precursors and a secondary way of particle release, through exocytosis inside giant forms. For the inhibition assays, MAPK PIs were tested, with a 90% reduction in viral load at 15 h.p.i with MOI 0.1, for the inhibitors, Trametinib (MEK / ERK) and JNK-VIII and reduction in 82% in the number of particles observed in MET (Trametinib only). We also carried out pilot experiments with animal models using C57BL/6 and using an infection model with mice 15-18 days old infected with MAYV. Trametinib was able to reduce the mortality rate by 75% with the administered dose (2mg/ kg) that was tolerable for these animals. In addition, it caused a delay in the appearance of signals and a reduction in the genomic load observed in the liver (42%), spleen (59%) and brain (100%). In conclusion, our work demonstrates the antiviral potential of two PIs: Trametinib (*in vitro* and *in vivo*) JNK VIII (*in vivo*), for MAYV and characterizes stages of the multiplication cycle, with unpublished MET images for MAYV.

Keywords: alphavirus, Mayaro virus, Trametinib, JNK VIII, TEM

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura geral da partícula dos Alphavirus	22
Figura 2: Genoma de Alphavirus	22
Figura 3: Ciclo de multiplicação dos Alphavirus	26
Figura 4: Casos de MAYV no mundo	28
Figura 5: Arvore filogenética MAYV	29
Figura 6: Ciclo de transmissão do MAYV	31
Figura 7: Sintomas comuns MAYV	32
Figura 8: Cascatas de sinalização envolvendo MAPK.....	36
Figura 9 Curva de Multiplicação do MAYV.....	53
Figura 10: Etapas do ciclo de multiplicação MAYV	54
Figura 11: Imagens de MET, de células VERO Controle	56
Figura 12: Penetração do MAYV	59
Figura 13: Reorganização de ribossomos	62
Figura 14: Formação de esférulas induzidas pela infecção com MAYV	63
Figura 15: Formação do CPV-II e morfogênese	65
Figura 16: Liberação do MAYV	67
Figura 17: Linha temporal dos eventos do ciclo de multiplicação do MAYV	68
Figura 18 Teste de Citotoxicidade (MTT) Binimetinib.....	69
Figura 19: Intervalos de tempos de adição/remoção do Trametinib e seu impacto nos títulos virais	71
Figura 20: Adição do Binimetinib e seu impacto nos títulos virais.....	72
Figura 21 Ensaio dose-resposta do efeito de Trametinib sobre MAYV	74
Figura 22: Células infectadas com MAYV e tratadas com DMSO.....	78
Figura 23: Células infectadas com MAYV e tratadas com Trametinib	80
Figura 24: Quantificação das partículas virais de células infectadas com MAYV e tratadas com DMSO ou Trametinib.....	81
Figura 25: Ensaio IFs AKTi, JNKi e Selumetinib.....	82
Figura 26: Teste de Sobrevivência de camundongos A129 com MAYV	84
Figura 27: Variação de peso e mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV através de duas vias de inculação	86
Figura 28: Observação dos sinais clínicos verificados após a infecção de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV, através de duas vias de infecção -	87

Figura 29: Variação de peso e curva de mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV e tratamento com Trametinib	89
Figura 30: Observação dos sinais clínicos de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV e tratamento com Trametinib.	90
Figura 31: Análise da carga genômica dos órgãos coletados	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Inibidores farmacológicos seus respectivos alvos	45
Tabela 2: Iniciadores utilizados nos ciclos de amplificação por qPCR para MAYV.....	47
Tabela 3: Condições para os ciclos de amplificação por RT-qPCR.....	48
Tabela 4: Grupos e condições experimentais - infecção com MAYV em camundongos A129	49
Tabela 5: Grupos e condições experimentais - avaliação da via de inoculação para infecção com MAYV em camundongos C57/BL/6.....	50
Tabela 6: Grupos e condições experimentais para tratamento com Trametinib em animais C57/BL/6 infectados com MAYV.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AKTi – inibidor de AKT

AUD = domínio único de alphavirus, do inglês *alphavirus unique domain*

AUKi = inibidor de aurora kinase

BFL = via de infecção embaixo da pata dianteira do inglês, *below forelimb*

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

CHIKV = Chikungunya virus

CMC = carboximetilcelulose

CONCEA = Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPV = vacúolo citoplasmático, do inglês *cytoplasmic vacuole*

CV = cristal violeta

DENV = Dengue vírus

dsRNA = RNA de dupla fita do inglês, *double stranded RNA*

EEEV = vírus da encefalite equina do leste

EGF = fator de crescimento de epiderme, do inglês, *epidermal growth factor*

EILV = Eilat vírus

ELISA = ensaio de imunoabsorção enzimática

EMCV = vírus da encefalomiocardite

ERK = Proteína cinase regulada por sinais extracelulares, do inglês *extracellularsignal-regulatedkinaseprotein*

FGF = fator de crescimento de fibroblastos, do inglês, *fibroblast growth factor*

GTS = Grupo de Transdução de Sinal

HCV = Vírus da hepatite B

HCMV = Citomegalovírus humano

HCV = Vírus da hepatite C

HIV = Vírus da imunodeficiência humano

H.P.I. = Horas pós infecção

IF = Inibidor farmacológico

IFNAR = Receptor de interferons tipo 1

IKK- α = Inibidor de Kappa B alfa kinase do inglês, *Inhibitor of Kappa B Kinase-alpha*

ILs = interleucinas

IRES = sitio interno de entrada do ribossomo do inglês, *internal ribosome entry site*

JNK = Proteína cinase c-Jun N-terminal, do inglês *c-Jun N-terminal kinase*

JNKi = inibidor de JNK

kDa = kilodalton

KO = nocaute, do inglês, *knockout*

MAPK = Proteínas cinases ativadas por mitógenos, do inglês *mitogen activated protein kinase*

MAYV = Mayaro virus

MEM = Meio mínimo essencial

MET = microscopia eletrônica de transmissão

MCP-I = proteína quimioatrativa de monócitos, do inglês, *Monocyte chemoattractant protein - 1*

MPI = minutos pós infecção

MTT = 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl] -2, 5-difeniltetrazolbrometo

MOI = Multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*

NC = nucleocapsídeo

NSPs = proteínas não estruturais, do inglês *non-structural proteins*

ORF = sequência codificadora, do inglês *open Reading frame*

PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS = Salina tamponada por fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*

PCR = reação em cadeia da polimerase

PFU = Unidades formadoras de placas, do inglês plaque-forming units

PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês, *plaquet-derived growth factor*

PNH = primata não humano

PRNT = ensaio de redução e neutralização de placas, do inglês, *Plaque reduction neutralization test*

qPCR = reação em cadeia da polimerase quantitativa

RdRP = RNA polimerase dependente de RNA, do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*

ROS = espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

RRV = vírus do rio de Ross

SFB = Soro fetal bovino

SFV = Vírus da Floresta de Semliki

SINV = Sindbis vírus

SLEV = vírus da encefalite de Saint Louis

TA = temperatura ambiente

TAE = Tampão Tris-Acetato-EDTA

TNF = fator de necrose tumoral do inglês, *tumor necrosis factor*

UNAV = Una vírus

UTR = região não traduzida, do inglês *untranslated region*

VEEV = vírus da encefalite equina da Venezuela

VEGF = fator endotelial de crescimento vascular do inglês, *vascular endothelial growth factor*

WB = Transferência de Western, do inglês *Western Blot*

WEEV = vírus da encefalite equina do Oeste

WT = linhagem selvagem, do inglês, *wild type*

YFV = Yellow Fever virus

ZIKV = Zika virus

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO	20
1.1 Alphavirus.....	20
1.1.1 Classificação	20
1.1.2 Estrutura e Genoma dos Alphavirus	21
1.1.3 Ciclo de multiplicação	24
1.2 Mayaro virus	27
1.2.1 Epidemiologia.....	27
1.2.2 Filogenia	28
1.2.3 Mecanismos de Patogenicidade.....	29
1.2.4 Ciclo de Transmissão.....	30
1.2.5 Aspectos Clínicos	31
1.2.6 Diagnóstico.....	32
1.2.7 Tratamento, Vacina e Controle de vetores	33
1.3 Desenvolvimento de antivirais.....	34
1.4 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e vias de sinalização	35
1.4.1 Cascata de sinalização MEK/ERK	36
1.4.2 MAPKs e infecção viral	36
1.4.3 MAPKs como potenciais fármacos antivirais	37
1.5 Modelos murinos para o MAYV	38
II – JUSTIFICATIVA	40
III – OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2.1 Objetivos Específicos	42
IV – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	43
V – MATERIAIS E MÉTODOS.....	44

5.1 Células	44
5.1.1 Células VERO	44
5.1.2 Células C6/36	44
5.2 Vírus	44
5.3 Inibidores Farmacológicos	44
5.4 Titulação Viral.....	45
5.5 Curva de multiplicação viral	45
5.6 Teste de viabilidade celular com MTT.....	46
5.7 Extração de RNA.....	47
5.8 RT-qPCR	47
5.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	48
5.10 Ensaio biológicos com MAYV	48
5.10.1 Infecção com MAYV em camundongos A129	49
5.10.2 Infecção com MAYV dos camundongos C57BL/6.....	49
5.10.2 Tratamento com Trametinib de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV	50
5.11 Cálculo da IC50.....	51
5.12 Análise Estatística	51
VI – RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1 Caracterização do ciclo de multiplicação do MAYV	52`
6.1.1 Cinética.....	52
6.1.2 Identificação das etapas do ciclo de multiplicação.....	53
6.1.3 Análise do ciclo de multiplicação do MAYV por MET.....	55
6.2 Efeitos dos IFs de MEK no ciclo de multiplicação do MAYV	69
6.2.1 Testes de Citotoxicidade – Inibidores de MEK.....	69
6.2.2 Análise de intervalos de tempos de adição/remoção do IF e seu impacto nos títulos virais	70
6.2.3 Ensaio dose-resposta do Trametinib sobre o título de MAYV.....	73

6.2.4 Análise do efeito do Trametinib no ciclo de multiplicação do MAYV por MET...	75
6.2.5 Análise do efeito dos inibidores farmacológicos AKTi, AUKi, JNKi e Selumetinib sobre a multiplicação do MAYV.....	81
6.3 Ensaios de infecção e tratamento em modelo murino	83
6.3.1 Ensaio da infecção de camundongos A129 com MAYV	83
6.3.2 Infecção dos camundongos C57BL/6 com MAYV – Via de inoculação.....	84
6.3.3 Infecção dos camundongos C57BL/6 com MAYV e tratamento com Trametinib .	87
VII – CONCLUSÕES	92
VIII – REFERENCIAS	93
IX – PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES	100
Anexo I – Artigo submetido	101

I - INTRODUÇÃO

1.1 Alphavirus

1.1.1 Classificação

O gênero *Alphavirus* pertence à família *Togaviridae*. O gênero inclui 31 espécies, incluindo o Chikungunya vírus (CHIKV), Mayaro vírus (MAYV), vírus do rio de Ross (RRV) os vírus da encefalite equina Venezuelana, do Oeste e do Leste (V/W/E-EEV) e a espécie protótipo Sindbis vírus (SINV) (BROWN; WAN; KIELIAN, 2018; CHEN et al., 2018, p. 20; FROS; PIJLMAN, 2016). A origem do nome alphavirus, provém da classificação dos arbovírus feita em 1954 com base em testes de hemaglutinação e reação cruzada, em três grupos sorológicos: A, B e C. Posteriormente, os membros do grupo A foram classificados em um novo gênero denominado *Alphavirus* devido a letra A (CHEN et al., 2018). Critérios utilizados para a separação entre as espécies do gênero incluem: sequências de nucleotídeos e aminoácidos, características antigênicas, vetores, hospedeiros, doença associada e características ecológicas (CHEN et al., 2018).

Os alphavirus estão presentes em todos os continentes, incluindo a Antártida (LA LINN et al., 2001), além de diversas ilhas no globo e podem ser encontrados em uma grande diversidade de hospedeiros, incluindo peixes, mamíferos, aves e artrópodes. Os alphavirus são arbovírus, ou sejam são transmitidos entre vertebrados por artrópodes hematófagos sendo a grande maioria mosquitos, mas também incluindo outras espécies como piolhos e carrapatos (LA LINN et al., 2001; LINTHICUM et al., 1991). Ao menos um alphavirus, o Eilat vírus (EILV) se mostra restrito a mosquitos, sem hospedeiros vertebrados conhecidos (NASAR et al., 2012).

Os alphavirus também podem ser classificados de acordo com o complexo antigênico, sintomas e região do mundo no qual se originam. Os vírus do velho mundo são encontrados principalmente na Europa, Ásia e África e caracterizam-se por causarem poliartrite e erupções cutâneas. Eles pertencem ao complexo antigênico do Vírus da Floresta de Semliki (SFV). Os vírus do novo mundo são encontrados principalmente nas Américas, são principalmente associados com a encefalite e inclui três complexos antigênicos, o do VEEV, EEEV e WEEV. Os dois grupos desenvolveram estratégias distintas de interação com o hospedeiro, incluindo

tropismo celular e mecanismos de evasão do sistema imune, os quais resultam em patogêneses distintas (SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

1.1.2 Estrutura e Genoma dos Alphavirus

O gênero apresenta vírus envelopados com 65-70 nm de diâmetro com o RNA fita simples, senso positivo, envolto em um capsídeo proteico dentro de um envelope lipídico. O envelope consiste em uma bicamada lipídica derivada do hospedeiro nas quais 240 cópias das glicoproteínas E1 e E2 estão inseridas na superfície aparecendo como espículas na partícula. Pequenas quantidades da proteína 6K também são encontradas na membrana. A bicamada lipídica é enriquecida com colesterol e esfingolipídios (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; MENDES; KUHN, 2018) (Figura 1). O genoma apresenta tamanho aproximado de 11.8 kb, com regiões não traduzidas (UTR, do inglês *untranslated region*) nas extremidades 5' e 3' com sequências codificadoras entre elas (ORF, do inglês *open reading frame*). A primeira ORF é traduzida diretamente do RNA genômico na poliproteína p1234 que é clivada por proteases do vírus (nsP2), e do hospedeiro em quatro proteínas não estruturais (do inglês, *nonstructural Proteins* - nsPs), denominadas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, as quais formam o complexo de replicação viral. A segunda ORF é expressa através do RNA subgenômico 26S que é traduzido na poliproteína estrutural E3-E2-6K/TF-E1 e que posteriormente é autoclivada pela proteína do capsídeo (C). As proteínas E1 e E2 formam um heterodímero e são maturadas em glicoproteínas para comporem espículas triméricas que estão presentes no envelope viral. Uma espícula é formada por três dímeros (E1-E2), sendo responsável pela adesão e penetração viral (Figura 2) (FROS; PIJLMAN, 2016; JOSE; SNYDER; KUHN, 2009).

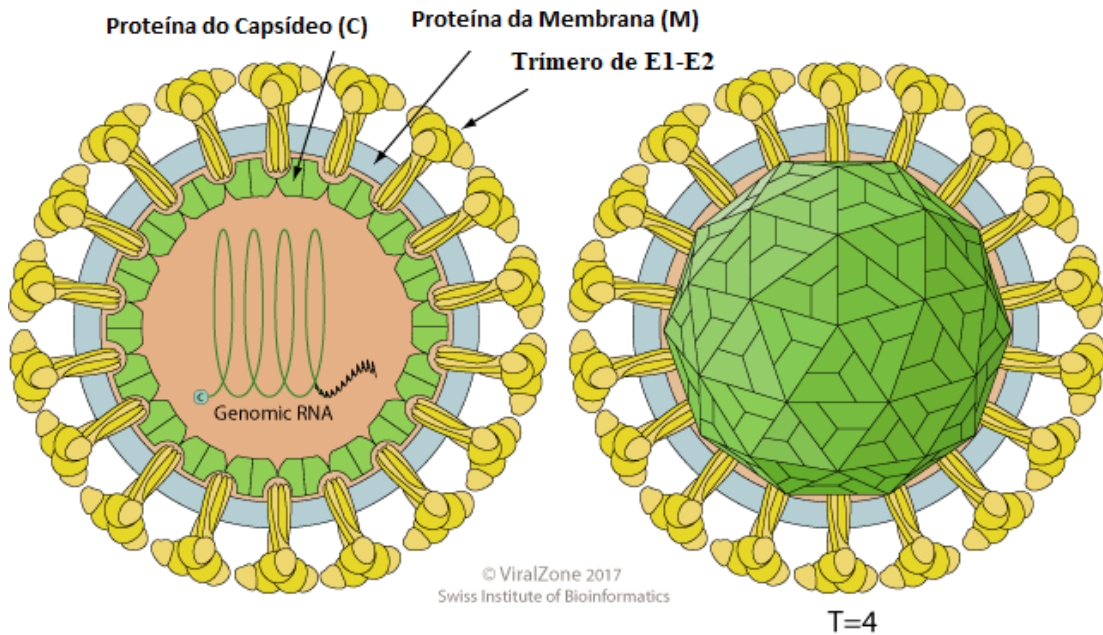


Figura 1: Estrutura geral da partícula dos Alphavirus – Partícula envelopada, com 65-70 nm de diâmetro, capsídeo com simetria icosaédrica (T=4). Envelope contém espículas formadas por trimeros de E1-E2.

Modificado de: https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species

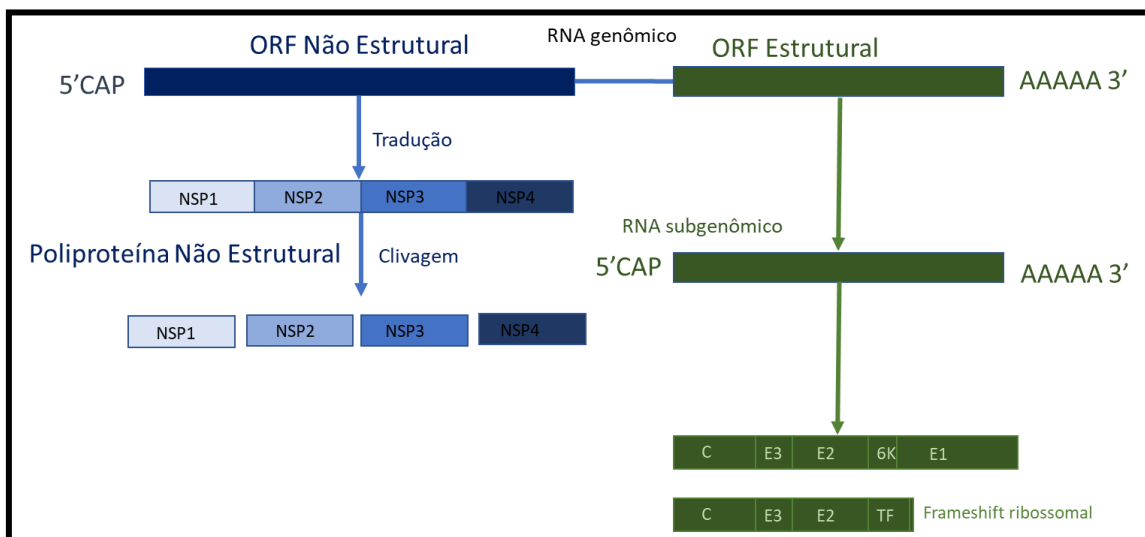


Figura 2: Genoma de Alphavirus – As proteínas não estruturais estão localizadas na primeira ORF na extremidade 5' e as estruturais na segunda ORF na extremidade 3'. Modificado de: https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species

A proteína C é composta por dois domínios: o N-terminal é pouco conservado, possui carga positiva e é responsável pela ligação com o RNA genômico e inativação da transcrição

do hospedeiro. O domínio C-terminal é bem conservado com atividade de protease autocatalítica, separando-a da poliproteína original (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; SHARMA et al., 2018).

A proteína E2 é composta de 3 domínios, um N-terminal com 260 aminoácidos seguido de um domínio com 100 aminoácidos e um C-terminal com 33 aminoácidos que interage com o nucleocapsídeo. E2 está associada com a ligação dos receptores celulares pelo vírus tendo papel essencial na adsorção e tropismo celular (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; WEGER-LUCARELLI et al., 2016).

A proteína E3 é pequena (aproximadamente 7 kDa) e é originada da proteína precursora p62 juntamente com E2. E3 serve como uma sequência sinalizadora para a translocação da poliproteína estrutural (E3-E2-6K/TF-E1) para o retículo endoplasmático. P62 na rede trans-Golgi forma espículas que se tornam fusogênicas quando E3 é clivada pela proteína furina, sendo essencial para a maturação do vírus (SNYDER; MUKHOPADHYAY, 2012; UCHIME; FIELDS; KIELIAN, 2013).

A proteína E1 é composta de 3 domínios, o domínio central I, domínio II e o domínio III semelhante a imunoglobulina (ROMAN-SOSA; KIELIAN, 2011). E1 cobre a maior parte da membrana lipídica e por sua vez é coberta pela proteína E2. E1 é responsável por mediar a fusão do envelope com a membrana da célula hospedeira durante a penetração viral, e é capaz de formar poros permeáveis a íons na membrana do endossomo, que facilita a acidificação do mesmo permitindo a fusão com E1 (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; WENGLER et al., 2003).

As proteínas 6K e TF são traduzidas do gene 6K sendo a proteína TF descoberta em 2008 traduzida através de *frameshift* ribossomal. As duas possuem 2 domínios, um N-terminal compartilhado e um C-terminal único. 6K é encontrada principalmente no interior da membrana celular e TF na partícula viral. Essas proteínas se mostram importantes para a liberação de partículas por brotamento (FIRTH et al., 2008; RAMSEY; MUKHOPADHYAY, 2017).

A proteína nsP1 tem tamanho de 60 kDa e apresenta três domínios: o domínio N-terminal apresenta uma metiltransferase sendo responsável por adicionar o 5' CAP ao RNA recém sintetizado. O domínio do meio ancora o complexo replicativo na membrana celular. O domínio C-terminal ainda não é bem caracterizado. A nsP1 também está associada a iniciação e manutenção dos intermediários do RNA fita negativa no complexo de replicação por mecanismos ainda não completamente esclarecidos (KUMAR et al., 2018; RUPP et al., 2015).

A proteína nsP2 tem tamanho de 90 kDa e apresenta dois domínios principais: o domínio N-terminal com função helicase, o domínio C-terminal com função protease. nsP2 é uma proteína multifuncional, podendo agir como protease, metiltransferase, helicase, além de ser um importante fator de virulência, sendo capaz de suprimir a transcrição e tradução do hospedeiro e inibir respostas imunes mediadas por interferon (BAKAR; NG, 2018; BHALLA et al., 2016; RUPP et al., 2015).

A proteína nsP3 tem tamanho de 60 kDa e apresenta três domínios: um macrodomínio N-terminal bem conservado com função fosfatase e de ligação com ácidos nucleicos, um domínio único de alphavirus (AUD, do inglês *alphavirus unique domain*) com importância na síntese de RNA, processamento da poliproteína e neurovirulência, por mecanismos ainda não elucidados, e um domínio C-terminal variável com grande tolerabilidade a mutações (BAKAR; NG, 2018; RUPP et al., 2015).

A proteína nsP4 tem tamanho de 70 kDa e é a mais conservada das proteínas não estruturais, sendo a responsável pela síntese de RNA pelo complexo replicativo viral. Seu domínio C-terminal é uma polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp do inglês *RNA dependent RNA polymerase*) com alta similaridade com outras RdRps virais (BAKAR; NG, 2018; PIETILÄ; HELLSTRÖM; AHOLA, 2017; RUPP et al., 2015).

1.1.3 Ciclo de multiplicação

O processo de penetração viral na célula hospedeira inicia-se através da ligação dos receptores celulares com o vírus. Receptores celulares específicos podem variar de acordo com a célula infectada e para diferentes espécies de alphavirus, em particular a família dos glicosaminoglicanos. A glicoproteína viral E2 é a principal responsável pela ligação com os receptores celulares, embora E1 também seja associada com a ligação e a fusão da membrana. Devido a diversidade de hospedeiros dos alphavirus é necessário um mecanismo que facilite a entrada dos vírus nos diferentes tipos celulares. Existem duas principais hipóteses para esse mecanismo: a primeira sugere que o vírus utilize receptores celulares bem conservados entre diferentes grupos biológicos, como por exemplo o receptor laminina conservado entre insetos e vertebrados, utilizado pelo Sindbis vírus (WANG et al., 1992). A outra sugere que os alphavirus sejam capazes de se ligar a uma variedade de receptores celulares mediada por pequenas modificações nas sequências de aminoácidos de E1 e/ou E2 (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; TUCKER; GRIFFIN, 1991). Possivelmente as duas hipóteses estejam corretas explicando a grande diversidade de hospedeiros dos alphavirus.

A ligação do vírus com os receptores celulares causa mudanças conformacionais nas proteínas E1-E2 levando a endocitose da partícula mediada por clatrina. Dentro do endossomo, a acidificação do mesmo causa uma mudança conformacional em E1-E2 causando a liberação do nucleocapsídeo (NC) (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015).

No citoplasma, o NC deve ser desmontado expondo o RNA genômico para tradução por um mecanismo que não influencie os NC recém-formados pós replicação. Para isso, duas etapas são necessárias: primeiro é a diminuição do pH no citoplasma que ocorre devido a mudança de E1 em canal de íon que permite a efusão de H⁺ do endossomo para o citoplasma. E a segunda é a interação das proteínas C com os ribossomos (JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; SILVA; DERMODY, 2017; VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015).

Após a exposição do RNA genômico, o mesmo é traduzido em uma poliproteína: p1234, que é clivada pela protease localizada em nsP2 em p123 e nsP4 que juntamente com proteínas do hospedeiro formam uma replicase temporária que sintetiza um RNA viral senso negativo completo. A síntese dessa fita negativa é diretamente associada com a formação de compartimentos de replicação viral denominadas esférulas. Essas estruturas vesiculares pequenas se formam na membrana plasmática e são os locais onde ocorre a síntese do RNA viral e do RNA subgenômico. Na borda da esférula se encontram as nsPs que protegem os RNAs de dupla fita (dsRNA, do inglês, *double stranded RNA*) intermediários da degradação por mecanismos de reparo celular. Nas fases posteriores do ciclo essas esférulas são internalizadas formando vacúolos citoplasmáticos (CPV-I, do inglês *cytoplasmic vacuole*). Acumulação da proteína p123 leva o processamento completo da poliproteína que causa uma mudança na replicase que passa a utilizar o RNA senso negativo para amplificação do RNA genômico e produção do RNA subgenômico 26S utilizado para síntese da poliproteína estrutural C-pE2(E3-E2)-6K-TF-E1. A proteína C é traduzida inicialmente e clivada da poliproteína por atividade auto-proteolítica, se ligando aos RNA genômicos recém-sintetizados, formando NCs. A poliproteína remanescente gera dois produtos intermediários, E3-E2-6K-E1 e E3-E2-TF por *frameshift* ribossomal, que seguem para o retículo endoplasmático e complexo de Golgi onde a ação das proteases celulares leva a clivagem de 6K/TF, E1 e pE2 (E3-E2). E1 e pE2 formam um heterodímero e após mudanças conformacionais e modificações pós-traducionais, incluindo a clivagem de E3 pela furina celular, formam espículas maduras na membrana plasmática, NCs formados no citoplasma seguem para a membrana plasmática onde interagem com essas glicoproteínas do envelope e os vírions então são liberados da célula por

brotamento (BROWN; WAN; KIELIAN, 2018; JOSE; SNYDER; KUHN, 2009; SILVA; DERMODY, 2017) (Figura 3)

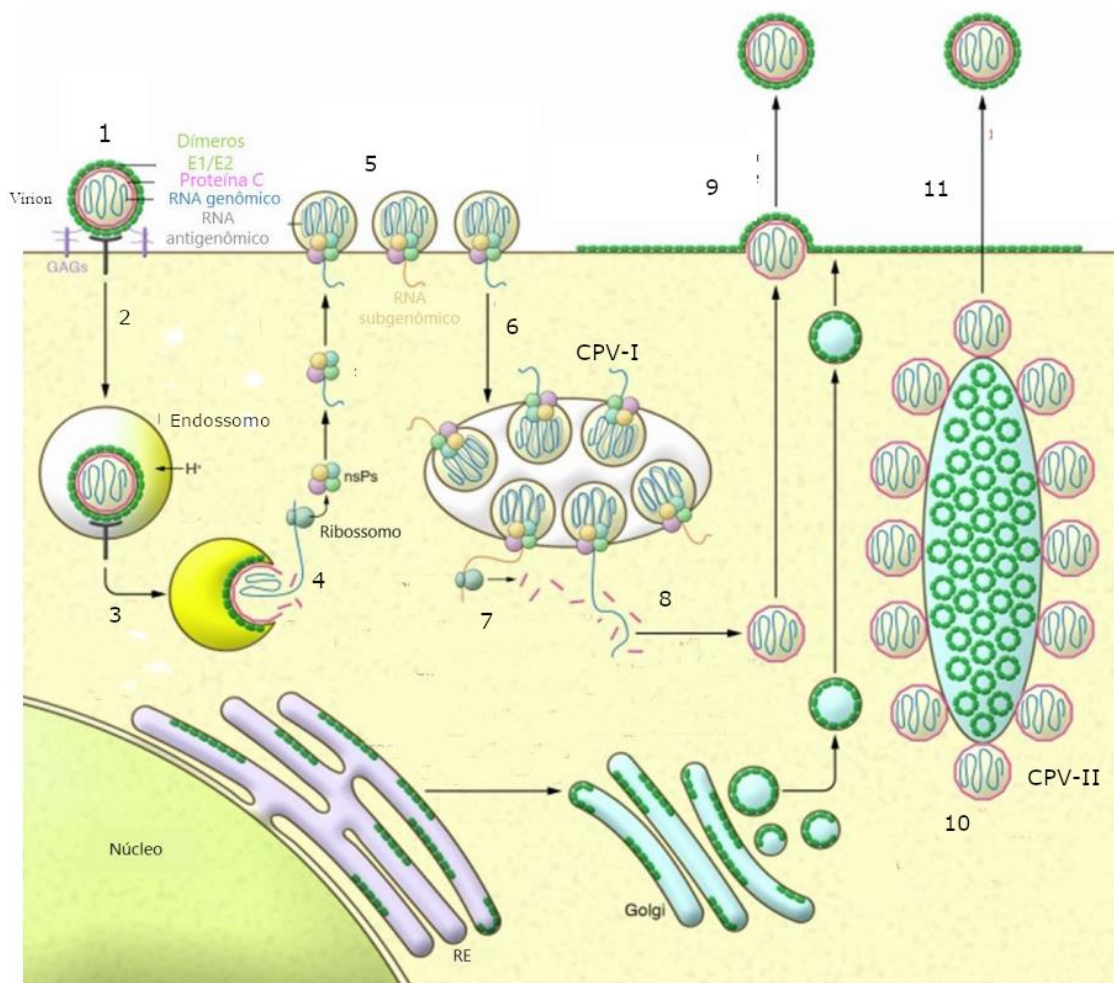


Figura 3: Ciclo de multiplicação dos Alphavirus – 1) O ciclo de multiplicação inicia com a adesão do vírus na superfície celular, mediada pela proteína E2 e receptores. 2) Penetração por endocitose mediada por clatrina 3) Acidificação do endossomo causa a fusão com o envelope viral levando a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma 4) Desnudamento do nucleocapsídeo e liberação do RNA genômico 5) Formação de esférulas e replicação do RNA 6) Internalização das esférulas e formação do CPV-I 7) Tradução do RNA subgenômico, produção da poliproteína estrutural e translocação da mesma para o retículo endoplasmático 8) Capsídeo e RNA genômico interagem para montagem do nucleocapsídeo 9) NCs interagem com as

proteínas E1-E2 na MP e os vírions maduros brotam da célula **10**) Em fases posteriores do ciclo, CPV-II são formados contendo um agregado de NCs e E1-E2 **11**) CPV-II atuam como sítio de montagem e transporte facilitando a formação de vírions maduros. Imagem adaptada de Silva and Dermody (2017).

1.2 Mayaro virus

1.2.1 Epidemiologia

MAYV é um arbovírus e parte do complexo antigênico Semliki, que também inclui o CHIKV. A maior parte dos estudos epidemiológicos do MAYV se limitam a testes sorológicos. O primeiro relato de caso ocorreu em 1954 em Trinidad e Tobago quando o vírus foi isolado de amostras de sangue de cinco trabalhadores rurais que apresentavam uma doença febril na cidade de Mayaro, origem do nome do vírus (ANDERSON et al., 1957). Em estudos retrospectivos, MAYV foi encontrado em soros de pacientes coletados durante a construção do canal do Panamá entre 1904-1914 (SRIHONGSE; STACY; GAULD, 1973). Nos anos seguintes, o vírus foi encontrado em diversos países das Américas Central e do Sul, normalmente próximo a áreas de florestas tropicais, como Brasil (1955), Colômbia (1958-1960), Bolívia (1959), Suriname (1964), Peru (1965), Equador (1997), Guiana Francesa (1998), Venezuela (2000), México (2001), Panamá (2010) e Haiti (2015) (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019) (Figura 4).

Alguns casos importados já foram reportados nos EUA (TESH et al., 1999), França (LLAGONNE-BARETS et al., 2016), Alemanha (THEILACKER et al., 2013), Suíça (NEUMAYR et al., 2012). No Brasil, o primeiro relato foi em 1955, no Pará, próximo ao rio Guama, com 6 linhagens do vírus isoladas de 6 pacientes (CAUSEY; MAROJA, 1957). Em 1978 em Beterra, Pará, 55 casos foram confirmados (PINHEIRO et al., 1981). Os primeiros casos fora do Pará ocorreram no estado de Tocantins em 1991 (AZEVEDO et al., 2009), e posteriormente casos foram confirmados em outros estados do Brasil, incluindo Amazonas, Mato Grosso e Goiás (ESPOSITO; FONSECA, 2017). O aumento da incidência do MAYV para regiões fora do Norte do Brasil, pode indicar uma possível disseminação do vírus pelo país, aumentando os riscos de uma possível epidemia, similar ao que ocorreu com o CHIKV no passado.

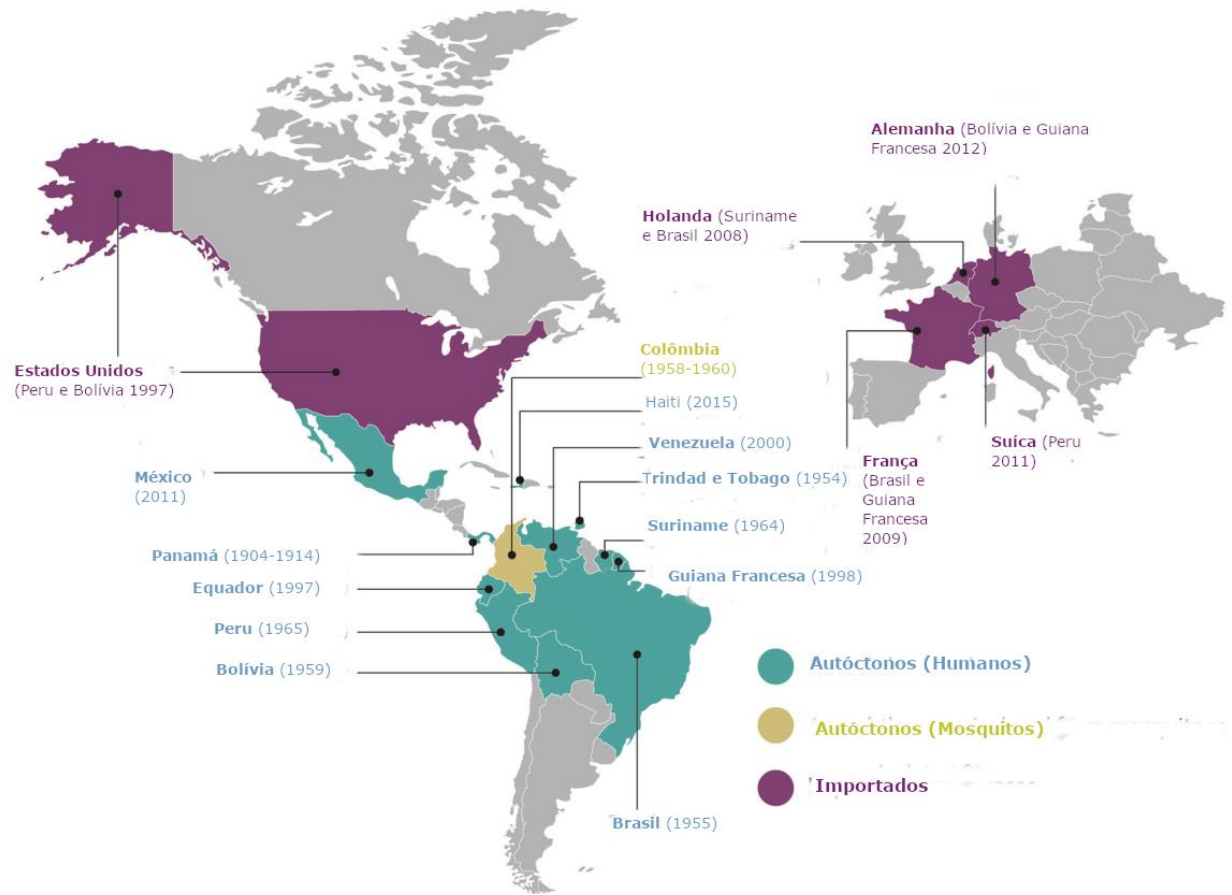


Figura 4: Casos de MAYV no mundo – Cores identificam os tipos de casos e o ano ao primeiro caso reportado no país. Adaptado de Acosta-Ampudia, 2018.

1.2.2 Filogenia

MAYV pertence à família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus* e é classificado em três genótipos: genótipo D (do inglês *widely dispersed*), distribuído pela América do Sul e Caribe que inclui a maior parte dos isolados entre 1954 e 2003, genótipo L (do inglês *limited*), encontrado principalmente na região Norte do Brasil, e o genótipo N (do inglês *new*) com uma amostra encontrada no Peru em 2010 (Figura 5). A aparente restrição geográfica observada para o genótipo L (e possivelmente o N), está provavelmente associada a um viés nas amostras analisadas, no entanto deve-se considerar a possibilidade dessa restrição estar associada a algum mecanismo de competência e distribuição vetorial, vias alternativas de amplificação em vertebrados e outros mecanismos ainda não elucidados (AUGUSTE et al., 2015).

Análises filogenéticas e similaridade em sequências de nucleotídeos colocam o MAYV no clado do Semliki, e análises da proteína E1 mostram que o MAYV é filogeneticamente próximo

ao *Una vírus* (UNAV), o único outro vírus sul-americano também pertencente ao grupo dos vírus do velho mundo (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; LAVERGNE et al., 2006).



Figura 5: Árvore filogenética MAYV – Filogenia feita pelo método de máxima verossimilhança utilizando genomas completos de 29 linhagens de MAYV. Nós indicam valores de *bootstrap* maiores que 90%. Nomes indicando: ano de isolamento, nome da espécie e país de isolamento. Barra de escala indica porcentagem de divergência na sequência de nucleotídeos. Fonte: (AUGUSTE et al., 2015)

1.2.3 Mecanismos de Patogenicidade

Os alphavirus disseminam via linfática e microvascular após a picada do mosquito. O sangue infectado carrega os vírus, livres ou infectados em monócitos até o fígado e o baço onde a replicação viral ocorre contribuindo com a disseminação. O vírus então chega os ossos, músculos e articulações causando a fase aguda da doença. Durante essa fase é observada um

aumento na concentração de mediadores inflamatórios, que podem variar de acordo com o vírus (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018). Para o MAYV no trabalho de (SANTIAGO et al., 2015) foi demonstrado aumento das ILs (interleucinas)-6, IL-7, IL- 8, IL-12, IL-15, IP-10, além da quimiocina MCP-1, (do inglês *Monocyte chemoattractant protein -1*). Em pacientes com artralgia persistente foi observado altos níveis de IL-13 quando comparados aos outros pacientes. Além disso, IL-7, já foi associada com inflamação crônica e dano as articulações, e VEGF (do inglês, *Vascular endothelial growth factor*), com papel pró-inflamatório e anti-apoptose durante a artrite.

Estudos *in vitro* demonstraram que o MAYV é capaz de multiplicar em macrófagos, causando apoptose e síntese de TNF, que por sua vez promove uma resposta inflamatória característica de artrite. Produção de TNF está associada a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), cujo aumento foi observado em células infectadas precedendo o pico da multiplicação viral (CAMINI et al., 2017; CAVALHEIRO et al., 2016).

1.2.4 Ciclo de Transmissão

O MAYV é primariamente transmitido por mosquitos fêmeas do gênero *Haemagogus*, principalmente da espécie *Haemagogus janthinomys*. Esses mosquitos são pouco antropofílicos, no entanto, já foi demonstrado a capacidade de transmissão de vetores secundários como *Culex*, *Sabethes*, *Psorophora*, *Mansonia* e *Aedes* (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018). Os mosquitos são infectados pelo vírus quando se alimentam do sangue do hospedeiro infectado, durante o período de alta viremia. O vírus infecta células epiteliais do intestino médio e mesentério. O vírus multiplica e migra pela lâmina basal até chegar a hemolinfa. Finalmente o vírus alcança a glândula salivar onde estabelece uma infecção persistente e a picada do mosquito transmitirá o vírus através da saliva para a corrente sanguínea do hospedeiro. Como outros alphavirus, o MAYV pode ser encontrado em uma diversidade de hospedeiros vertebrados, incluindo, primatas não humanos, marsupiais, pássaros e roedores (CALISHER et al., 1974; DE THOISY et al., 2003; MOTA et al., 2015) (Figura 6). Com base nos dados epidemiológicos atuais, acredita-se que a infecção em humanos acontece de maneira acidental, em indivíduos expostos a ambientes florestais, onde há maior chance de serem expostos a mosquitos infectados.

Devido a restrição geográfica dos hospedeiros e vetores do MAYV, a maior parte dos casos é restrito a áreas rurais próximas a florestas tropicais. A possibilidade da urbanização do MAYV pode levar a uma epidemia futura e dois fatores principais sugerem isso. O MAYV tem características muito semelhantes ao CHIKV, que tem um histórico de urbanização e

disseminação e o vírus é capaz de infectar mosquitos do gênero *Aedes*, e estudos experimentais já mostraram a competência do *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, ambos antropofílicos (ESPOSITO; FONSECA, 2017; LONG et al., 2011; MOTA et al., 2015; SMITH; FRANCY, 1991). Não há relatos de vias de transmissão alternativas do MAYV, como vertical ou sexual, no entanto, um caso foi reportado de uma infecção acidental em laboratório via aerossol na Guiana Francesa (JUNT et al., 1999).



Figura 6: Ciclo de transmissão do MAYV - O vírus é mantido na natureza em um ciclo enzoótico, transmitido por mosquitos para primatas não humanos, roedores, pássaros e marsupiais. Pessoas próximas a áreas florestais podem ser infectadas.

1.2.5 Aspectos Clínicos

A febre do Mayaro causa uma doença febril com sintomas não específicos, similar a febre do Chikungunya, e pode ser dividida em duas fases: aguda e convalescente. A fase aguda é caracterizada por um período de viremia curto (3-4 dias), seguida pelo período de incubação (1-12 dias), e o surgimento dos sintomas que incluem: febre alta, dores de cabeça, artralgia, mialgia, edemas nas articulações, e erupções cutâneas que surgem no quinto dia da doença e persistem por até três dias. Outros sintomas incluem dores retro-orbitais, fotofobia, dores abdominais, dores nas costas, náusea e diarreia (AZEVEDO et al., 2009; GIOVANNI DE-SIMONE, 2014; MOTA et al., 2015) (Figura 7). Os sintomas desaparecem entre 3-10 dias. Após a fase aguda inicia-se a fase convalescente, cuja principal característica é a artrite e artralgia persistentes que podem durar de algumas semanas até 6 meses. A artralgia é debilitante

e afeta principalmente as mãos, pulsos, cotovelos, pés e joelhos, e também pode causar fraqueza e sensibilidade nos membros (GIOVANNI DE-SIMONE, 2014; MOTA et al., 2015). Outras complicações também podem surgir, incluindo febre intermitente, miocardite, complicações neurológicas e morte (NAVARRETE-ESPINOSA; GÓMEZ-DANTÉS, 2006).

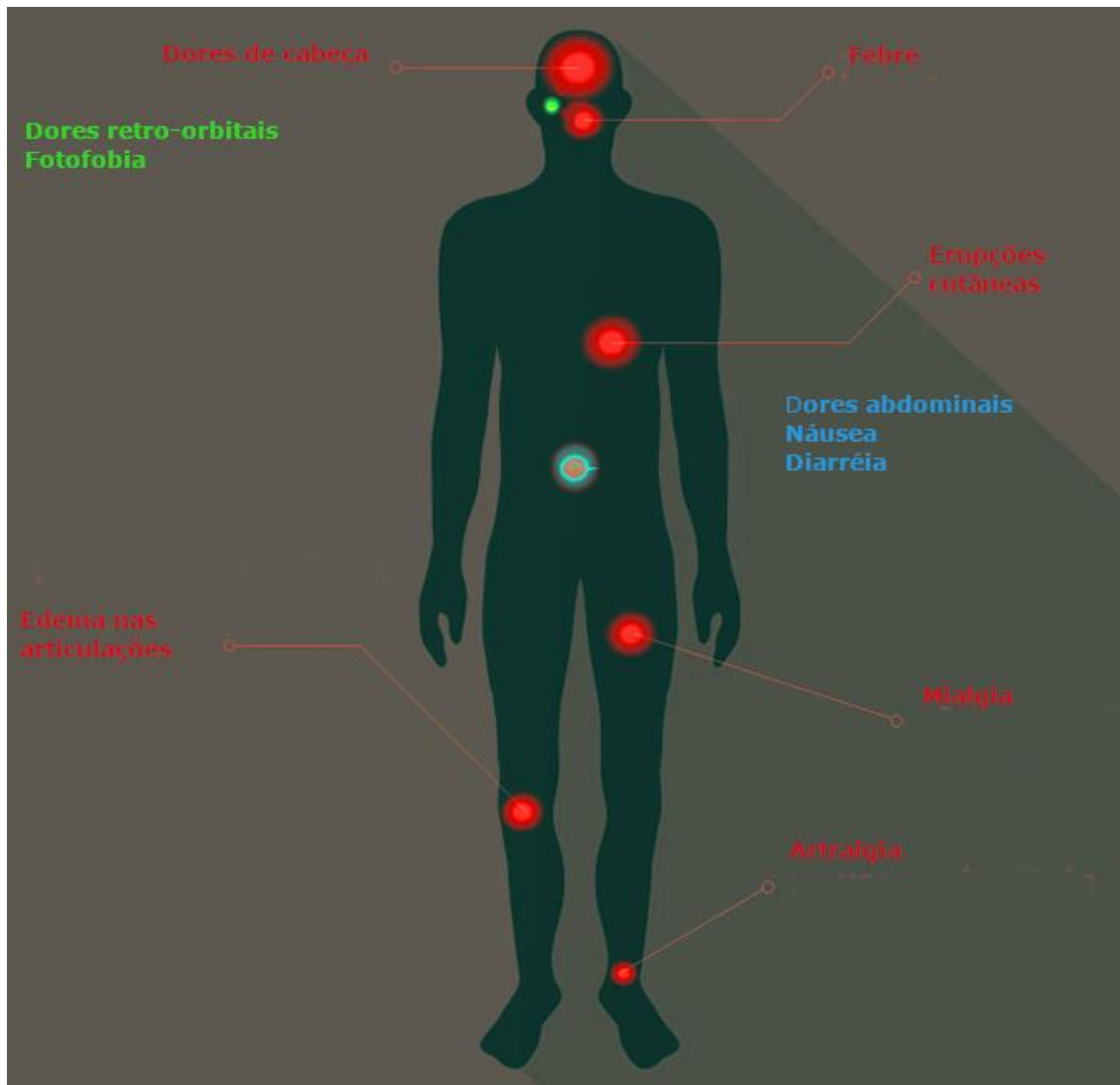


Figura 7: Sintomas comuns MAYV – Em vermelho, sintomas que ocorrem mais frequentemente. Em verde e azul, sintomas mais incomuns na região dos olhos e abdômen respectivamente.

1.2.6 Diagnóstico

A febre do Mayaro causa sintomas muito semelhantes as causadas por outros arbovírus, em particular CHIKV, Dengue vírus (DENV) e vírus da febre amarela (YFV), o que causa muitos casos de falsos diagnósticos levando a subnotificação de casos de MAYV. Como parte do complexo antigênico Semliki, o MAYV compartilha sítios antigênicos com outros membros

do grupo, o que leva a reações cruzadas com anticorpos policlonais. Testes sorológicos podem detectar o vírus, células infectadas, antígenos recombinantes e proteínas virais. Cinco testes sorológicos são usados para detecção do MAYV: teste de inibição de hemaglutinação, fixação de complemento, neutralização, ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) e teste imunoenzimático com células infectadas. Devido a reatividade cruzada com outros alphavirus, idealmente mais de um teste deve ser realizado (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018).

O método mais confiável para detecção de MAYV, e alphavirus em geral, é o isolamento viral do sangue do paciente, no entanto o curto período de viremia, o tempo necessário e as ferramentas necessárias fazem com que esse método raramente seja utilizado, normalmente sendo substituído pela PCR para detecção do genoma viral no intervalo de tempo da viremia. Técnicas de PCR são capazes de detectar de maneira específica e com alta sensibilidade o genoma viral, e são utilizadas em uma variedade de diagnósticos (ACOSTA-AMPUDIA et al., 2018; GIOVANNI DE-SIMONE, 2014).

1.2.7 Tratamento, Vacina e Controle de vetores

Assim como outros arbovírus, não existe tratamento para a infecção causada pelo MAYV, e apenas suporte é oferecido ao paciente para alívio dos sintomas. Devido as semelhanças com os sintomas causados pelo CHIKV, o tratamento do MAYV é em boa parte baseado no que já se usa pra o CHIKV (GIOVANNI DE-SIMONE, 2014; MOTA et al., 2015). Para dor e a febre são utilizados analgésicos ou drogas anti-inflamatórias não esteroidais. Corticosteróides já foram administrados em algumas situações para o CHIKV, no entanto sua eficácia não é comprovada (MOTA et al., 2015). Cloroquina, utilizada no tratamento da malária mostrou-se efetiva no tratamento de artralgia persistente causada por CHIKV (TAUBITZ et al., 2007).

Devido a limitada circulação do MAYV, em particular quando comparado com outros arbovírus, apenas duas tentativas de produzir uma vacina foram registradas na literatura (MOTA et al., 2015). A primeira tentativa foi em 1976, utilizando uma linhagem de MAYV inativada com formalina, e testada em camundongos CD-1, e avaliando a resposta de anticorpos por teste de neutralização por redução de placas (PRNT do inglês, *Plaque reduction neutralization test*) (ROBINSON et al., 1976). A segunda foi em 2014, com uma linhagem atenuada, através da substituição do sitio interno de entrada do ribossomo (IRES, do inglês, *internal ribosome entry site*) pelo vírus da encefalomiocardite (EMCV). Essa vacina se mostrou eficiente em modelo animal (CD-1) protegendo contra letalidade (WEISE et al., 2014).

Sem tratamentos específicos e sem vacinas, o mais efetivo combate ao MAYV, e a maior parte dos arbovírus, é o controle dos vetores. O MAYV circula em áreas próximas a florestas, logo evitar essas áreas e em consequência o contato com o mosquito é a única prevenção possível. Mosquitos do gênero *Aedes*, agem como vetores para uma diversidade de arbovírus, incluindo DENV, Zika vírus (ZIKV) e CHIKV, e são uma preocupação também para o MAYV devido ao potencial de urbanização, dessa forma o combate a esse mosquito nos ambientes urbanos já realizado pode também ser importante para o MAYV.

1.3 Desenvolvimento de antivirais

Antivirais de ação direta vêm sendo usados como ferramentas eficientes contra o tratamento de doenças crônicas, como por exemplo, vírus da imunodeficiência humano (HIV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite B (HBV), assim como algumas doenças agudas como a influenza. Potenciais compostos antivirais podem ser divididos em 2 grupos, de acordo com o alvo deles: compostos que tem como alvo o vírus e os que tem como alvo o hospedeiro. Alvos virais incluem, mas não se limitam à: polimerase dependente de RNA, protease viral, helicase, e proteínas do envelope. Juntando-se o conhecimento das estruturas obtidas por cristalografia com os bancos de dados de compostos químicos, é possível identificar interações entre a proteína alvo e o potencial composto. O problema desse método, no entanto, é que fatores virais e/ou celulares podem interferir com a interação química prevista e o composto se comportar de maneira diferente da prevista. Um outro método envolve identificar compostos capazes de inibir a atividade enzimática de fatores virais. Novamente, fatores celulares e/ou virais podem interferir com a interação, assim como a disponibilidade do fator viral para o composto. Por último, o uso de fatores virais invariavelmente levaria a seleção de mutantes resistentes à droga e a seu eventual desuso (LAI; LIN; HSIEH, 2017; LIM et al., 2013).

Alvos celulares vêm se mostrando mais promissores, a inibição de fatores celulares torna a seleção de mutantes resistentes à droga improvável, além disso, é mais fácil caracterizar-se o efeito da droga, analisando-se, por exemplo, a expressão de proteínas virais, produção viral, efeito citopático e funções celulares. Possíveis alvos incluem receptores celulares, cinases, componentes de membrana e outros. Uma possível desvantagem seriam os efeitos secundários no hospedeiro, no entanto, espera-se que para o tratamento de doenças agudas, estes sejam toleráveis (ACOSTA; BARTENSCHLAGER, 2016; LAI; LIN; HSIEH, 2017; LIM et al., 2013).

1.4 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e vias de sinalização

As MAPK são um grupo de proteínas sinalizadoras evolutivamente conservadas em eucariotos, envolvidas na resposta a uma grande diversidade de estímulos tais como fatores de crescimento [p.ex. fator de crescimento de epiderme (EGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)], citocinas, hormônios (p.ex. insulina), estresse e infecções microbianas. As MAPKs regulam uma grande variedade de eventos celulares, incluindo: proliferação celular, apoptose, transcrição de genes, diferenciação celular e plasticidade neuronal (BONJARDIM, 2017; KRISHNA; NARANG, 2008; YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2013)

Existem quatro grandes grupos de MAPKs em mamíferos: ERK (*extracelular signal-regulated kinase*), ERK 5, JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e p38. As cascatas ERK em geral respondem a fatores de crescimento, enquanto que JNK e p38 respondem a estresse (KRISHNA; NARANG, 2008; YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2013). Apesar das diferenças existentes entre MAPKs, o mecanismo de sinalização é semelhante, organizado em três níveis que atuam em sequência formando uma cascata sinalizadora. O primeiro nível é composto de uma MAP3K, uma serina-treonina cinase que é ativada pela fosforilação e interação com GTPases. As MAP3K por sua vez fosforilam uma MAP2K, ativando-a. A MAP2K então fosforila e ativa uma MAPK que fosforila substratos alvo tais como fatores de transcrição (fos, jun, egr, etc.), outras cinases (MNK, RSK, FAK, AMPK, etc.), proteínas semelhantes a componentes do citoesqueleto (proteína associada a microtúbulos - MAP1/2, etc.) (Figura 8) (KRISHNA; NARANG, 2008; YANG; SHARROCKS; WHITMARSH, 2013).

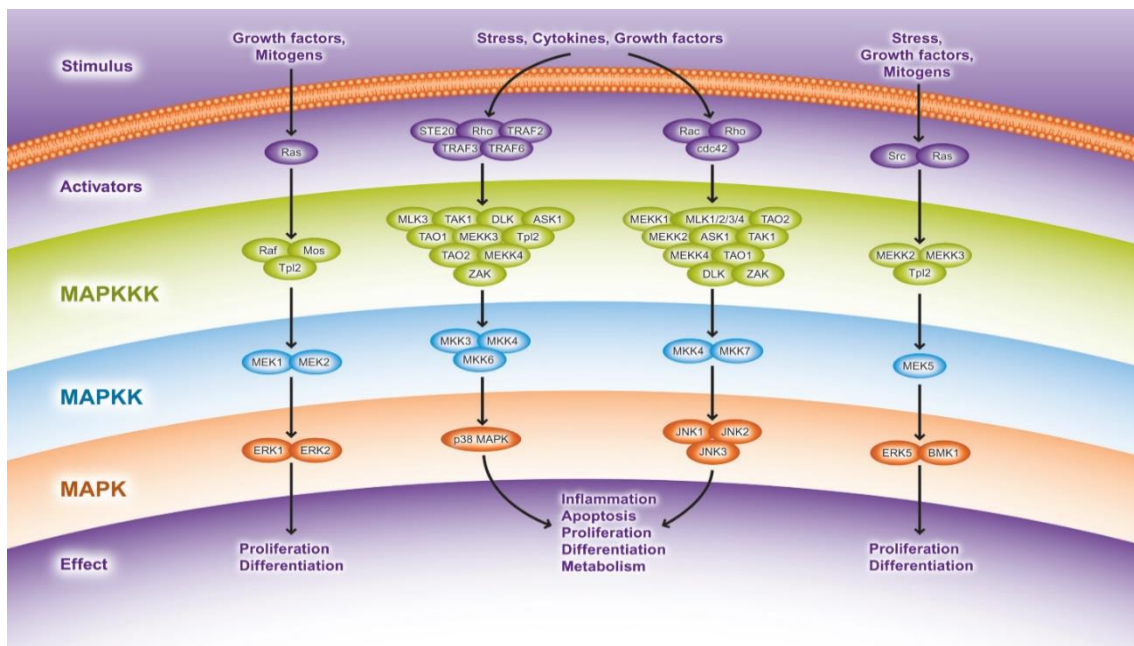


Figura 8: Cascatas de sinalização envolvendo MAPK – As MAPKs são organizadas em três diferentes níveis que formam uma cascata de sinalização. MAP3K fosforila e ativa MAP2K, que por sua vez fosforila e ativa MAPK, resultando em uma resposta biológica distinta.

Fonte: (<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=15121>)

1.4.1 Cascata de sinalização MEK/ERK

ERK foi a primeira MAPK descoberta, suas vias de sinalização são as mais bem estudadas. A ativação da cascata ERK é dependente de uma grande quantidade de sinais, em particular fatores de crescimento. As duas MAPKs ERK1 e sua isoforma ERK2 possuem, respectivamente, massa molecular de 43 e 41 kDa com 83% de similaridade. ERK1 e ERK2 regulam uma variedade de substratos envolvidos em processos celulares como crescimento, sobrevivência, motilidade e diferenciação celular (CARGNELLO; ROUX, 2011). Também já foi mostrado que ERK1/2 promove a ativação de IKK- α (*Inhibitor of Kappa B Kinase-alpha*) controlando a translocação de NF- κ B para o núcleo onde promove a transcrição de genes relacionados a resposta imune e inflamatória e apoptose.

Na cascata de fosforilação, acima de ERK1/2 encontram-se as MAP2Ks MEK1 e MEK2 e acima delas as MAP3K. As isoformas Raf (A-Raf, B-Raf e C-Raf) são as mais bem estudadas MAP3K, e são as mais frequentemente ativadas para regulação da via ERK. Além delas, Mos, Tpl2 e outras MAP2K também podem ativar a cascata, mas são dependentes de estímulos mais específicos (ALBARNAZ et al., 2014; CARGNELLO; ROUX, 2011; KOLCH; ARTICLE, 2000; KRISHNA; NARANG, 2008).

1.4.2 MAPKs e infecção viral

ERK, JNK e p38 são ativadas durante várias doenças, inclusive infecções virais, tendo importante papel em todo o ciclo de replicação viral e no processo inflamatório (CARGNELLO; ROUX, 2011). Diversos trabalhos com vírus da família *Poxviridae*, em especial VACV, associaram a importância das MAPKs para o ciclo de multiplicação viral. Já durante a adsorção/penetração do VACV na célula, o vírus estimula MEK/ERK através da expressão do gene c-Fos (de Magalhães et al., 2001). Na penetração, o vírus leva a expressão de EGR-1 pela manipulação da via de sinalização MEK/ERK/RSK2/Elk-1/EGR-1 dependente de VGF, e a alteração do mesmo, por meios farmacológicos ou genéticos causa redução significativa na produção viral (ANDRADE et al., 2004). A manipulação de MEK/ERK pelo vírus nos estágios iniciais da infecção também é essencial para a expressão dos genes virais

O1L, F1L e C11R necessários para a atividade constante da via, manutenção sobrevivência celular e resposta contra o sistema imune (BONJARDIM, 2017).

Com relação às famílias dos vírus de RNA, diversas MAPKs estão associadas a biologia desses vírus. Na família *Orthomyxoviridae*, os Influenza virus são capazes de ativar quatro diferentes vias de MAPKs (ERK, JNK, p38 e ERK5) com destaque para via de Raf/MEK/ERK essencial para a replicação eficiente dele. Na família *Filoviridae*, o vírus do Ebola tem sua virulência mediada pela glicoproteína de envelope decorrente da fosforilação de ERK-1 e ERK-2. Outras famílias com trabalhos associando MAPKs incluem *Coronaviridae*, *Picornaviridae* e *Retroviridae* (ANDRADE et al., 2004, p. 2; PLESCHKA, 2008; ZAMPIERI et al., 2007)

Dentro da família *Flaviviridae*, vários estudos associam a importância do papel das MAPKs no desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, além da participação das mesmas no ciclo de multiplicação do vírus (PLESCHKA, 2008; SATO et al., 2006, p. 200). Trabalhos feitos pelo GTS (Grupo de Transdução de Sinal) também mostram a importância da via de MEK/ERK para o vírus da febre amarela e a inibição farmacológica da via reduz a replicação do mesmo em até ~99%, além disso, tratamento de camundongos BALB/C infectados reduziu o título viral no cérebro (ALBARNAZ et al., 2014).

Com relação aos alphavirus, existem menos estudos associados com as MAPKs. Varghese et. al., mostraram a ativação das MAPKs: ERK, p38 e JNK, e o uso do composto Berberine reduziu a atividade dessas MAPKs e foi capaz de inibir a síntese de RNA e proteínas do CHIKV, e reduzir o título em diversas linhagens celulares (VARGHESE et al., 2016). Outro estudo mostrou que a inibição de ERK1/2 pela molécula Ag-126 inibe a multiplicação viral do VEEV, através da interferência na etapa de desnudamento e exposição do RNA genômico viral e aumentando a sobrevivência de células infectadas (Referencia).

1.4.3 MAPKs como potenciais fármacos antivirais

Esta via de sinalização é um importante alvo de fármacos para muitas doenças, sendo considerada como uma importante via para as neoplasias, na terapia anticâncer. Os inibidores desta via podem atuar em qualquer uma das proteínas cinases da cascata de sinalização (CAUNT et al., 2015). O primeiro inibidor de ERK foi descoberto em 1995, o PD98059, o qual se mostrou um inibidor alostérico de MEK1/2 capaz de agir independente da presença de ATP (DUDLEY et al., 1995). Por não serem competitivos, inibidores de ERK tem maior especificidade do que outros inibidores de cinases (CAUNT et al., 2015), o que pode facilitar o

estudo desses inibidores como potenciais antivirais. Dentre os potenciais inibidores de MEK, um importante inibidor utilizado contra infecções virais é o Trametinib. Este é um inibidor de MEK1/2 altamente específico e potente, com IC50 de 0,92 nM e 1.8 nM. Ele é um fármaco (Meknist) aprovado para uso em humanos e é utilizado para o tratamento contra melanoma (FDA, 2018). E sua atividade antiviral já foi testada contra o vírus da 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 de Transdução de Sinais (GTS) sob depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com número do processo: BR 102013021402-7, (BONJARDIM, 2017).

1.5 Modelos murinos para o MAYV

Modelos animais são amplamente utilizados em estudos de avaliação da infecção viral. Existem muitos tipos de animais que podem ser modelos experimentais de laboratório. Dentre esses modelos, alguns possuem especial destaque para estudos com arboviroses: Primatas não-humanos (PNHs) e camundongos. PNHs, são melhores modelos por apresentarem características mais próximas aos humanos, mimetizando os mecanismos fisiopatológicos observados em humanos, no entanto modelos com PNHs são extremamente laboriosos principalmente devido à dificuldade e custo de manutenção. Camundongos por outro lado, são de fácil e barata manutenção, apresentam rápida procriação, com um ciclo de vida curto, e compartilham funções fisiológicas e características genéticas com humanos.

Estudos *in vivo*, são uma importante ferramenta de avaliação de qualquer doença, devido a todas as interações, parte de um sistema complexo, que o modelo *in vitro*, não consegue mimetizar, tornando essencial a avaliação de potenciais antivirais em modelo animal. Estudos com o MAYV *in vivo*, são limitados, principalmente se comparados a outros arbovírus como o CHIKV. Animais de linhagens selvagens (*WT*, do inglês *Wild type*), testados incluem o BALB/C, C57BL-6 e SV129. Essas linhagens não apresentam sinais clínicos graves quando infectados com o MAYV, apresentando uma infecção localizada com quadro histopatológico similar àqueles observados em humanos. Animais mais jovens podem ser utilizados para se observar um quadro mais disseminado (até 15 dias de idade) devido a imaturidade do sistema imune (DA SILVA CAETANO et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2019; SANTOS et al., 2019).

A linhagem nocaute (KO do inglês, *knockout*) para o gene do receptor de interferon tipo I (*ifnar*) (A129), foi utilizada para avaliar a infecção pelo MAYV. IFN-1 tem papel bem estabelecido na infecção por alphavirus (SEYMOUR et al., 2015). Camundongos IFNAR^{-/-} infectados com o

MAYV desenvolveram uma infecção grave e letal após o quarto dia pós infecção (d.p.i.) (FIGUEIREDO et al., 2019).

II – JUSTIFICATIVA

MAYV causa a febre do Mayaro, uma arbovirose emergente, transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus* que ocorre nas Américas Central e do Sul. Similar ao que ocorreu com as epidemias recentes do ZIKV e CHIKV, o MAYV também apresenta potencial para causar uma epidemia principalmente devido a capacidade de infectar mosquitos do gênero *Aedes*, antropofílicos e presentes no ambiente urbano. Febre do Mayaro pode levar a uma artrite e artralgia debilitante, similar a causada pelo CHIKV, que pode levar a sequelas que tem impacto direto na capacidade produtiva do paciente por longos períodos de tempo o que pode levar a um prejuízo econômico grave, como o que já ocorreu com o CHIKV nos últimos anos.

Os sintomas não específicos da febre do MAYV são similares aos de outras arboviroses, o que leva a subnotificação de casos, dificultando a avaliação da situação epidemiológica. Além disso, devido ao pequeno número de casos, e ao fato desses casos em sua maioria ocorrer em regiões florestais, afastadas do ambiente urbano, existe pouco incentivo para a pesquisa do MAYV, e os dados na literatura ainda são limitados, especialmente se comparados aos de outras arboviroses.

Com excessão da YFV a qual a vacina já existe a vários anos, o combate a maior parte das arboviroses é feito exclusivamente através do controle epidemiológico vetorial e o tratamento é feito apenas para aliviar os sintomas. O combate a uma futura epidemia do MAYV também dependeria desse controle, que vem se mostrando ineficiente, visto os crescente números de casos de outras arboviroses. Dessa forma, se faz necessário o desenvolvimento de vacinas e de tratamento para essas doenças, em particular CHIKV e MAYV, devido a sua capacidade de causar sequelas a longo prazo.

A via sinalizadora MEK/ERK, por regular os processos celulares de crescimento, proliferação, sobrevivência, e apoptose, pode mostrar-se como uma alternativa de alvo farmacológico inerente ao hospedeiro, em contraste com aqueles que tem os vírus como alvo. A equipe do GTS vem estudando a relação entre vírus e essa via celular a décadas. O grupo já demonstrou a relação de MEK/ERK com YFV, DENV e o vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) (ALBARNAZ et al., 2014; BONJARDIM, 2017; OLIVEIRA et al., 2020; VALENCIA et al., 2021), e contra os *Orthopoxvirus* (ANDRADE et al., 2004; PEREIRA et al., 2012). A via também está relacionada com o ciclo de multiplicação de outros vírus, incluindo os alphavirus, porém é necessária uma maior elucidação das etapas específicas do ciclo que possam estar sendo afetadas tanto por ensaios *in vitro*, quanto por estudos *in vivo*. Caso se confirme a

atividade antiviral, a recente concessão pelo INPI ao GTS/UFMG da CARTA PATENTE sobre o uso de Inibidores Farmacológicos de MEK/ERK para o tratamento de doenças virais, mencionado acima, abre perspectivas para a utilização do fármaco MEKINIST (Trametinib) liberado para uso humano pela Anvisa. A liberação desse fármaco para o tratamento contra MAYV seria útil especialmente em uma situação de disseminação do vírus pelo território brasileiro.

III – OBJETIVOS

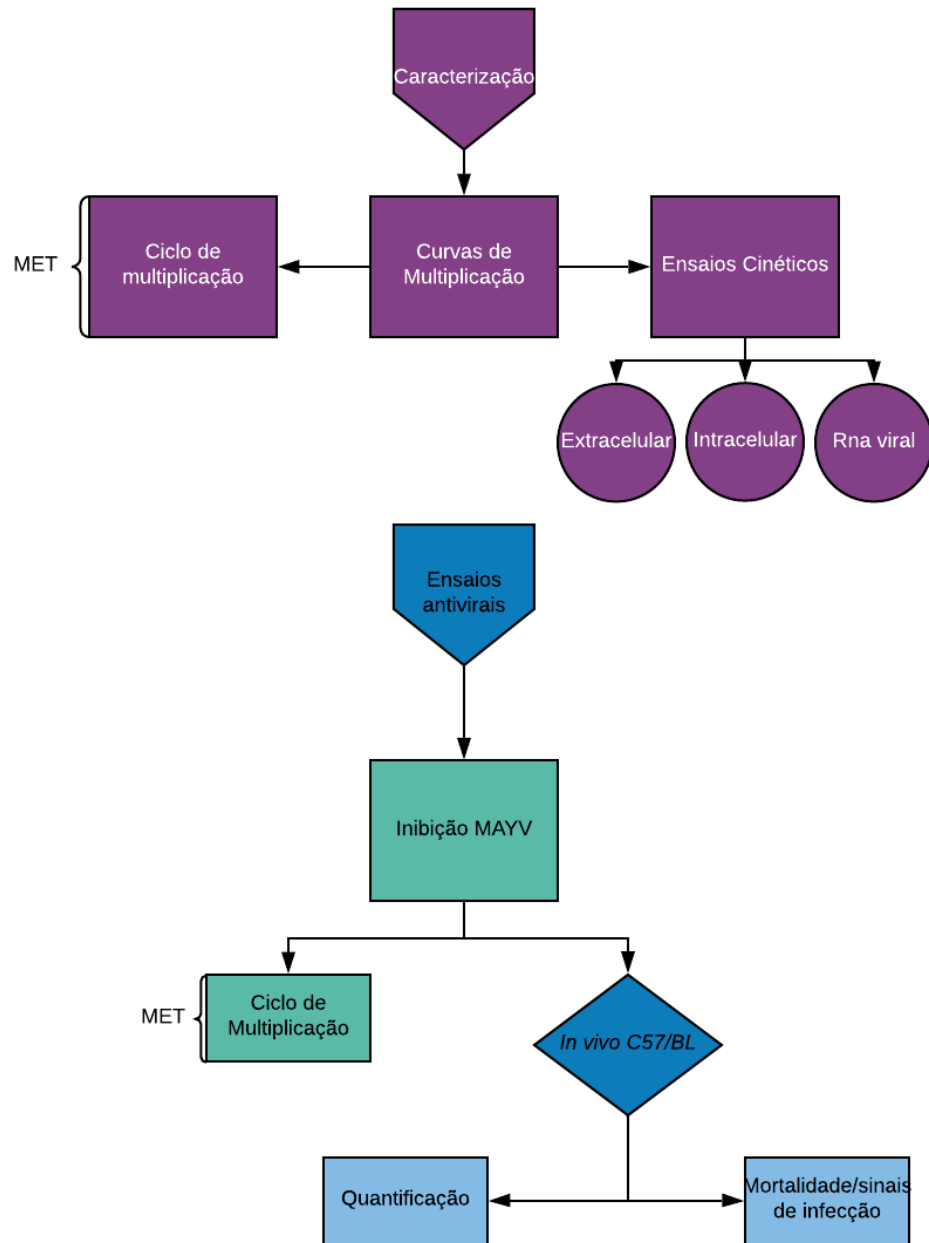
3.1 Objetivo Geral

Caracterização das etapas do ciclo de multiplicação de MAYV estabelecendo uma linha temporal de eventos e avaliar o efeito de inibidores farmacológicos (IFs) de MEK/ERK tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

3.2.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar o ciclo de multiplicação do MAYV utilizando ensaios cinéticos e avaliando-se: início da produção de RNA (qPCR), morfogênese e liberação das partículas virais (PFU/mL)
- Caracterizar o ciclo de multiplicação do MAYV identificando eventos observados através de imagens de microscopia (MET) durante um ciclo único de infecção.
- Estabelecer uma linha temporal com a ordem de eventos replicativo/morfogênicos observados
- Analisar o efeito dos IFs de MEK/ERK na multiplicação do MAYV por ensaios cinéticos e de microscopia (MET)
- Avaliar o efeito da infecção com MAYV em modelo murino utilizando animais C57/BL6 com idade 15-17 semanas.
- Avaliar o efeito antiviral do Trametinib utilizando-se o modelo animal acima.

IV – FLUXOGRAMA DE TRABALHO



V – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Células

5.1.1 Células VERO

As células VERO são uma linhagem de fibroblastos derivada de células de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*). As células foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab – Campinas), antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 0.1/ mg/mL) e Anfotericina B (fungizona 2 µg/mL) estes últimos obtidos da Sigma/Aldrich. As células foram mantidas em uma estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂.

5.1.2 Células C6/36

As células C6/36 são uma linhagem derivada de larvas de mosquito *Aedes albopictus*. As células foram cultivadas em meio Leibovitz-15 (L-15), suplementado com 7% de SFB, antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 0.1/ µg/mL) e antifúngico (fungizona 2 µg/ml). As células foram incubadas a 28°C.

5.2 Vírus

O vírus utilizado nesse trabalho foi o MAYV, genótipo D linhagem BeAr20290, isolado de um pool de 93 *Haemagogus* spp, capturados no km 87 da rodovia Belém-Brasília em 1960. O vírus foi gentilmente cedido pelo Dr Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e pela Dra Cintia Lopes de Brito Magalhães, da Universidade Federal de Ouro Preto.

5.3 Inibidores Farmacológicos

O principal inibidor utilizado nesse trabalho foi o Trametinib um inibidor de MEK1/2 altamente específico e potente, com IC₅₀ de 0,92 nM e 1.8 nM, respectivamente. Ele é um fármaco (MEKINIST) aprovado para uso em humanos e utilizado para o tratamento de melanoma (FDA, 2018). O IF foi inicialmente diluído em DMSO na concentração de 1000X e posteriormente, diluído para se obter as concentrações de uso, concentrações estas que tiveram um efeito na redução dos títulos virais em pelo menos uma unidade logarítmica e não afetaram mais que 10-20% da viabilidade celular. Também foram utilizados para ensaios pilotos, inibidores de AKT, Aurora cinases, JNK e outros dois inibidores de MEK, o Selumetinib e o Binimetinib, os quais foram obtidos da Selleckchem, USA (Tabela 1).

Tabela 1: Inibidores farmacológicos seus respectivos alvos

Inibidor	Alvo Primário	IC50 nM	Alvos Secundários	IC50 nM
AKTi (GSK600693)	AKT 1/2/3	2/13/9	Família AGC	2-5
AUKi (BI-847325)	AURK A/B/C	25/3/15	MEK 1/2	25/4
JNKi (JNK-IN-8)	JNK 1/2/3	4,7/18,7/1	-	-
Binimetinib	MEK1/2	12	-	-
Selumetinib	MEK 1	14	pERK 1/2	10
Trametinib	MEK 1/2	0,92/1,8	-	-

5.4 Titulação Viral

Em placas de 24 poços (Kasvi), foram implantadas 150 mil células VERO por poço e no próximo dia, quando apresentem uma confluência de 90%-100%, foram infectadas com diluições seriadas em base dez da amostra viral (de 10^{-1} a 10^{-7}) em meio MEM com 1% de SFB acrescido de antibióticos. As infecções foram realizadas com 100 μ L de cada diluição seguida de incubação de 1h a 37°C e 5% de CO₂, agitando-se ligeiramente a placa a cada 20 min. Após a adsorção, foram adicionados 1 mL de meio semi-sólido, 199 (Gibco) com 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 1% de CMC (Synth), 2% de SFB (Cultilab) e antibióticos. A placa foi incubada durante 2 dias a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de formaldeído (Química Moderna) a 3,7% em cada poço, para fixar as células por 24h à temperatura ambiente (TA). Após isso o formaldeído foi descartado e foi feita nova lavagem para remover o CMC, e finalmente, corando-se a monocamada com 1% de cristal violeta (CV) (Synth) em etanol 20% (p/v) por 15 min a TA, lavando-se mais uma vez com água e deixando secar as placas e então feita a contagem das placas de lise.

5.5 Curva de multiplicação viral

As curvas de multiplicação foram realizadas em células VERO. As células foram semeadas em placas com 24 poços, cada poço contendo 150 mil células. Após 24 horas, as células foram infectadas com MAYV em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs)

(0,1;1;10,0). A adsorção foi feita utilizando-se 100 µL de meio MEM com 1% SFB, após isso foi realizada a lavagem com PBS (568 mg/L de Na₂HPO₄; 272 mg/L de KH₂PO₄ e 8,768 g/L de NaCl), sendo então adicionado 1 mL de meio MEM com 1% SFB. O sobrenadante então foi coletado para cada tempo da curva e armazenado a -70°C. Para quantificar os vírus intracelulares, o sobrenadante foi descartado e em seguida a placa foi congelada e descongelada 3 vezes, a -70°C e TA de maneira intercalada. Em seguida foi feita a raspagem da monocamada, seguida da centrifugação a 13000 G por 5 min a 4°C (centrifuga eppendorf 5818R), e finalmente, o sobrenadante foi separado e congelado a -70°C.

5.6 Teste de viabilidade celular com MTT

Essa técnica consiste na adição de uma solução de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl] -2, 5-difeniltetrazolbrometo) sobre uma monocamada celular com o objetivo de se avaliar a proliferação e a viabilidade destas células. O MTT é reduzido em células metabolicamente ativas a cristais violetas de formazano, que são insolúveis. Após a adição de uma solução detergente ou DMSO, os cristais são dissolvidos, e tornam púrpura o meio em que as células foram cultivadas. A densidade óptica deste meio será, então, avaliada por um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 570 nm, e permite correlacionar os valores obtidos com a quantidade de células viáveis. Esta técnica mede o metabolismo celular para determinar a viabilidade celular, portanto, é limitada com tratamentos que reduzam o metabolismo (ref outro Moslo) ŚLIWKA et al., 2016).

Para a execução do teste, placas de 96 poços foram preparadas com 10 mil células VERO, em meio MEM contendo 1% de SFB. Aproximadamente 24 horas após a semeadura das células, o meio de cultura das mesmas foi descartado, adicionando-se 100 µL de meio MEM 1% SFB fresco em cada poço. Diluições seriadas do inibidor foram preparadas também em meio MEM contendo 1% de SFB em uma placa espelho. O DMSO (diluyente das amostras) foi utilizado como controle. Após o preparo da placa espelho, 100 µL de cada diluição a ser testada foram adicionados aos 100 µL do meio fresco. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi, então, removido e foram adicionados 50 µL da solução de MTT em PBS (2 mg/mL) aos poços. As placas foram incubadas por 90 minutos na estufa a 37°C. Passado este período, foram adicionados aos poços 150 µL de DMSO, e as placas foram mantidas em um agitador de placas por 15 min. Após isso foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os valores obtidos da absorbância das amostras foram comparados com os valores obtidos para o controle celular.

5.7 Extração de RNA

O RNA viral total foi extraído da seguinte maneira: sobrenadante – utilizando-se o Kit “QIAamp Viral RNA” (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante; monocamada celular – utilizando-se o reagente TRIZOL (LIFE), sendo utilizados 600 uL do mesmo, o restante do protocolo foi realizado de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente: na solução com Trizol foi adicionada clorofórmio na proporção de 1:5 de volume de Trizol usado, para promover a separação de fases e concentração do RNA na fase aquosa; esta solução foi então centrifugada a 12000 G (EPPENDORF 5417R) durante 15 minutos a 4°C. Após isso a fase aquosa foi transferida a outro tubo, ao qual foi adicionado volume de isopropanol na proporção de 1:2 de volume de Trizol usado inicialmente, de modo a promover a precipitação do RNA. A solução foi centrifugada a 12000 G (EPPENDORF 5417R) durante 10 minutos a 4°C e o RNA foi ressuspensão em etanol 75% na proporção 1:1 de volume de Trizol inicialmente usado. Após centrifugação a 12000 G (EPPENDORF 5417R) durante 5 minutos a 4°C, o RNA foi ressuspensão em 30 uL água ultrapura.

5.8 RT-qPCR

Após extração de RNA, o mesmo foi submetido a RT-qPCR, utilizando-se o Kit “GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR” (Promega), com os iniciadores da Tabela 2 e as condições da reação na tabela 3 de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente: foi preparado um Mix com volume final de 10 µL utilizando o reagente Go-Taq (5µL), iniciadores *forward* e *reverse* (500 nM), sonda (200 nM), transcriptase reversa (RT) (0,2µL) e água ultra pura q.s.p. Após o preparo do MIX foram adicionados 3 µL de RNA e as amostras colocadas termociclador Step One Real Time PCR (Applied Biosystems).

Tabela 2: Iniciadores utilizados nos ciclos de amplificação por qPCR para MAYV

Iniciador	Sequencia	Amplicom (nt)	Referência
<i>Forward</i>	5' CACGGACMTTTTGCCTTCA 3'	59	(NAVECA et al., 2017)
<i>Reverse</i>	5' AGACTGCCACCTCTGCTKGAG 3'		
<i>Sonda</i>	5'(VIC) ACAGATCAGACATGCAGG 3'		

Tabela 3: Condições para os ciclos de amplificação por RT-qPCR

Função	Temperatura	Tempo	Ciclos
Transcrição Reversa	45°C	15 min	1
Inativação da RT	95°C	2 min	1
Desnaturação	95°C	15 s	40
Anelamento/Extensão	6.0°C	60 s	40

5.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Em tempos específicos determinados de acordo com a inibição do título viral (curva de multiplicação) e em que se observou o maior efeito inibitório sobre a multiplicação viral, as monocamadas de células VERO foram infectadas com MAYV, tanto em presença, quanto ausência de IFs, procedendo-se, a seguir, a análise microscópica. O protocolo seguido foi o sugerido pelo Centro de Microscopia da UFMG. Brevemente: a monocamada celular foi removida cuidadosamente com um rodo para células e foi colocada em um tubo de 1,5 mL, onde foi centrifugada a 330 x g por 10 minutos. O meio foi então removido seguido da adição de 2,5 mL de solução fosfato de sódio 0,2 M (524 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 4,35g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma) em 100 μL de água deionizada). As células foram ressuspensas e novamente centrifugadas a 330 G por 5 minutos seguida de nova lavagem com solução fosfato. O sobrenadante foi removido e após isso foram adicionados 4 mL de solução fixadora preparada na hora com solução fosfato 0,1 M e glutaraldeído (Sigma) a 2,5%. Foi feita a incubação por 1h a TA, mexendo-se com cuidado a cada 15 min seguida de nova centrifugação a 330 G por 10 minutos, e a solução fixadora foi descartada seguido adição de 1 mL de solução fosfato. As células então foram ressuspensas e transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a 960 x g (centrifuga eppendorf 5818R) por 10 minutos e finalmente armazenadas a 4°C até o envio ao centro de microscopia.

Para eventual contagem do número de partículas virais observadas, imagens foram separadas de maneira não repetida, em grupos de acordo com a escala das mesmas (500 nm ou 200 nm). O valor total foi calculado e dividido pelo número de imagens analisadas.

5.10 Ensaios biológicos com MAYV

Todos os ensaios *in vivo* foram realizados sob o princípio ético de cuidados e manipulações com os animais baseados no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Um experimento piloto foi realizado com animais da linhagem A129 os demais

com animais C57BL/6 sob o protocolo de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFMG número 41/2020. Os animais foram obtidos do biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG (CEBIO) em condições convencionais, sendo 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 12h/12 h com condições de comida e água irrestritas e troca da cama em maravalha feita semanalmente ou a cada dez dias. Além de uso de mini-isoladores em rack ventilada para o acondicionamento dos animais, que foram deixados no máximo em grupos de 6 animais por gaiola.

5.10.1 Infecção com MAYV em camundongos A129

O experimento piloto foi realizado com animais adultos com 8 semanas de idade em grupos de 8 animais, 4 machos e 4 fêmeas. Os animais foram inoculados com 10 µL de MEM 1% para o grupo controle e 10 µL contendo 1000 ou 100 PFU de MAYV de acordo com a Tabela 4 sendo que para os grupos infectados foram utilizadas seringas de insulina com capacidade total de 300 µL. Foi utilizada a via subcutânea intraplantar, no coxim plantar da pata traseira esquerda do animal na direção dedo-tornozelo. Os animais foram avaliados quanto aos sinais clínicos e pesados diariamente.

Tabela 4: Grupos e condições experimentais - infecção com MAYV em camundongos A129

Grupo	Dose infectante	n
1	MEM 1% em 10 µL	2♂ e 2♀
2	10 ³ PFU em 10 µL	4♂ e 4♀
3	10 ² PFU em 10 µL	4♂ e 4♀

5.10.2 Infecção com MAYV dos camundongos C57BL/6

O experimento foi realizado com animais filhotes com 15-17 dias de idade baseados em (SANTOS et al., 2019) com grupos e condições experimentais de acordo com a tabela 5. Os camundongos foram infectados com MAYV por via subcutânea intraplantar na pata traseira esquerda e/ou por via subcutânea embaixo da pata posterior ou BFL (do inglês, *below forelimb*), ambas com 7x10⁵ PFU de MAYV em 10 µL de suspensão viral (vírus + meio de cultura), utilizando seringas de insulina com capacidade total de 300 µL (GARDNER et al., 2010;

LANGSJOEN et al., 2018). Os animais foram avaliados quanto aos sinais clínicos e pesados diariamente durante 10 dias. Sinais foram avaliados de acordo com seu surgimento.

Tabela 5: Grupos e condições experimentais - avaliação da via de inoculação para infecção com MAYV em camundongos C57/BL/6

Grupo	Dose infectante	n	Via de inoculação
1 Controle	MEM 1% em 10 μ L	1♂ e 1♀	Intraplantar (1) e BFL (1)
2 Intraplantar	7x10 ⁵ PFU em 10 μ L	2♂ e 2♀	Intraplantar
3 BFL	7x10 ⁵ PFU em 10 μ L	2♂ e 2♀	BFL

5.10.2 Tratamento com Trametinib de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV

O experimento foi realizado com animais filhotes com 15-17 dias de idade com grupos e condições experimentais de acordo com a Tabela 6. Os animais infectados foram tratados, por via intragástrica (gavagem) com uma concentração de 2mg/kg de Trametinib, 24 horas após a inoculação do vírus ou do meio de cultura (MOCK). Os camundongos receberam uma dose diária do inibidor via gavagem e foram acompanhados durante 10 dias, avaliando a variação de peso, e sinais clínicos observados. Foram feitos 2 experimentos distintos com 4-5 animais cada grupo, sendo o primeiro grupo observada a mortalidade e o segundo grupo onde no 5 d.p.i. foram realizadas as coletas do cérebro, baço, fígado, olho e coração. Após necrópsia os órgãos foram armazenados em nitrogênio líquido. Como controle, grupos de camundongos infectados foram tratados com uma solução contendo apenas o veículo utilizado para diluição do fármaco (0,5% de CMC-NA e 0,2% de Tween 20).

Tabela 6: Grupos e condições experimentais para tratamento com Trametinib em camundongos C57/BL/6 infectados com MAYV

Grupo	Dose infectante	n	Tratamento
1 Controle	MEM 1% em 10 μ L	2♂ e 1♀	Veículo CMC 0.5%
2 Infectado	7x10 ⁵ PFU em 10 μ L	3♂ e 2♀	Veículo CMC 0.5%
3 Tratado	7x10 ⁵ PFU em 10 μ L	2♂ e 2♀	2mg/kg de Trametinib

5.11 Cálculo da IC50

Os dados obtidos com os testes inibição com Trametinib foram compilados em uma curva dose resposta com o objetivo de determinar a IC50 do inibidor em células Vero contra MAYV. Para isso um gráfico XY foi construído, com valores de concentração em molar (M) no eixo X e valores percentuais de inibição observada no eixo Y. Os valores de concentração foram então convertidos para unidades logarítmicas com o valor 0 sendo considerado 10×10^{-11} para evitar erros na equação. Foi feita então a regressão não linear, utilizando o programa o GraphPad Prism software, versão 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

5.12 Análise Estatística

A análise estatística será feita com o Microsoft Excel X (Microsoft Corporation, Seattle, WA, USA) e o GraphPad Prism software, versão 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0.05$ serão considerados significativos para os testes realizados.

VI – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização do ciclo de multiplicação do MAYV

6.1.1 Cinética

A primeira etapa para a caracterização biológica do MAYV foi realizar ciclos de multiplicação utilizando-se diferentes multiplicidades de infecção (MOIs) para melhor entendimento da cinética de multiplicação do vírus. Para isso, células VERO foram semeadas em placas de 6 poços na quantidade de 1 milhão por poço. No dia seguinte as células foram infectadas com o MAYV nas MOIs de 10, 1 e 0.1. Nos tempos especificados, os sobrenadantes foram coletados e submetidos a titulação (PFU/mL). Os resultados podem ser observados na Figura 9.

O perfil de multiplicação sob as três MOIs foi semelhante, com um ciclo rápido, um período de eclipse em torno das 4 horas pós infecção (h.p.i.), seguido de aumento exponencial na quantidade de partículas e fase estacionária verificado para as MOIs de 10 e 1 e para a MOI 0.1 atingindo seu máximo observado. A principal diferença foi observada no tempo necessário para a curva alcançar a fase estacionária ou máximo observado. Com MOI 10 isso ocorreu as 7 h.p.i., e MOI 1 as 15 h.p.i. Com MOI 0.1, as 24h.p.i. o ciclo ainda se encontrava na fase exponencial. A produção máxima de vírus foi maior sendo inversamente proporcional a MOI utilizada. Esses resultados são semelhantes a curvas de multiplicação descritas para outros alphavirus incluindo CHIKV e RRV (GÖERTZ et al., 2017; LIU et al., 2018), ambos com fase exponencial persistindo até 24 h.p.i. seguido da fase estacionária sob condições de baixa MOI.

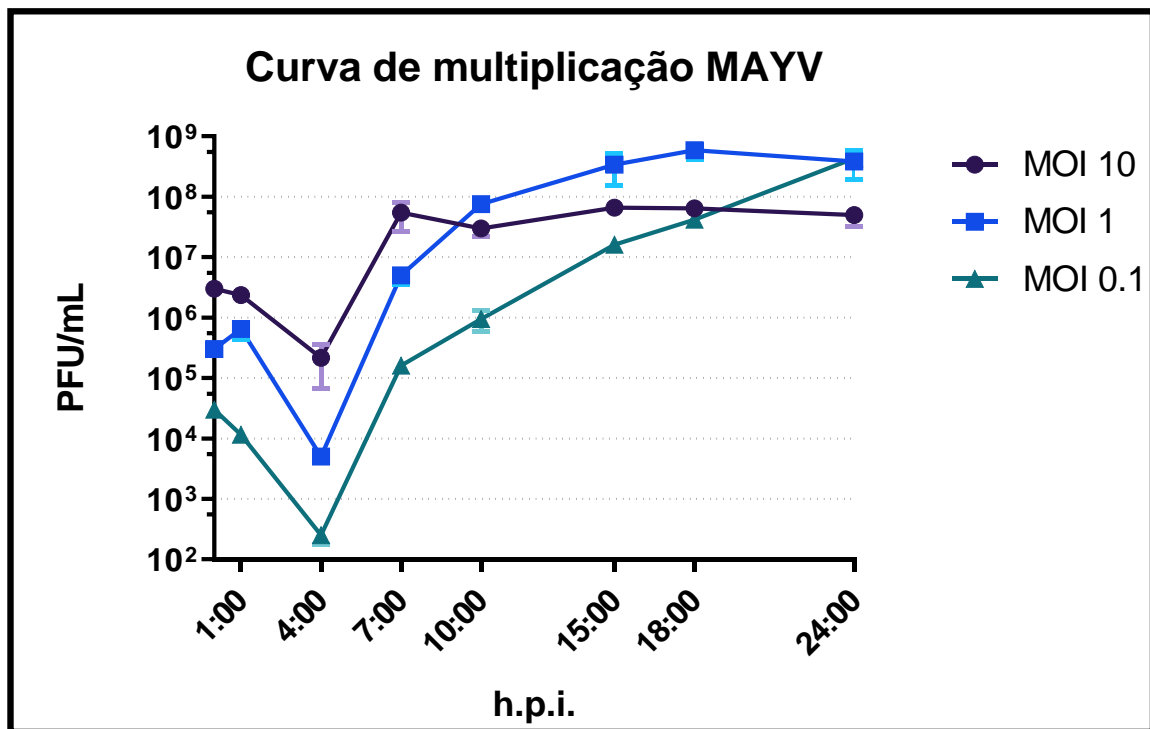


Figura 9 Curva de Multiplicação do MAYV – Células Vero foram infectadas com MAYV nas MOIs 10, 1 e 0.1. Após os respectivos tempos os sobrenadantes foram coletados e submetidos a titulação (PFU/mL). As três curvas apresentaram um perfil semelhante tendo como principal diferença o tempo necessário para alcançar a fase estacionária: MOI 10 = 7h; MOI 1 = 15; ou máximo observado para a MOI 0.1 em 24h. Barras de erro representam o desvio padrão.

6.1.2 Identificação das etapas do ciclo de multiplicação

A próxima etapa foi identificar durante o ciclo de multiplicação do MAYV o tempo de início da replicação do RNA, da produção de partículas infecciosas e liberação de partículas no sobrenadante. Para isso, as células Vero foram infectadas com MAYV a MOI=10 pelos tempos indicados. Os resultados podem ser observados na figura 10. A quantidade de RNA diminui até 2 h.p.i., e em seguida sua síntese é iniciada, verificando-se que a quantidade aumenta exponencialmente até as 4 horas com incremento de 82x quando comparado ao tempo de 2 horas e 6x no tempo de 1 hora (Figura 10 A)

O número de partículas infecciosas na monocamada celular também diminui até 3 h.p.i., a morfogênese dos vírions, no entanto, se inicia as 3 h.p.i. com incremento de 1600x no último tempo analisado 7h.p.i. (Figura 10 B).

Por último, a liberação de partículas no sobrenadante iniciou-se após 5h com um rápido acúmulo de partículas, e as 7h.p.i., já se observou um incremento de 1100x (Figura 10 C).

Esses resultados sugerem que o primeiro ciclo de multiplicação do MAYV termina entre 6-7 h.p.i. assim como fornece uma prospectiva linha temporal com parte dos eventos de multiplicação. Para confirmar isso realizamos ensaios de microscopia eletrônica sob as mesmas condições.

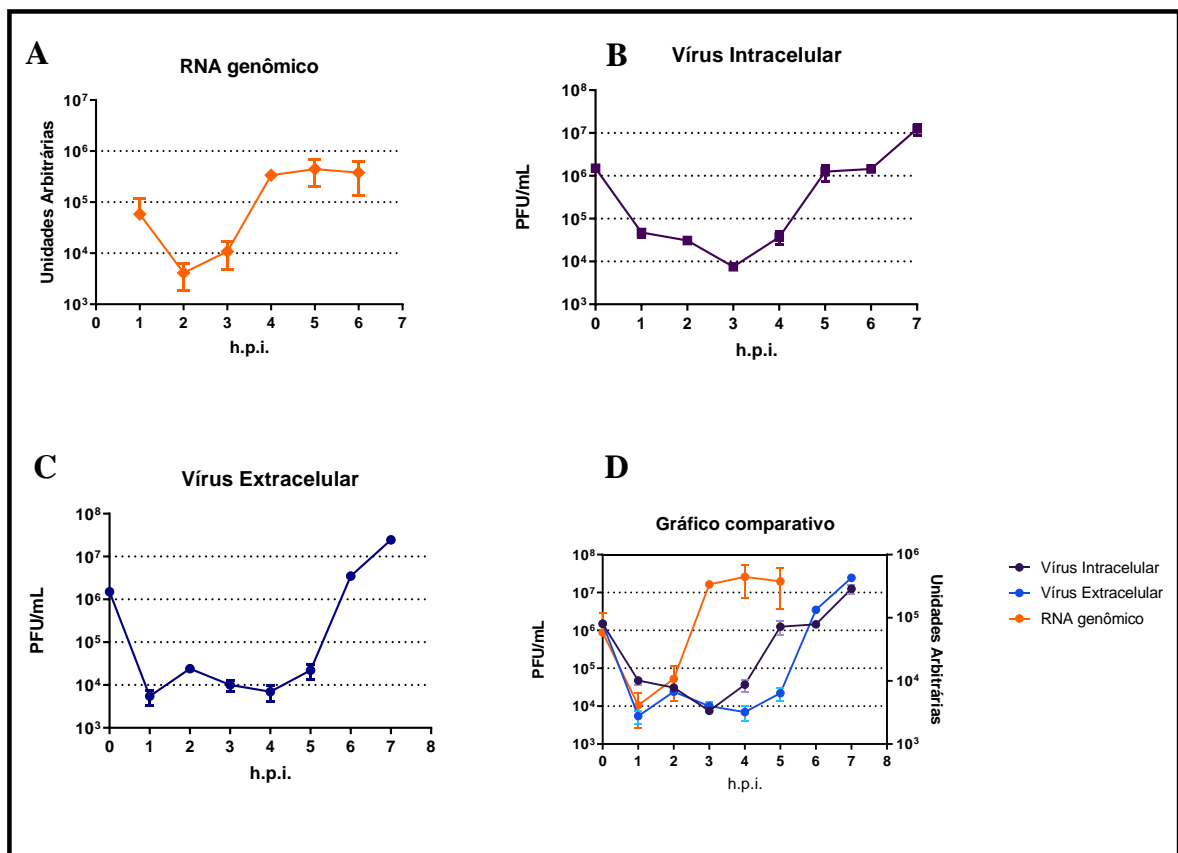


Figura 10: Etapas do ciclo de multiplicação MAYV – Células Vero foram infectadas com MAYV a MOI 10. Nos tempos especificados foram determinados: A) extração de RNA seguida de RT-qPCR. O RNA genômico apresentou crescimento após 2 h.p.i. B) a monocamada celular submetida à titulação. O número de partículas intracelulares apresentou redução até 3 h.p.i. seguido de aumento exponencial até 7 h.p.i. C) o sobrenadante foi coletado e separado para titulação, a liberação de partículas iniciou-se entre 4-5 h.p.i. D) Gráfico comparativo mostrando as três curvas. Eixo Y1 representando PFU/mL. Eixo Y2 representando unidades arbitrárias. Barras representam desvio padrão.

6.1.3 Análise do ciclo de multiplicação do MAYV por MET

Experimentos foram realizados com MET para complementar a caracterização das etapas do ciclo. Para isso, células Vero foram semeadas em garrafas pequenas (25cm²) cada uma com 2,5 milhões de células. No dia seguinte as células foram infectadas com o MAYV na MOI de 10, e após os tempos especificados, o sobrenadante foi removido e a monocamada preparada para a MET. Os tempos foram coletados iniciando-se em 15 minutos pós infecção (mpi), 30 mpi, 1 h.p.i. e a partir disso, em intervalos de 1 hora até 6 h.p.i., com o objetivo de se observar todas as etapas do ciclo de multiplicação, e estruturas virais e ou celulares características. Células controle não infectadas, também foram analisadas mostrando as em condições normais (Figura 11) e algumas organelas em destaque: Mitocôndrias (M), retículo endoplasmático (RE), núcleo com carioteca bem definida (N), Complexo de Golgi (G) e ribossomos.

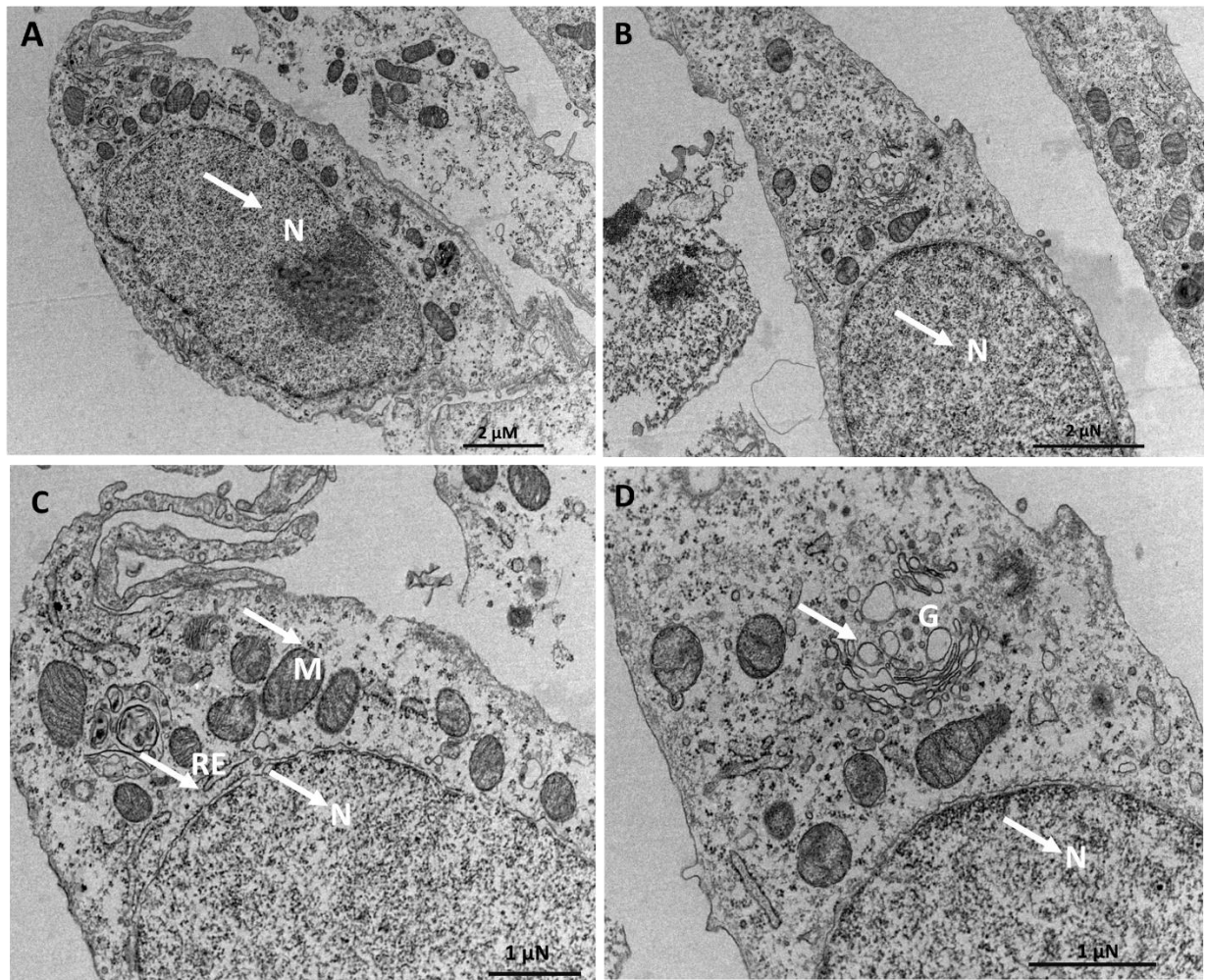


Figura 11: Imagens de MET, de células VERO Controle– Imagens de MET de células VERO não infectada escala de 2 μ m (A e C) e na escala de 1 μ m (B e D) destacando algumas organelas. M: mitocôndria; N: núcleo; RE: Retículo Endoplasmático; G: Complexo de Golgi. As imagens mostram micrografias com respectivas as escalas.

Amostras infectadas com MAYV – MOI=10, foram analisadas de acordo com o tempo e eventos observados pós infecção:

6.1.3.1 Penetração do MAYV

O processo de penetração do vírus se inicia por volta de 15 minutos pós infecção (m.p.i.) com a aproximação do vírus a célula (Figura 12 A), seguido pela penetração através da invaginação da membrana celular formando uma vesícula endocítica rodeada por proteínas clatina (Figura 12 B). Entre 30 minutos e 1 h.p.i. o vírus é encontrado dentro de endossomos (Figura 12 C e D), e após isso inicia-se o processo de desnudamento através da fusão do envelope viral com a

membrana do endossomo (Figura 12 E). Finalmente após 1 h.p.i. apenas raras partículas são encontradas no citoplasma já sem o envelope (Figura 12 F).

A penetração do MAYV via endocitose mediada por proteínas clatrina é também descrita como o principal mecanismo de entrada de outros alphavirus (MARSH; BOLZAU; HELENIUS, 1983; SOURISSEAU et al., 2007). Um estudo feito em 2017 utilizando ensaios de fluorescência, encontrou tempos similares aos observados em nosso trabalho por MET com muitas das partículas observadas dentro da célula após 30 minutos de infecção. Os autores demonstraram que a inibição da endocitose reduzia a capacidade de replicação do vírus em 70% 48 h.p.i. (CARVALHO et al., 2017).

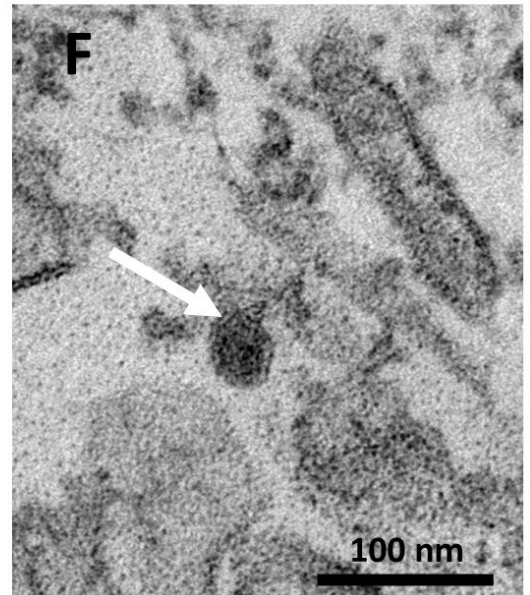
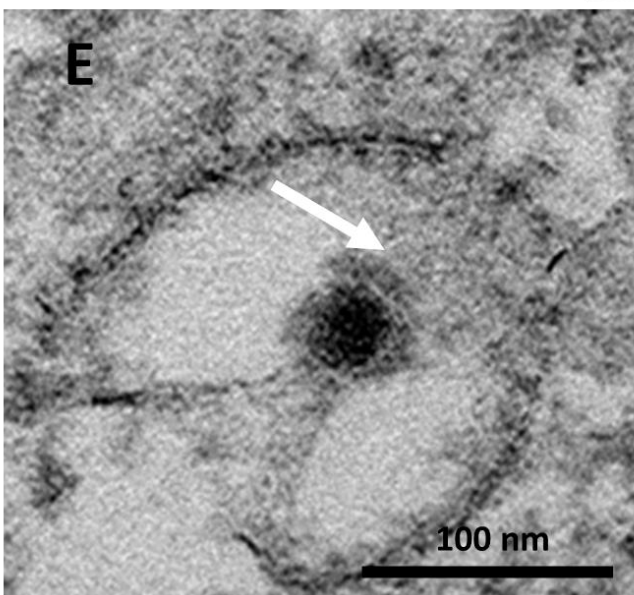
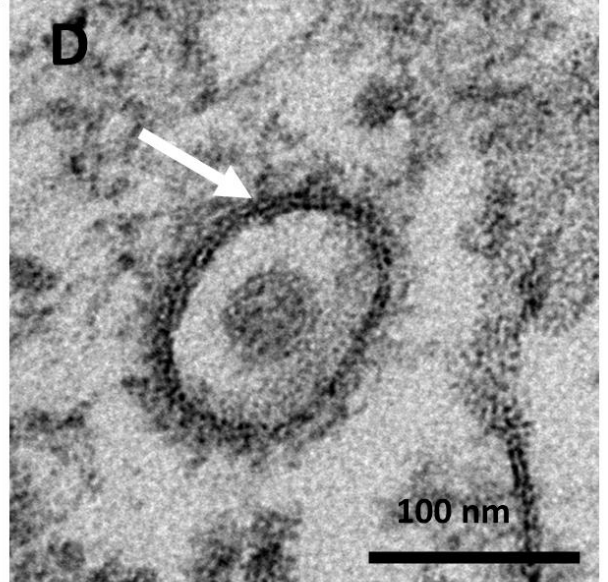
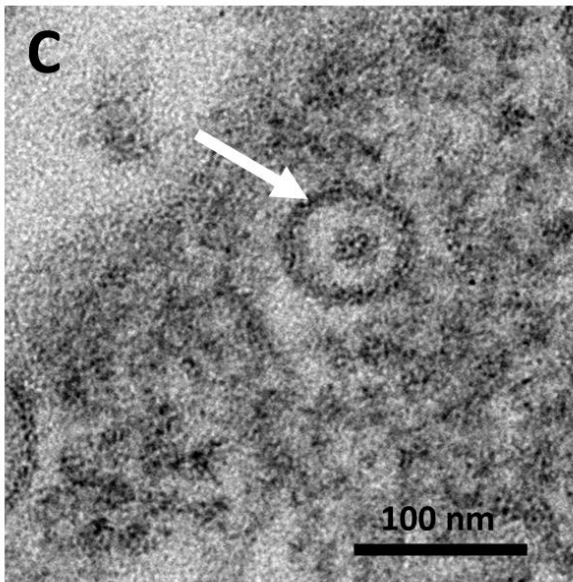
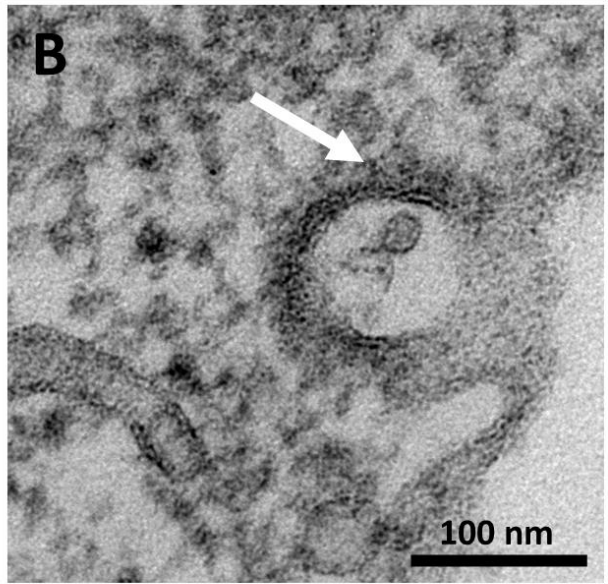
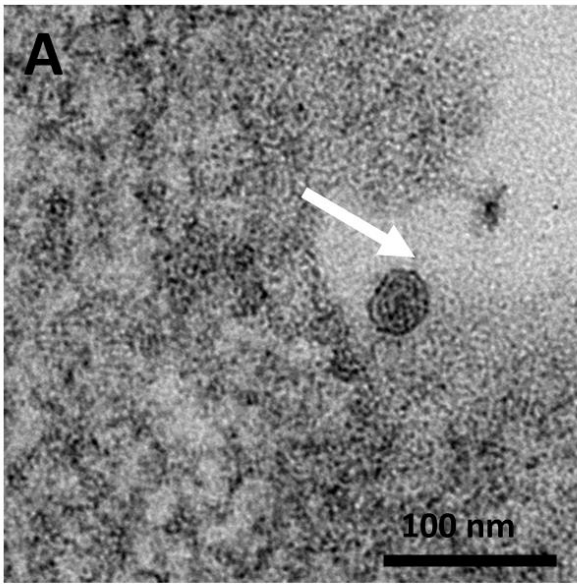


Figura 12: Penetração do MAYV – setas brancas indicam a estrutura em destaque. Células Vero infectadas com MAYV a MOI 10 foram analisadas 15 mpi (A) 30 m.p.i. (B-C) e 1 h.p.i. (E-F). A) Imagem mostrando a partícula viral se aproximando da célula. B) Partículas durante o processo de endocitose. C-D) Partícula viral no interior do endossomo cercada por proteínas clatrina. E) Partícula viral durante o processo de desnudamento F) Partícula fora de um endossomo mas dentro da célula. As imagens mostram micrografias com respectivas escalas.

6.1.3.2 Reorganização dos ribossomos

Durante o ciclo de replicação dos alphavirus, depois do desnudamento do vírus o RNA genômico é diretamente traduzido para produzir as proteínas não estruturais nsP1-4, as quais são responsáveis por formar o complexo de replicação responsável pela produção do RNA genômico (BROWN; WAN; KIELIAN, 2018).

Nossas imagens (Figura 13 A) mostraram que 3 h.p.i., há grande quantidade de ribossomos (partículas densas e esféricas com tamanho de 18-22nm), distribuídas no citoplasma. Esses ribossomos foram encontrados organizados em formas circulares ou semicirculares próximos a grandes estruturas eletrodensas que parecem ser formadas por acumulação de proteínas. Também observamos ribossomos em torno de grandes estruturas semelhantes a vacúolos (Figura 13 B e C). Essas regiões podem estar associadas a tradução de proteínas virais não estruturais, evento que precede a formação de esférulas associadas à síntese fita molde senso negativo (BROWN; WAN; KIELIAN, 2018), que são observadas nos tempos posteriores.

Curiosamente, algumas vezes também observamos grupos de estruturas esféricas, maiores que ribossomos e muito similares a nucleocapsídeos que surgem em tempos posteriores (Figura 13 D). Essas estruturas foram observadas em diferentes tamanhos indicando possíveis estágios de desenvolvimento (Figura 13 E). Caso essas estruturas sejam de fato precursores virais, isso seria um surgimento precoce, visto que precede eventos essenciais para morfogênese de alphavirus, como formação de esférulas e CPV-II. Por outro lado, uma hora após a observação dessas estruturas, conseguimos observar, raramente, partículas maduras, tanto no interior do citoplasma quanto já em brotamento. Além disso, de acordo com os dados obtidos em nossos ensaios cinéticos, a produção de partículas intracelulares inicia-se entre 3 e 4 h.p.i. De maneira geral, os dados sugerem que essas estruturas, se não forem precursores virais, estão de alguma

maneira relacionadas com o processo de morfogênese ou uma etapa ainda não caracterizada desse ciclo.

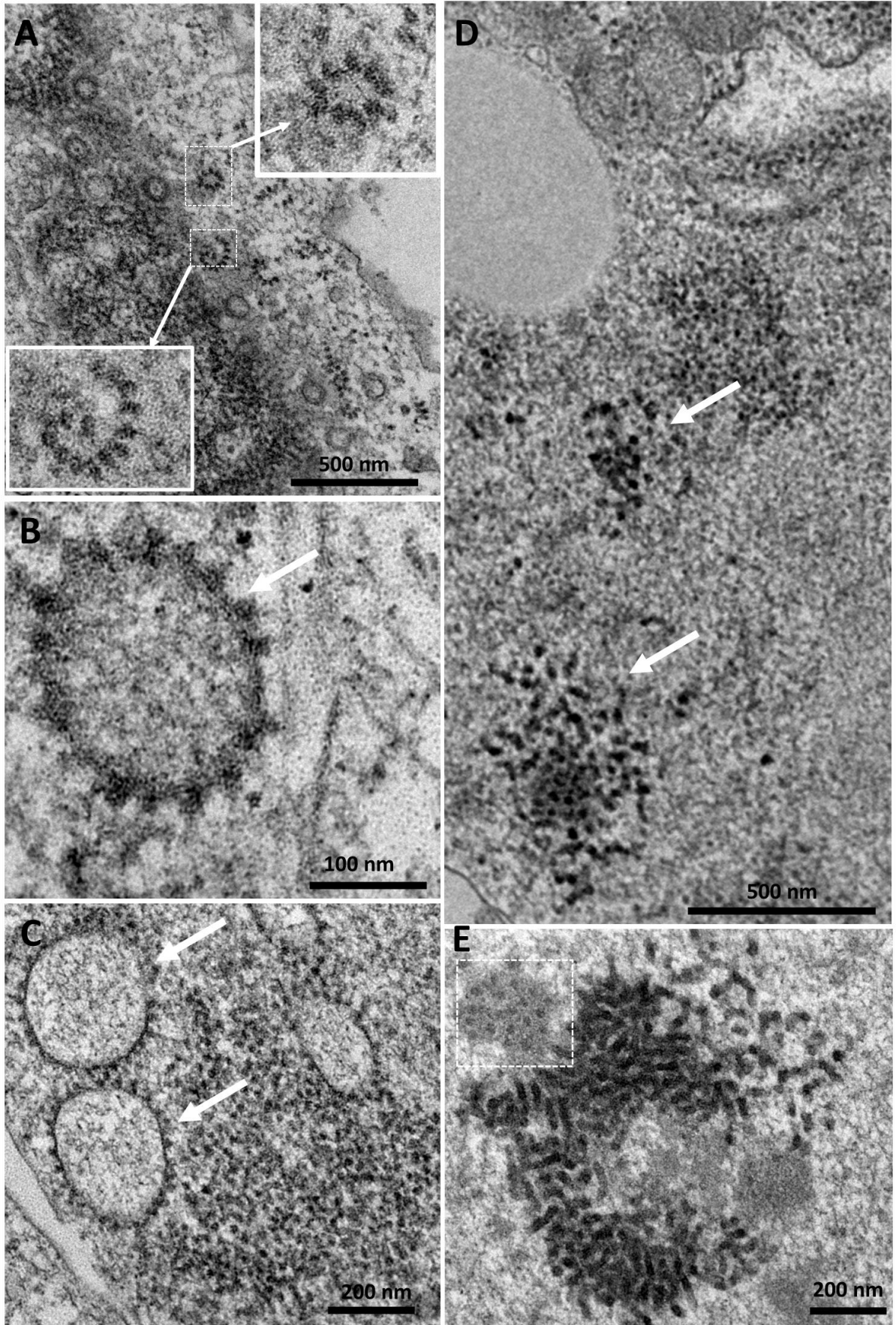


Figura 13: Reorganização de ribossomos – setas brancas indicam a estrutura em destaque. Células Vero infectadas com MAYV a MOI 10 foram analisadas 3 h.p.i. A) Ribossomos organizados em arranjos circulares próximos a uma grande e densa estrutura. Os retângulos brancos mostram um aumento maior. B) Ribossomos cercado uma estrutura vacuolar C) Grande número de ribossomos próximos a três estruturas vacuolares D) Possíveis precursores virais E) Dois grupos de precursores virais, um menor (retângulo branco) e um maior indicando possivelmente, diferentes estágios de desenvolvimento. As imagens mostram micrografias com as respectivas escalas.

6.1.3.3 Formação de esférulas induzidas pela infecção do MAYV

A replicação do genoma viral dos alphavirus ocorre no interior de compartimentos vesiculares formados pelas nsPs, denominadas esférulas (HELLSTRÖM et al., 2017). Em nosso estudo confirmamos a presença dessas estruturas durante a replicação do MAYV. As esférulas foram inicialmente observadas próximas e geralmente ancoradas a membrana celular (Figura 14 A-C) com tamanho variando entre 50 a 100 nm, em formato circular ou elíptico.

A forma geral das esférulas parece ser associada ao tipo de célula infectada do que ao vírus que a infecta. Infecções em células BHK-21 com SINV (FROLOVA et al., 2010) e SFV (KUJALA et al., 2001) apresentaram esférulas arredondadas e menores, assim como infecções com CHIKV em células C6/36 (CHEN et al., 2013). Por outro lado, infecções em células Vero, seja por CHIKV (REIS et al., 2021) ou MAYV apresentaram esférulas mais alongadas e de forma mais amorfa.

Curiosamente não observamos a formação do CPV-I descrito para outros alphavirus e formado após a internalização das esférulas. No entanto encontramos grupos de esférulas no interior do citoplasma normalmente próximos ao retículo endoplasmático (Figura 14 D-E).

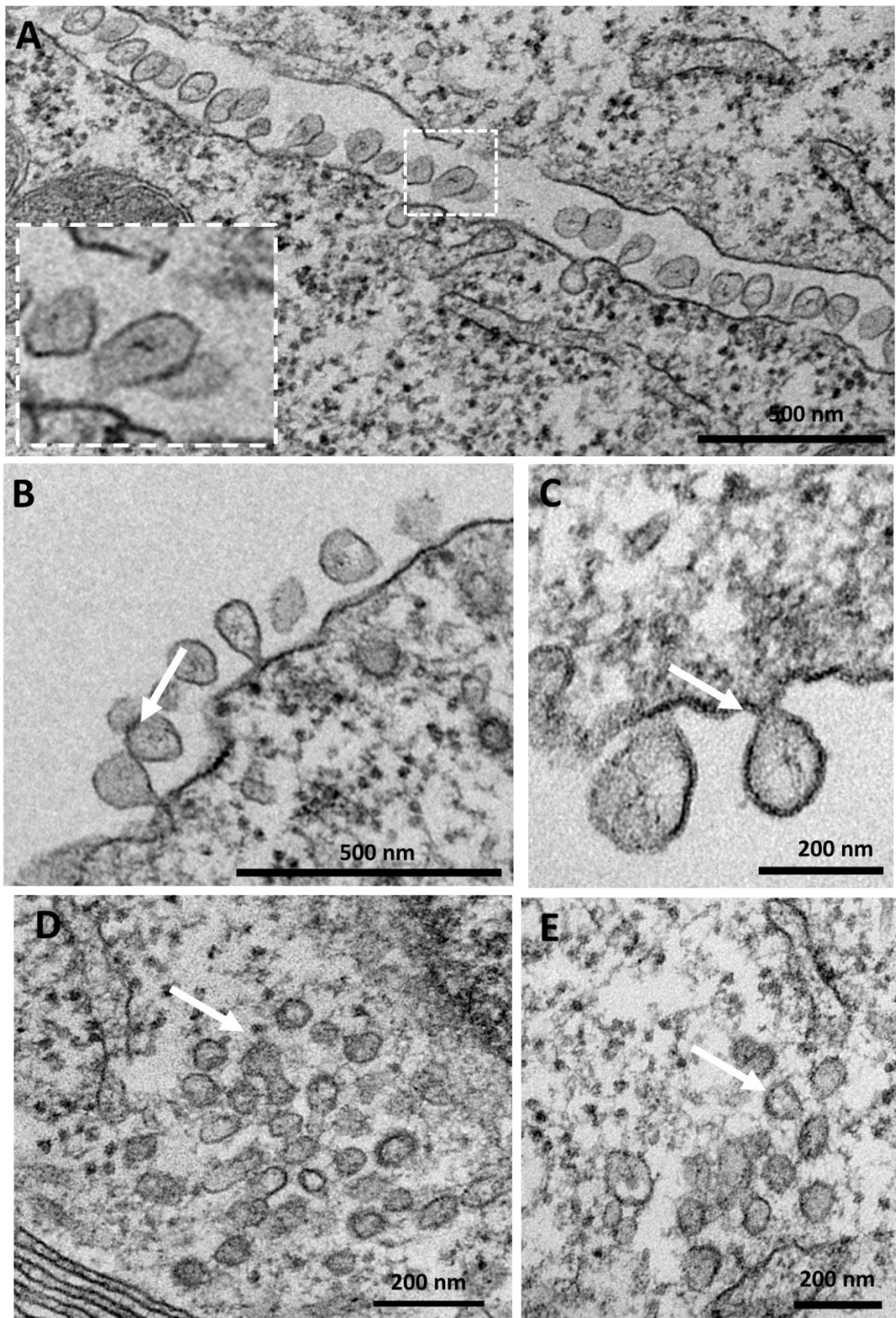


Figura 14: Formação de esférulas induzidas pela infecção com MAYV - Setas brancas indicam a estrutura em destaque. Células Vero infectadas com MAYV a MOI 10 foram

analisadas 4 h.p.i. A-C) Esférulas ancoradas a célula. Retângulo branco mostrando aumento maior. (D-E) Esférulas em grupos no interior da célula. As imagens mostram micrografias com respectivas escalas.

6.1.3.4 Formação do CPV-II e morfogênese

O CPV-II formado durante o ciclo dos alphavirus é derivado da rede Trans-Golgi e contém as glicoproteínas E1/E2 com nucleocapsídeo ancorados no lado citoplasmático (JOSE; TAYLOR; KUHN, 2017). Nesse estudo a formação de CPV-II foi inicialmente observada 5 h.p.i., no citoplasma, de maneira isolada, com diferentes formas e tamanhos, incluindo: meia-lua (Figura 15 A), barra curvada ou reta (Figura 15 B-C) e forma circular (Figura 15 D-E). Essas estruturas são rodeadas por uma única camada de partículas imaturas, como previamente descrito para CHIKV (HIGASHI et al., 1967; REIS et al., 2021). Esses eventos foram diretamente relacionados com um aumento exponencial no número de vírus na monocamada celular, correlacionando-se com o que foi observado em nossos experimentos de cinética (Figura 10 B).

Trabalhos anteriores com CHIKV descrevem o surgimento do CPV-II em estágios tardios do ciclo de replicação ocorrendo apenas 24 h.p.i. em células C6/36 e 12 h.p.i. em HeLa (CHEN et al., 2013). No entanto outros estudos com CHIKV incluindo (REIS et al., 2021) realizados em células Vero por nosso grupo essas estruturas foram observadas em estágios mais precoces do ciclo e similar ao que observamos nesse trabalho. Além disso outro estudo com SINV demonstra o surgimento dos CPV-II entre 5 e 6 h.p.i., embora menos abundante, se comparado aos CPV-I observados (JOSE; TAYLOR; KUHN, 2017). Essas diferenças no tempo de surgimento podem refletir mecanismos de adaptação dos alphavirus a hospedeiros diferentes, no entanto mais estudos são necessários sobre sua importância.

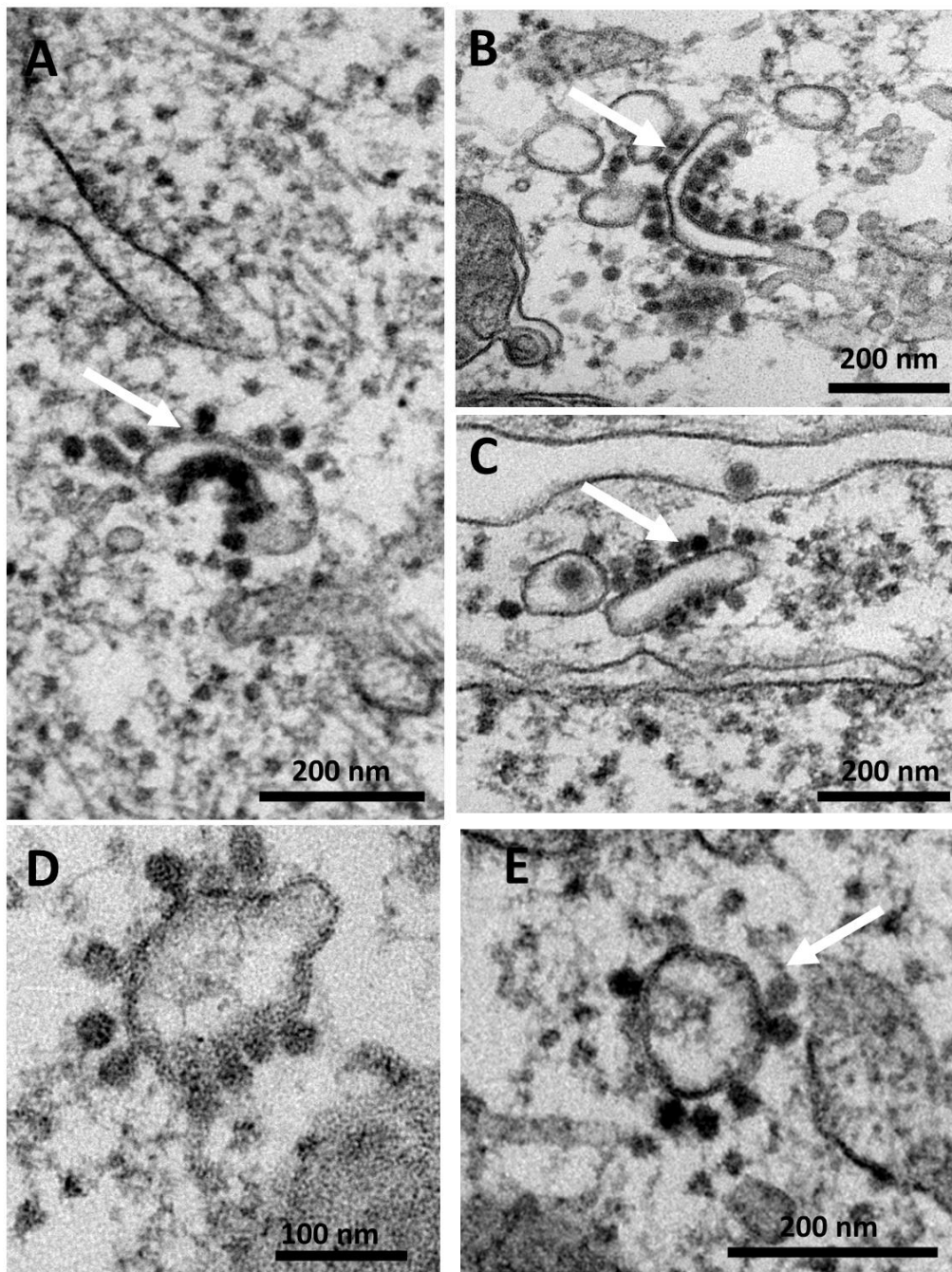


Figura 15: Formação do CPV-II e morfogênese – setas brancas indicam estrutura em destaque. Células Vero infectadas com MAYV a MOI 10 foram analisadas 5 h.p.i. A-C) Esférulas ancoradas a célula. Diferentes formas do CPV-II foram observadas incluindo: A) Meia-lua B) barra curva C) barra reta e forma circular (D-E). As imagens mostram micrografias com as respectivas escalas.

6.1.3.5 Liberação do MAYV

O modo clássico de liberação do vírus maduro durante o ciclo dos alphavirus é através de brotamento pela membrana plasmática. Nesse estudo nós observamos o brotamento das partículas maduras de MAYV começando a partir das 4 h.p.i. embora ainda raro. Na primeira imagem (Figura 16 A) observamos a partícula na esquerda (seta branca) ainda em processo de brotamento e adquirindo seu envelope, e uma na direita (seta preta) recém liberada. Após 5 h.p.i., observamos com maior frequência partículas próximas a parte interna da membrana celular (Figura 16 B) e um número muito maior de partículas já liberadas (Figura 16 C). Além disso observamos além do brotamento clássico a formação de grandes vesículas derivadas da membrana celular contendo várias partículas. Essa estrutura foi observada ancorada a célula (Figura 16 D) com partículas no seu interior próxima a membrana e brotando. As 6 h.p.i. observamos essa estrutura gigante novamente, dessa vez localizada fora da célula e com ainda mais partículas em seu interior (Figura 16 E).

A presença do formas gigantes foi descrita em 1967 para CHIKV (HIGASHI et al., 1967). Essas estruturas funcionam como um mecanismo alternativo de liberação de partículas, em particular quando as mesmas se acumulam rapidamente no citoplasma devido a rápida velocidade de multiplicação desses vírus, e necessitam de uma alternativa além do brotamento individual (CHEN et al., 2013).

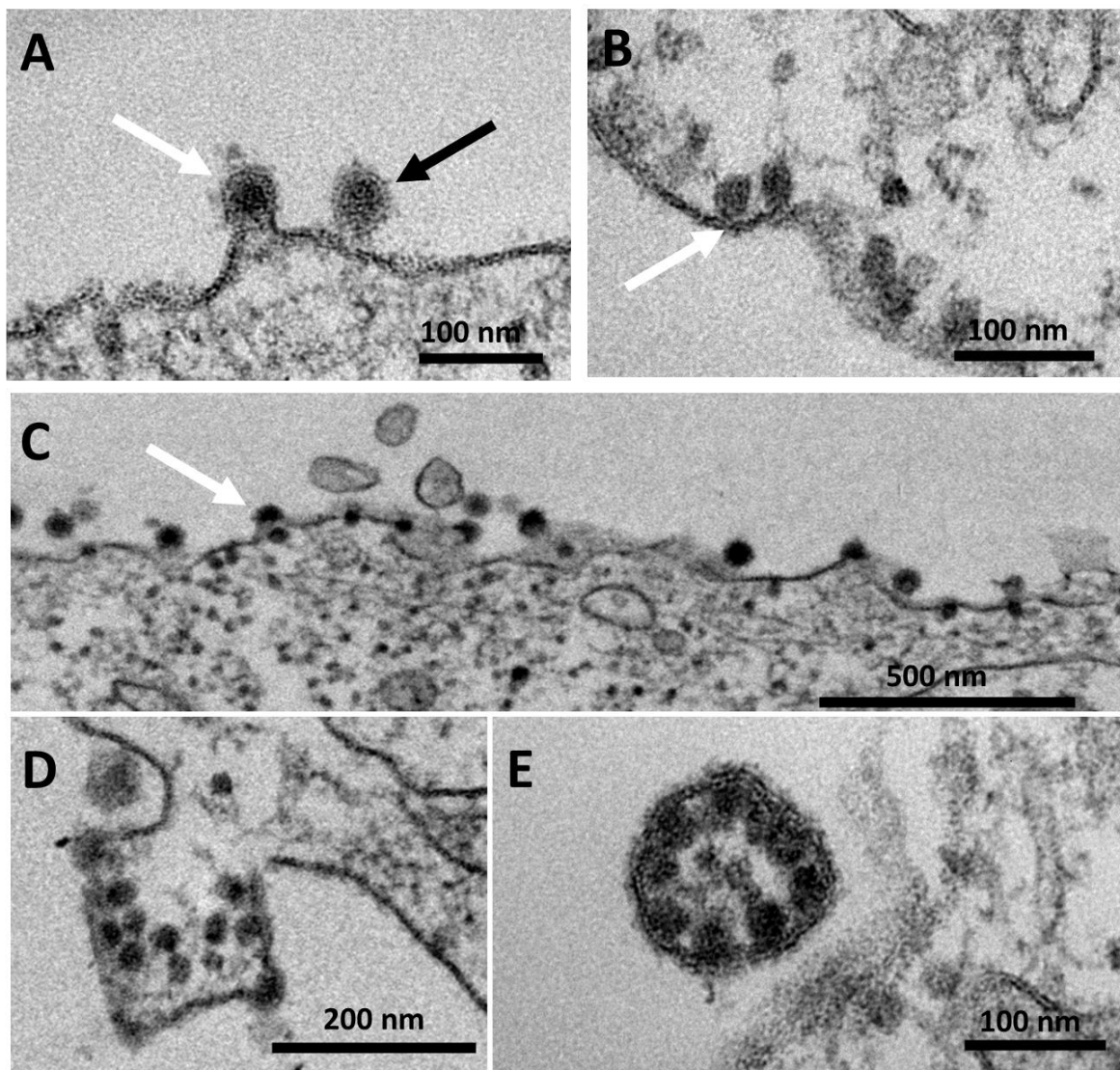


Figura 16: Liberação do MAYV – setas brancas e pretas indicam estrutura em destaque. Células Vero infectadas com MAYV a MOI 10 foram analisadas 4-6 h.p.i. A) Primeiras partículas virais brotando da membrana celular foram observadas 4 h.p.i. A partícula da esquerda (seta branca) está adquirindo o envelope e a da direita (seta preta) já foi liberada. B) Partículas próximas a membrana celular 5 h.p.i. C) Partículas já liberadas 6 h.p.i. D) Formação de uma forma gigante contendo partículas virais 5 h.p.i. E) Forma gigante já fora da célula 6 h.p.i. As imagens mostram micrografias com as respectivas escalas.

6.1.3.6 Estabelecendo uma linha temporal de eventos

Com nossos dados de cinética e microscopia, fomos capazes de organizar os eventos do ciclo de multiplicação do MAYV em uma ordem cronológica e determinando intervalos de tempo

do início desses eventos incluindo: penetração (15-30 m.p.i.), replicação do RNA (2-3 h.p.i.), morfogênese (3-4 h.p.i.) e liberação dos vírions (4-6 h.p.i.). Isso nos possibilitou elaborarmos um diagrama mostrando essa informação temporal (Figura 17), contendo além da linha temporal um resumo visual dos eventos observados.

É importante observar que das condições experimentais utilizadas para caracterização do ciclo (alta MOI) observamos uma sobreposição temporal de eventos, principalmente nas etapas de morfogênese, e em particular relacionado a formação de esférulas e primeiras partículas. O uso de uma MOI menor poderia ajudar a esclarecer essas lacunas, no entanto, a baixa quantidade de partículas torna difícil a observação de eventos em tempos iniciais, e em tempos tardios a sobreposição de ciclos de multiplicação impossibilita a delimitação da ordem correta dos eventos.

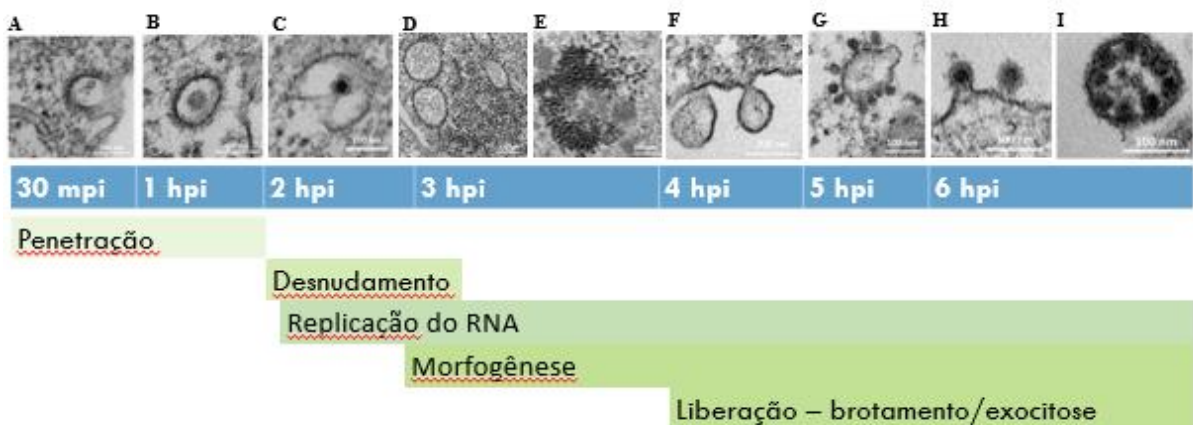


Figura 17: Linha temporal dos eventos do ciclo de multiplicação do MAYV: A) A penetração inicia-se entre 15-30 m.p.i., por endocitose mediada por proteínas clatrina. B) As partículas virais são internalizadas em vesículas celulares 1 h.p.i. C) O desnudamento foi inicialmente observado 2 h.p.i., assim como a replicação do RNA viral. D-E) A morfogênese inicia-se às 3 h.p.i. com D) reorganização de ribossomos e E) formação dos primeiros precursores virais. F) Esférulas podem ser encontradas na maior parte das células 4 h.p.i. G) Os primeiros CPV-II foram observados 5 h.p.i., sendo que o número de partículas aumenta exponencialmente. H-I) As partículas são liberadas em abundância 5 a 6 h.p.i., seja por H) Brotamento ou I) Exocitose por formas gigantes

6.2 Efeitos dos IFs de MEK no ciclo de multiplicação do MAYV

6.2.1 Testes de Citotoxicidade – Inibidores de MEK

O primeiro ensaio com inibidores foi feito com o Trametinib, um IF de MEK potente que já havia se mostrado promissor por trabalhos realizados pelo GTS. Foram utilizados como referência os ensaios de citotoxicidade por MTT já realizados pelo grupo em células Vero (VALENCIA et al., 2021) descartando-se assim a possibilidade de interferência por citotoxicidade do composto *in vitro*. Também foi testado Binimetinib, outro IF de MEK recém adquirido pelo grupo. Para esse IF foi realizado o teste de citotoxicidade testando as concentrações de 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, e 2,5 μ M com base em experimentos pilotos feitos com inibidores de MEK/ERK. Os resultados podem ser observados na figura 18. O inibidor apresentou baixa toxicidade, com perda de células viáveis variando entre 10 e 14% e sem efeitos aparentes na monocamada celular. Com base nesses resultados decidimos incluir o Binimetinib nos testes pilotos antivirais contra MAYV.

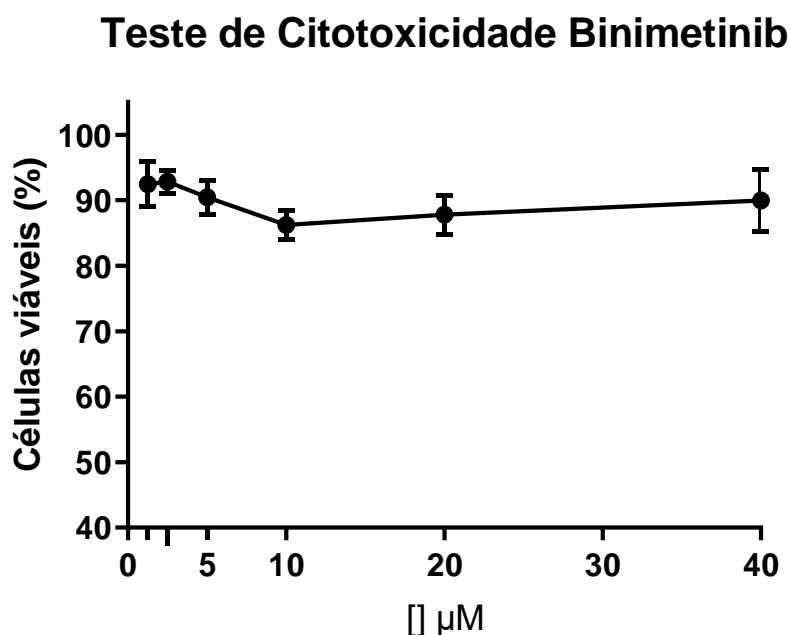


Figura 18 Teste de Citotoxicidade (MTT) Binimetinib: Células VERO foram tratadas com 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, e 2,5 μ M do inibidor Binimetinib durante 24 horas por MTT. Os dados de viabilidade foram apresentados como porcentagem do controle tratado com DMSO e ajustados a uma regressão não linear. As barras representam o desvio padrão.

6.2.2 Análise de intervalos de tempos de adição/remoção do IF e seu impacto nos títulos virais

A próxima etapa foi determinar como a adição/remoção do IF em diferentes intervalos de tempo pós-infecção poderia impactar nos títulos virais. Escolhemos para isso intervalos de tempo nos quais a multiplicação viral ainda estaria em fase exponencial. Para isso, células Vero foram infectadas com o MAYV na MOI de 0.1 e após adsorção por 1 hora foram tratadas com 40 μM e 80 μM de Trametinib. Após 12, 15 e 18 horas o sobrenadante foi coletado e submetido a ensaio de placa por titulação. Os resultados podem ser observados na Figura 19. Observamos uma redução no número de partículas no sobrenadante de 89% ($6.3 \times 10^6 \rightarrow 7 \times 10^5$) às 12 h.p.i., 90% ($2.7 \times 10^7 \rightarrow 2.7 \times 10^6$) às 15 h.p.i. e 91% ($6 \times 10^7 \rightarrow 5.4 \times 10^6$) às 18 h.p.i. no título viral. Utilizando uma concentração maior não observamos um aumento na atividade inibitória, tendo valores de redução de 81% ($6.3 \times 10^6 \rightarrow 4 \times 10^5$), às 12 h.p.i., 92% ($2.7 \times 10^7 \rightarrow 2.3 \times 10^6$) às 15 h.p.i. e 75% ($6 \times 10^7 \rightarrow 1.5 \times 10^7$) às 18 h.p.i. no título viral.

Considerando que o Binimetinib também é um inibidor de MEK/ERK decidimos testá-lo em condições semelhantes ao Trametinib no tempo de 15 h.p.i., (Figura 20), no entanto, observamos uma redução de apenas 32% ($2.7 \times 10^7 \rightarrow 1.8 \times 10^7$) no título viral. Esse experimento foi repetido, porém mesmo utilizando 80 μM , a redução ainda foi de apenas 19% ($2.7 \times 10^7 \rightarrow 2.2 \times 10^7$).

O Binimetinib também é um inibidor de MEK, porém apresenta IC50 dez vezes menor do que a do Trametinib de acordo com dados do fabricante (Selleckchem). Essa diferença poderia explicar a ausência do efeito inibitório do composto nessas condições. Decidimos por não continuar os estudos com o Binimetinib, visto que o Trametinib não só se mostrou mais eficiente como também encontra-se já aprovado para uso em humanos para tratamento de melanoma em estágios avançados (WRIGHT; MCCORMACK, 2013).

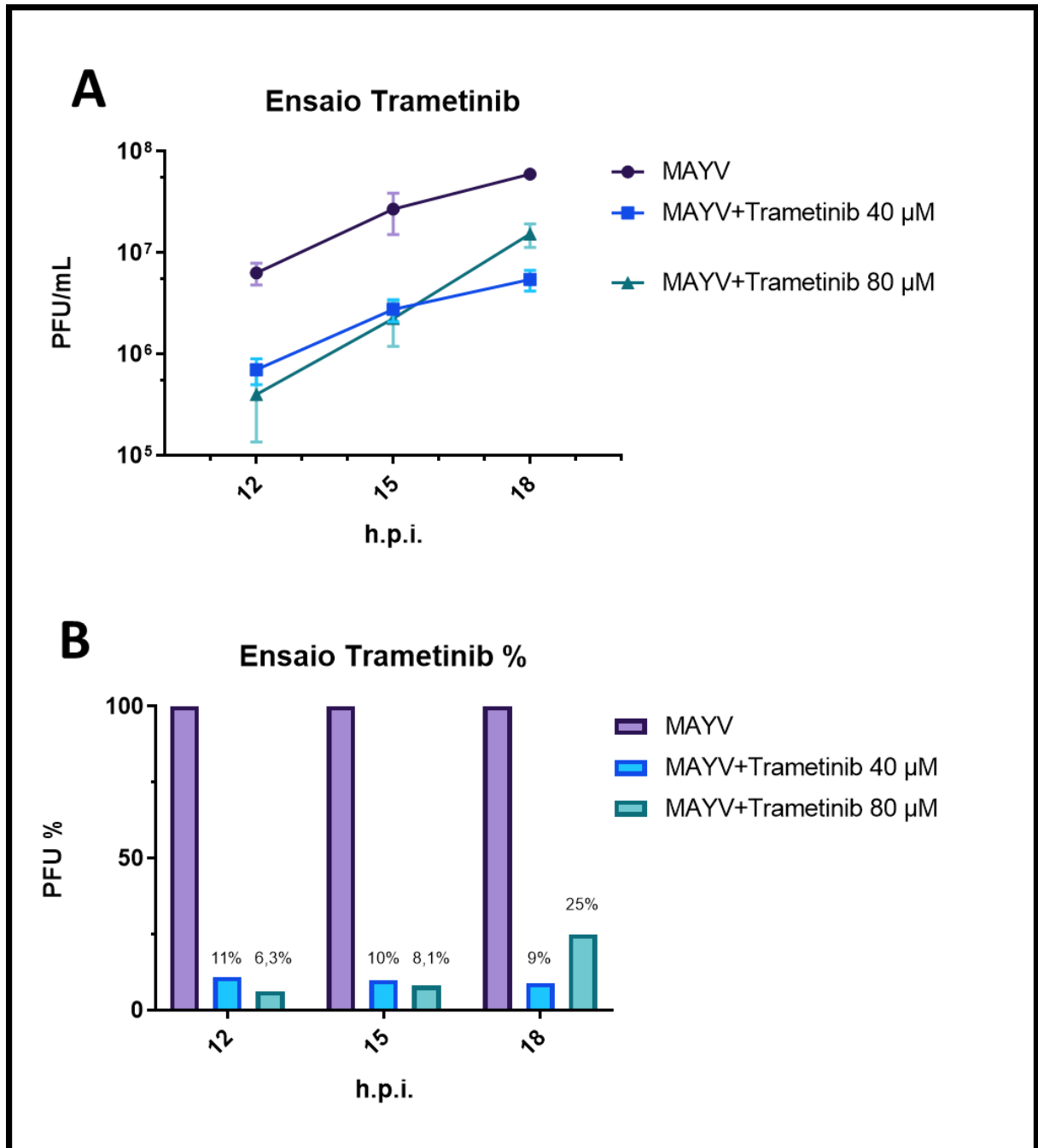


Figura 19: Intervalos de tempos de adição/remoção do Trametinib e seu impacto nos títulos virais – Células VERO foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e tratadas com Trametinib nas concentrações de 40 μ M e 80 μ M. O sobrenadante foi coletado nos tempos especificados. A) Resultados em valores absolutos em gráfico tipo curva. B) Resultados em valores percentuais comparados a amostras infectadas não tratadas. Barras representam desvio padrão.

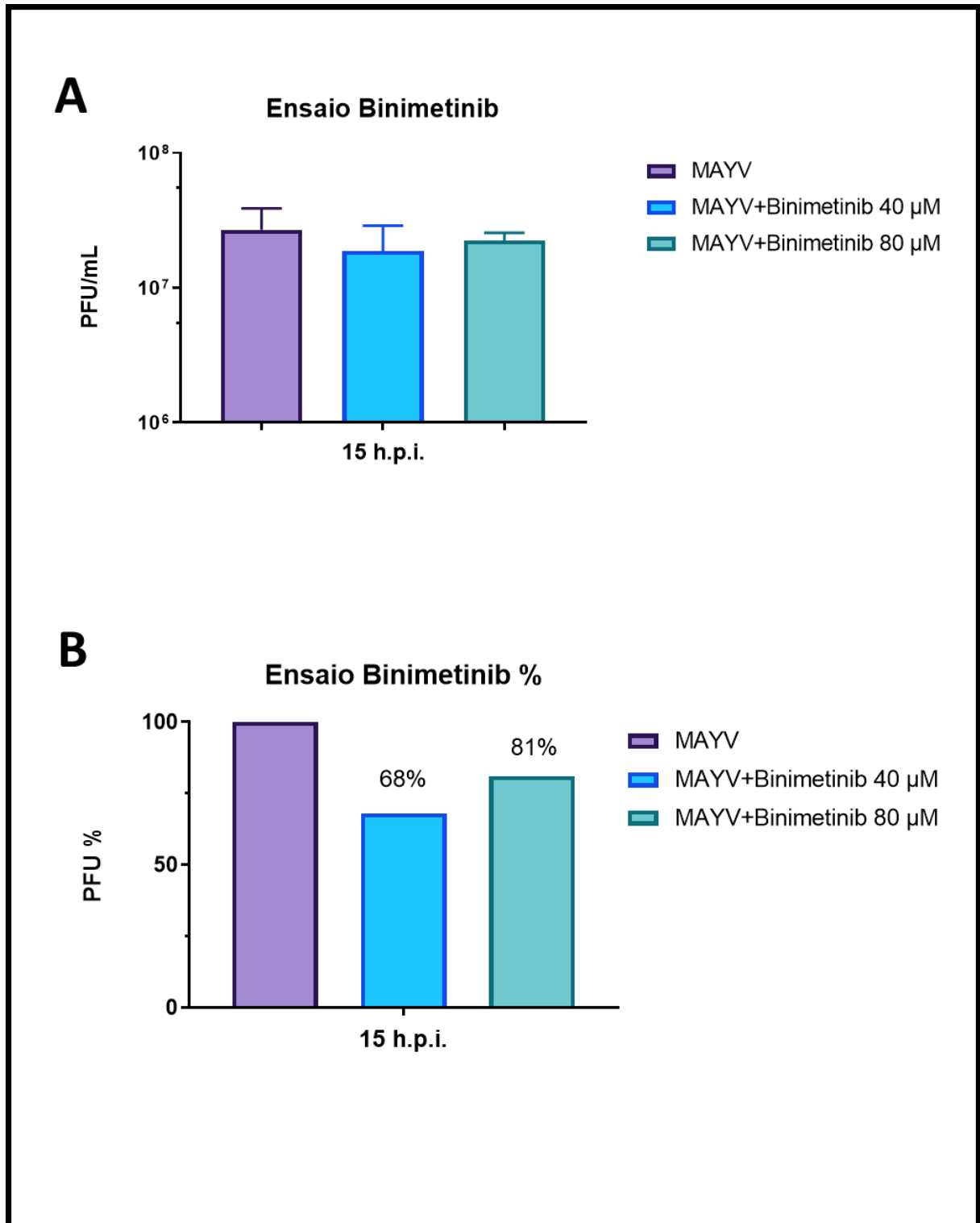


Figura 20: Adição do Binimetinib e seu impacto nos títulos virais – Células VERO foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e tratadas com Binimetinib nas concentrações de 40 μ M e 80 μ M. O sobrenadante foi coletado 15 h.p.i. A) Resultados em valores absolutos. B) Resultados em valores percentuais comparados a amostras infectadas não tratadas. Barras representam desvio padrão.

6.2.3 Ensaio dose-resposta do Trametinib sobre o título de MAYV

Para o Trametinib fizemos então um ensaio dose-resposta para avaliar a melhor concentração efetiva do inibidor. Para isso células Vero foram infectadas com MAYV a MOI de 0,01 e após o período de adsorção de 1 hora foram adicionadas diferentes concentrações do inibidor (10, 20 e 40 μM). O sobrenadante foi coletado 16 h.p.i., um intervalo de tempo apropriado onde observamos redução no número de partículas virais. Os resultados podem ser observados na Figura 21.

No intervalo de tempo analisado, observamos uma redução no título do MAYV no número de partículas no sobrenadante de 86% ($2,4 \times 10^7 \rightarrow 3,6 \times 10^6$) com 40 μM , 89% ($2,4 \times 10^7 \rightarrow 2,9 \times 10^6$) com 20 μM e 40% ($2,4 \times 10^7 \rightarrow 1,5 \times 10^7$) com 10 μM . Considerando os resultados obtidos decidimos continuar trabalhando com a concentração de 20 μM para os próximos experimentos.

Finalmente compilamos os dados obtidos em uma curva dose resposta com o objetivo de determinar a IC₅₀ do Trametinib em células Vero contra MAYV. Para isso um gráfico XY foi construído, e o valor IC₅₀ calculado na curva foi de 10,1 μM (Figura 21 C). Em ensaios anteriores do nosso grupo calculamos a IC₅₀ desse inibidor para diversos flavivírus, incluindo: ZIKV (3,03 μM), DENV2 (2,46 μM), DENV3 (6,33 μM) e YFV (7,91) obtendo valores um pouco menores quando comparados aos contra MAYV (VALENCIA et al., 2021).

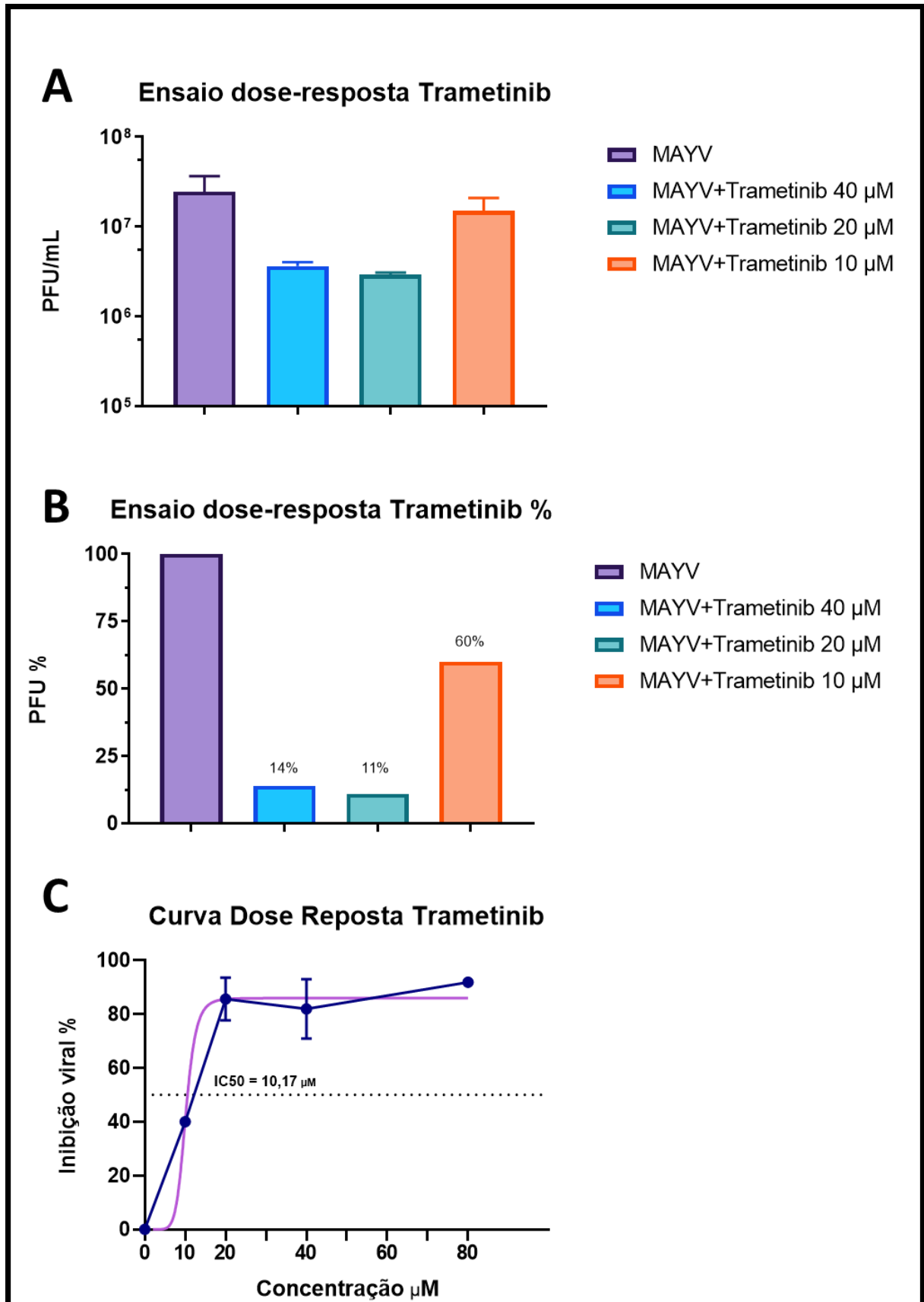


Figura 21 Ensaio dose-resposta do efeito de Trametinib sobre MAYV – Células VERO foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e tratadas com diferentes concentrações

de Trametinib indicadas. Os títulos virais (PFu/mL) foram determinados 16 h.p.i. A) Resultado em valores absolutos B) Resultados em valores percentuais comparados a amostras infectadas não tratadas. C) Curva Dose resposta Trametinib mostrando percentuais de inibição, respectivas concentrações com valor $IC_{50} = 10,17 \mu M$. Barras representam o desvio padrão.

6.2.4 Análise do efeito do Trametinib no ciclo de multiplicação do MAYV por MET

Realizamos um ensaio com MET para avaliar os eventuais efeitos do Trametinib no ciclo de multiplicação do MAYV. Para isso, células Vero foram semeadas em garrafas pequenas cada uma com 2,5 milhões de células. No dia seguinte as células foram infectadas com o MAYV na MOI de 0.1 e após adsorção, tratadas com DMSO (controle infectado) ou $20 \mu M$ de Trametinib (infectado tratado), e após 13 horas, o sobrenadante foi removido e a monocamada preparada para a MET.

A análise de células infectadas com MAYV revelou grande quantidade de partículas no citoplasma das células, (Figura 22 A), agregadas em torno ou próximas a diversos CPV-II (Figura 22 B) e formando grupos próximos a membrana celular pré-liberação (Figura 22 C). Nesse intervalo de tempo as células ainda foram observadas em grande maioria intactas. Por outro lado, as amostras tratadas apresentaram um número de partículas significativamente menor (Figura 23 A-B), incluindo diversas células onde não foram encontradas partículas. Por outro lado, o número de esférulas observadas foi maior e em muitas células foram encontradas e grupos grandes (Figura 23 C). Não foram observados CPV-II. Essas características sugerem que o inibidor apesar de incapaz de reduzir completamente a multiplicação viral causou ou uma redução, ou um retardo no mesmo quando comparado as amostras não tratadas.

Além da observação qualitativa, também decidimos fazer uma análise quantitativa, para averiguar a real redução na quantidade de partículas virais com o tratamento. Para isso fizemos a contagem de partículas em diversas imagens obtidas durante a análise por microscopia sendo 7 na escala de 500 nm e 13 na escala de 200 nm todas em campos diferentes (Figura 24). O número total de partículas virais nas amostras não tratadas e tratadas com Trametinib foi de 825 e 132, e o valor médio de 41 e 6 respectivamente, uma redução de 82%. Esse valor foi significativo ($P=0,0098$ – teste t com correção Welch). **Numero de campos**

O Trametinib já foi anteriormente utilizado pelo GTS como potencial viral 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 Trametinib para o uso como potencial

antiviral. Em trabalhos anteriores do grupo, o IF foi capaz de reduzir em 1-2 log₁₀ a multiplicação de DENV, ZIKV e CHIKV (VALENCIA et al., 2021). Além disso, no trabalho publicado pelo grupo em 2014 (ALBARNAZ et al., 2014), o U0126, inibidor mais antigo de MEK/ERK, foi capaz de reduzir a replicação do YFV em até 70% e a multiplicação de flavivírus incluindo DENV-2 e 3 em até 2 log₁₀. Por último, outro trabalho publicado pelo grupo recentemente (OLIVEIRA et al., 2020), também mostrou que outro inibidor de MEK/ERK, o AZD6244, foi capaz de reduzir em 2-3 log₁₀ a multiplicação de DENV2, DENV3 e SLEV *in vitro*, além de reduzir a mortalidade de camundongos AG129 infectados com DENV-2 em 60%.

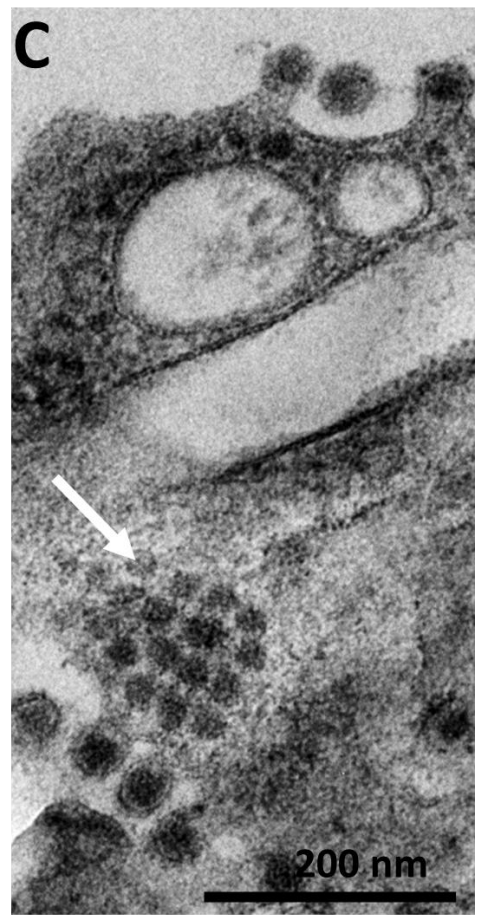
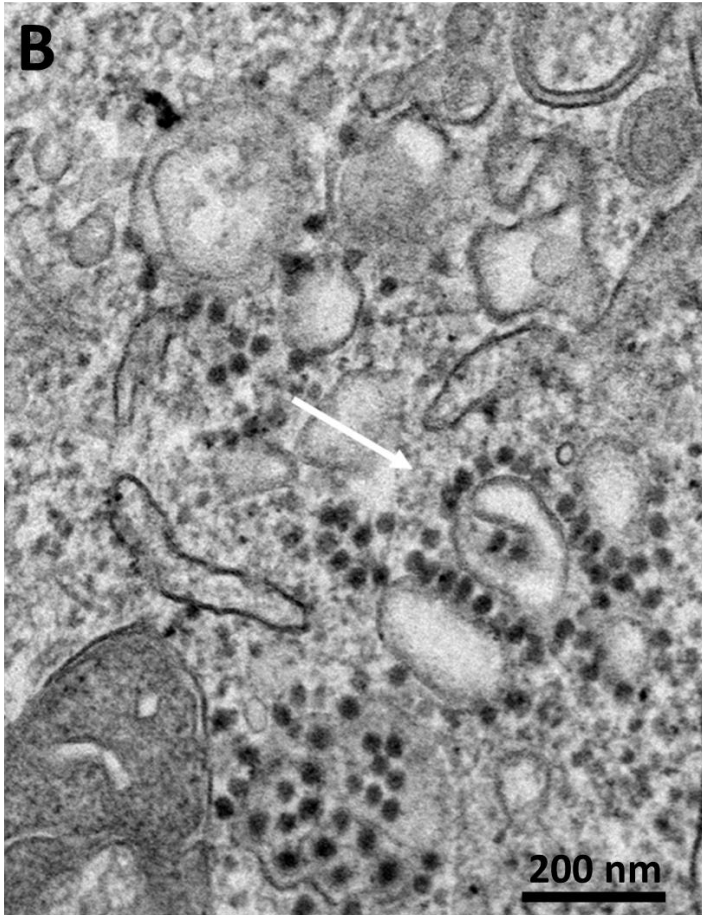
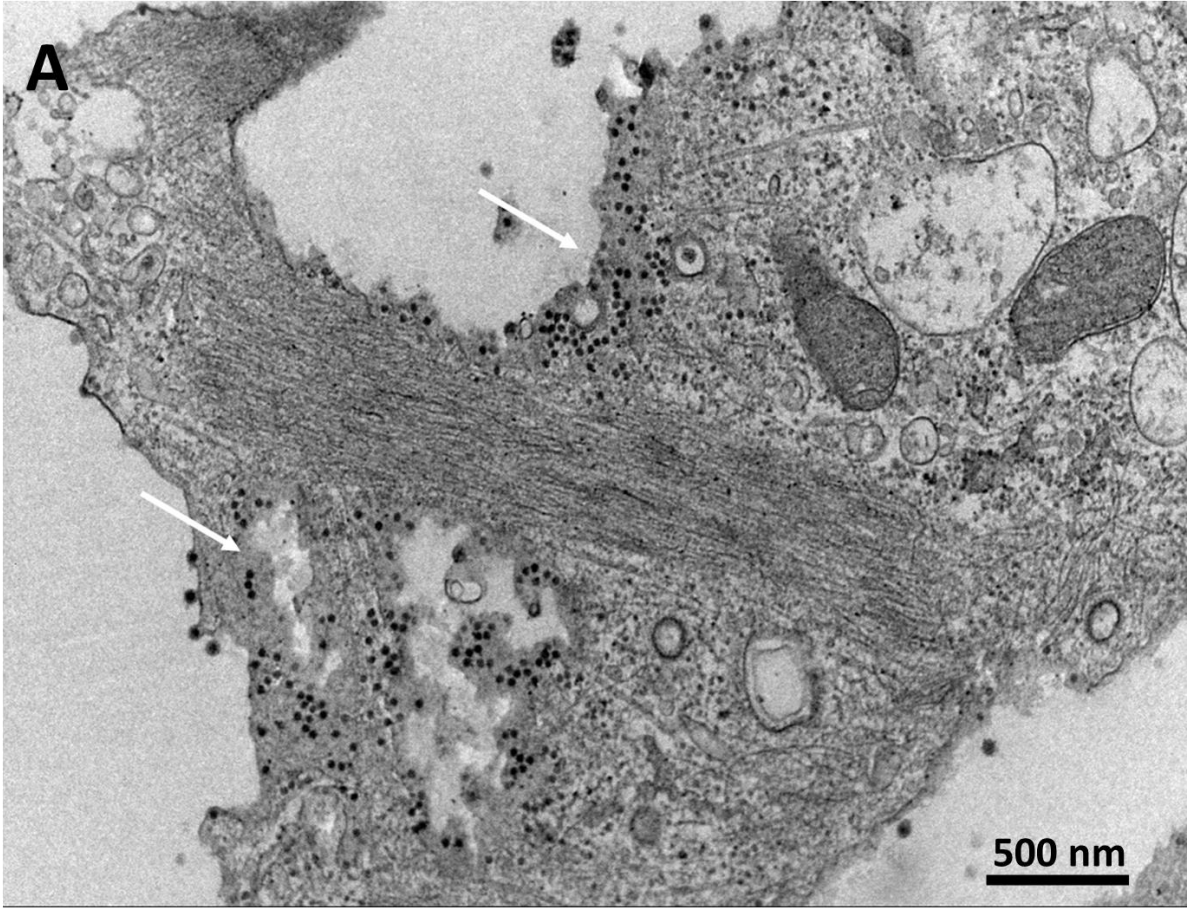


Figura 22: Células infectadas com MAYV e tratadas com DMSO - Setas brancas indicam partículas virais. Células Vero foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e pós adsorção tratadas com DMSO (Mock). Após 13 horas a monocamada foi coletada e preparada para microscopia A) Imagem mostrando grande área de uma célula infectada com inúmeras partículas no citoplasma. B) Partículas próximas a diversas formas de CPV-II (setas pretas). C) Partículas em grupo próximo a membrana celular. As imagens mostram micrografias com respectivas escalas.

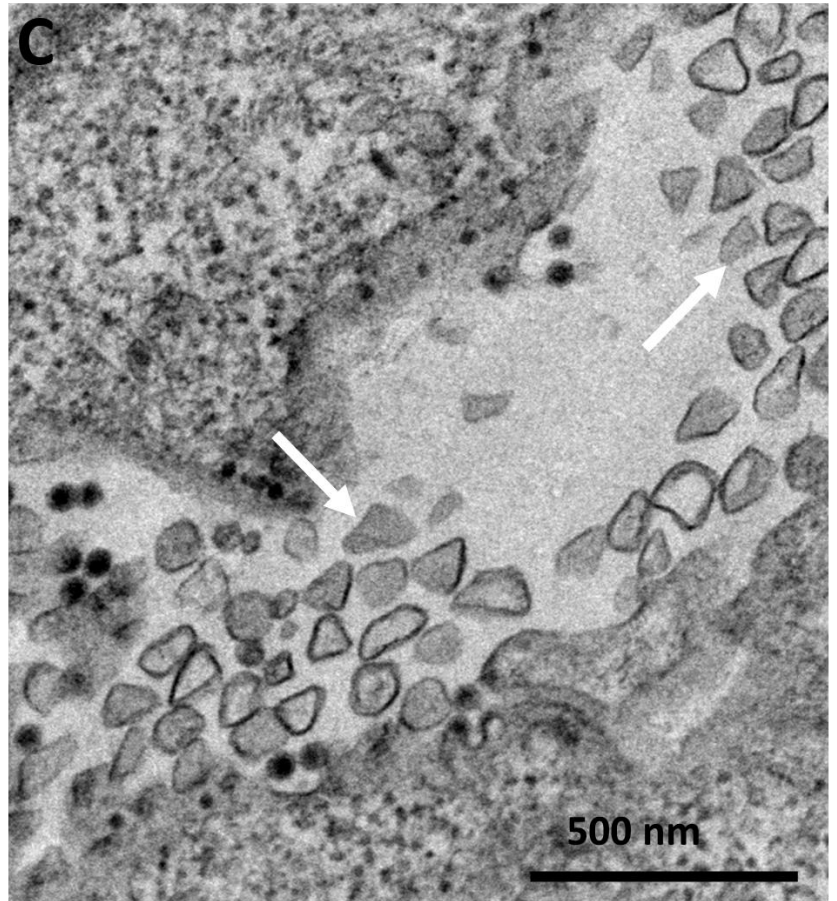
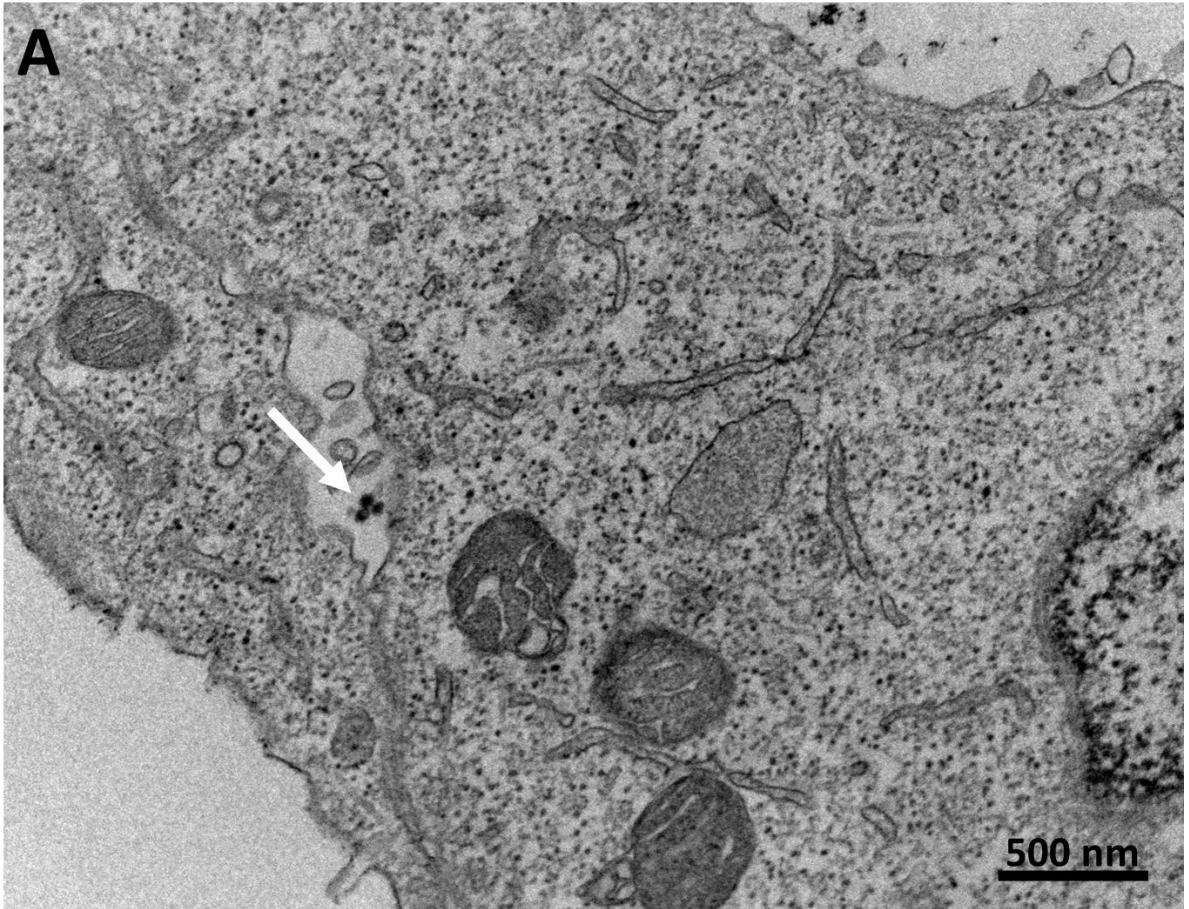


Figura 23: Células infectadas com MAYV e tratadas com Trametinib - Setas brancas indicam partículas virais. Células Vero foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e pós adsorção tratadas com 20 μ M de Trametinib. Após 13 horas a monocamada foi coletada e preparada para microscopia A) Imagem mostrando grande área de uma célula com raras partículas observadas. B) Raras partículas já liberadas. C) Presença de diversas esférulas. As imagens mostram micrografias com respectivas escalas.

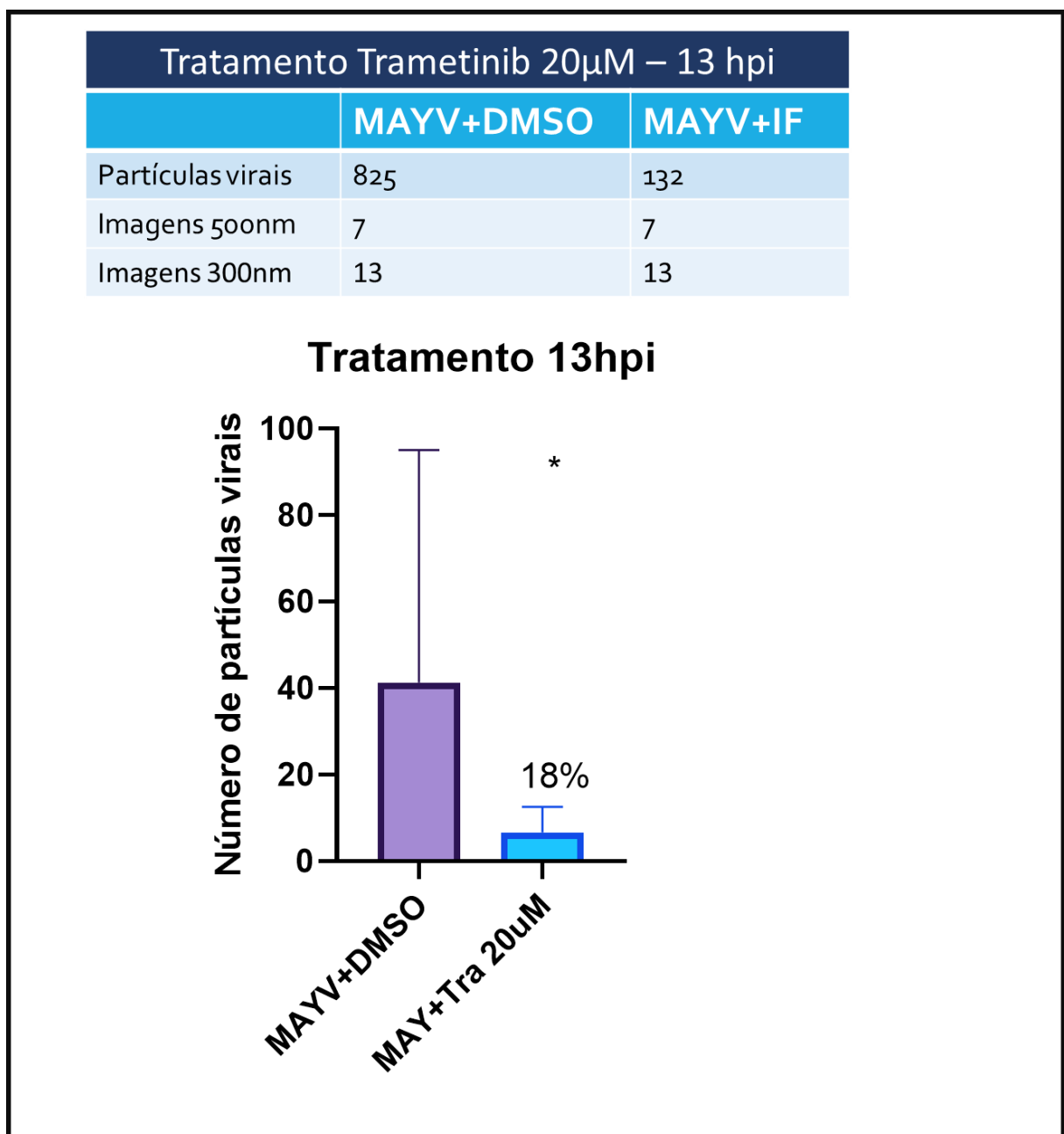


Figura 24: Quantificação das partículas virais de células infectadas com MAYV e tratadas com DMSO ou Trametinib– Células Vero foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e pós adsorção tratadas com DMSO (Mock) ou 20 μM de Trametinib. Imagens de MET foram analisadas com o objetivo de quantificar o número de partículas. A) Tabela com o número total contabilizado e a quantidade de imagens analisadas. B) Gráfico de colunas mostrando a quantidade média de partículas observadas em amostras tratadas e não tratadas. Asterisco mostra que foi observada uma diferença significativa ($P=0,0098$ – teste t com correção Welch). Barras representam o desvio padrão.

6.2.5 Análise do efeito dos inibidores farmacológicos AKTi, AUKi, JNKi e Selumetinib sobre a multiplicação do MAYV.

Além dos inibidores testados de MEK, também fizemos um ensaio piloto, utilizando os IFs: AKTi (Pi3K/AKT), AUKi (Aurora cinases), JNKi (JNK) e outro inibidor de MEK, o Selumetinib (AZD6244). Para esse ensaio células Vero foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e após 1 hora de adsorção tratadas com os inibidores nas seguintes concentrações: 20 μM do AKTi; 10 μM do AUKi; 40 μM do JNKi e 40 μM do Selumetinib. O sobrenadante foi coletado 16 h.p.i. Os resultados podem ser observados na Figura 25.

O Selumetinib reduziu em apenas 17% ($3,96 \times 10^7 \rightarrow 3,3 \times 10^7$). O inibidor de AKT, por outro lado, aumentou número de partículas em 150 % ($3,96 \times 10^7 \rightarrow 6 \times 10^7$). O inibidor de Aurora se mostrou citotóxico até 2,5 μM e decidimos por não o utilizar. Finalmente o inibidor de JNK se mostrou o mais eficiente sendo capaz de reduzir a quantidade de partículas do sobrenadante 89% ($3,96 \times 10^7 \rightarrow 4,7 \times 10^6$).

JNK é uma MAPK, e como tal está envolvida em uma variedade de respostas a diferentes estímulos, em particular a estresse causado por fatores bióticos e abióticos como mudanças osmóticas, estresse oxidativo e infecções (ZEKE et al., 2016). Alguns trabalhos já relacionaram a via de JNK com infecções virais, como DENV (CEBALLOS-OLVERA et al., 2010; SREEKANTH et al., 2017), varicella-zoster virus (VZV) (KURAPATI et al., 2017), hepatitis B virus (HBV) (CHEN et al., 2019) e o CHIKV (NAYAK et al., 2019), mostrando a importância dessa cinase na multiplicação desses vírus. Dessa forma, não seria inesperado JNK

também estar relacionada ao ciclo do MAYV, e mais estudos serão realizados para entender o papel dessa via no ciclo de multiplicação deste vírus.

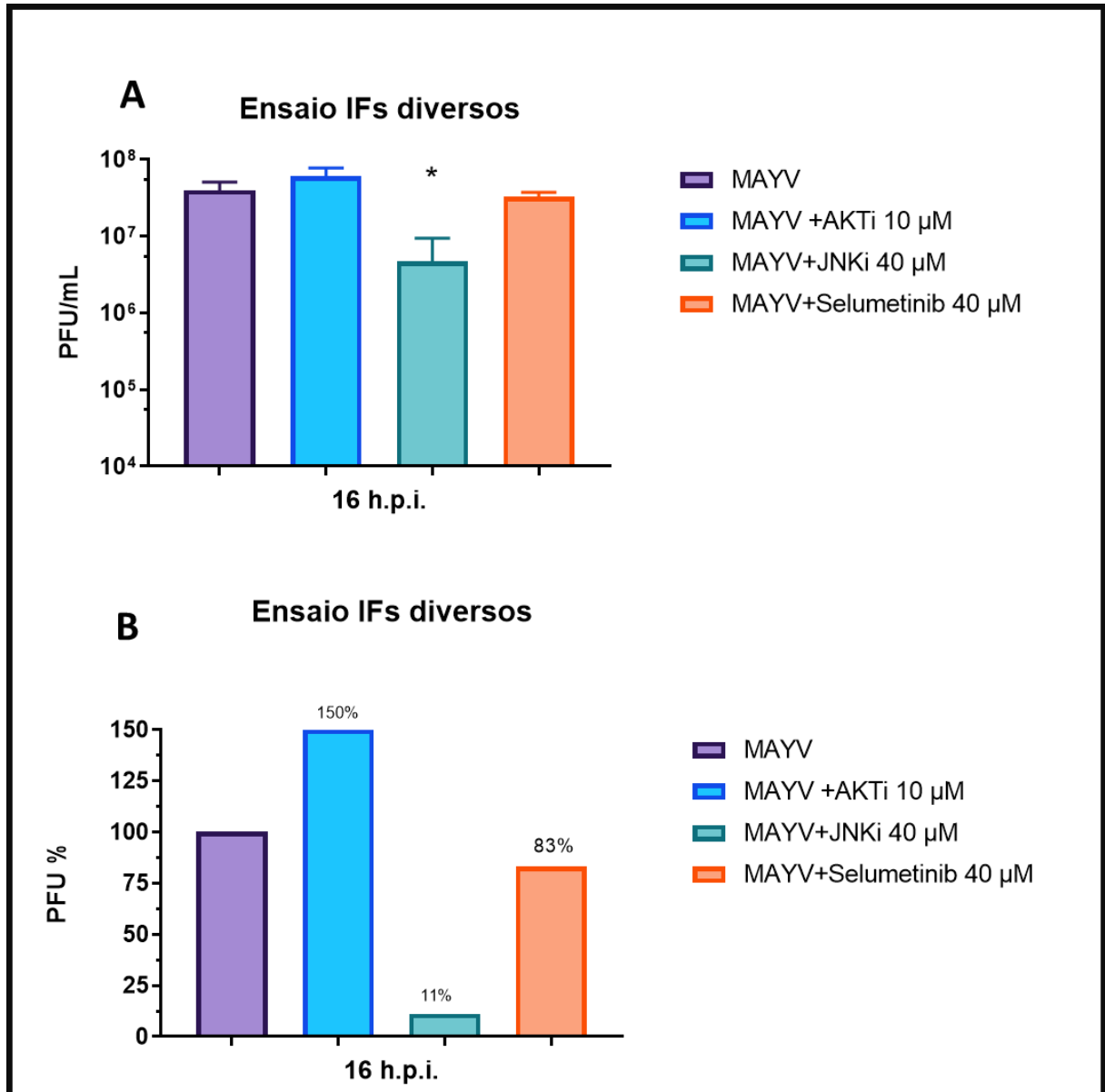


Figura 25: Ensaio IFs AKTi, JNKi e Selumetinib – Células VERO foram carenciadas, infectadas com MAYV a MOI 0.1 e tratadas com diferentes IFs indicados, sendo os sobrenadantes coletados às 16 h.p.i. A) Resultado em valores absolutos B) Resultados em valores percentuais comparados a amostras infectadas não tratadas. Barras representam o desvio padrão.

6.3 Ensaios de infecção e tratamento em modelo murino

Os dados obtidos nesse trabalho, muito embora por MET não seja possível afirmar, os resultados obtidos por ensaio de placa confirmam que o Trametinib é capaz de reduzir a produção de partículas virais em células VERO durante infecção com o MAYV em particular durante a fase exponencial do ciclo dele. Baseando-se nessas informações decidimos então avaliar o potencial desse inibidor *in vivo* utilizando modelo murino.

A padronização dos ensaios *in vivo* com modelos de infecção para o MAYV foi realizada com o objetivo de encontrar um modelo apropriado em que fosse possível avaliar diversos sinais da infecção viral frente ao tratamento com o Trametinib. Os experimentos pilotos avaliaram 2 linhagens distintas de camundongos: uma selvagem (C57BL/6) e outra KO (A129), observando-se suas respectivas respostas a infecções.

6.3.1 Ensaio da infecção de camundongos A129 com MAYV

O primeiro ensaio realizado com esses animais imunodeficientes teve como objetivo avaliar a resposta dos animais a infecção (teste de sobrevivência). Para isso foram utilizados grupos de 4 machos e fêmeas adultos (8 semanas de idade, e duas doses de infecção: 100 PFU e 1000 PFU por animal.

O ensaio foi letal para todos os animais com ambas as doses, com 100% de mortalidade no terceiro dia para a dose de 1000 PFU e quarto dia para a dose de 100 PFU (Figura 26). Os animais não apresentaram perda de peso, nem presença de sinais de infecção antes da morte deles. Portanto, frente às condições apresentadas o modelo não se mostrou adequado para os ensaios subsequentes com o Trametinib.

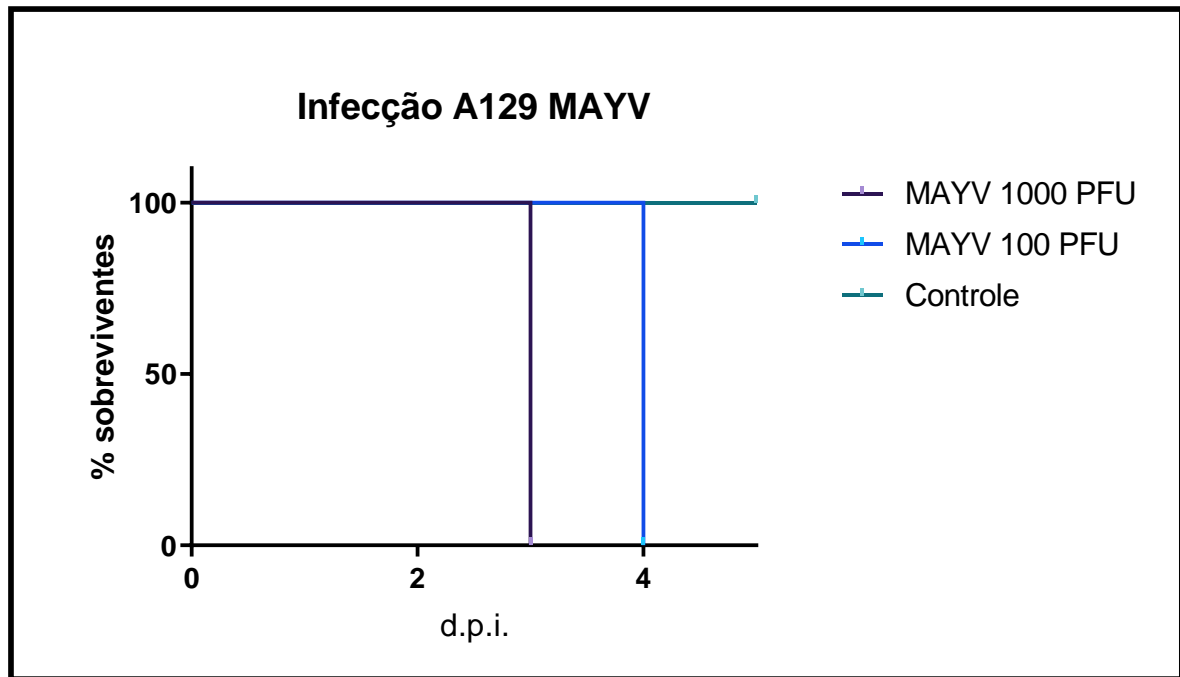


Figura 26: Teste de Sobrevivência de camundongos A129 com MAYV. Grupos de 8 animais (4 machos e 4 fêmeas) foram infectados com diferentes inóculos de MAYV via intraplantar e sua mortalidade avaliada ao longo de 5 dias. Linha verde: controle, linha roxa: animais inoculados 1000 PFU, linha azul: animais inoculados com 100 PFU. Os dois grupos apresentaram 100% de mortalidade no terceiro d.p.i. (1000 PFU) e quarto d.p.i. (100 PFU)

6.3.2 Infecção dos camundongos C57BL/6 com MAYV – Via de inoculação

Animais C57BL/6 foram escolhidos para servirem como modelo de infecção de organismos imunocompetentes pelo MAYV. Animais com 15-18 dias de idade foram infectados com 7×10^5 PFU, sendo inicialmente testadas duas vias de inoculação: intraplantar e BFL. A dose escolhida foi baseada em um modelo utilizado em um trabalho publicado com BALB/C (SANTOS et al., 2019) em que utilizaram animais com idade aproximada. Reduzimos no entanto a dose infectante de aproximadamente 1×10^7 PFU para 7×10^5 PFU devido a ao título viral das amostras utilizadas para infecção. Três grupos foram utilizados, cada um com 4 animais, machos e fêmeas. Os dois grupos infectados apresentaram perda de peso a partir do quinto dia até o último dia analisado. O grupo controle se manteve estável até o sexto dia, e após isso apresentou aumento de peso até o décimo dia (Figura 27 A). Os dois grupos também apresentaram padrões de mortalidade semelhantes, com mortes ocorrendo a partir do quinto dia

para o grupo intraplantar, e sétimo dia para o BFL e continuando até o décimo dia quando a mortalidade chegou a 100% (Figura 27 B).

Sinais de infecção também foram avaliados, sendo seis os principais: inchaço nas patas traseiras; piloereção; arqueamento dorsal; tremores; dificuldade de locomoção e conjuntivite (Figura 28). Todos os sinais persistiram até a morte dos animais, salvo exceções mencionadas. Todos os animais apresentaram inchaço nas patas traseiras a partir do segundo dia para os dois grupos. Piloereção iniciou no quarto dia para o grupo intraplantar e no terceiro em um dos animais do grupo BFL. Arqueamento dorsal apareceu de maneira mais progressiva, a partir de 5/4 d.p.i. e presente em todos os animais 7/6 d.p.i. para os grupos intraplantar e BFL respectivamente. Animais começaram a apresentar dificuldade de locomoção 7 d.p.i. para ambos os grupos. Conjuntivite foi inicialmente observada no sétimo dia para o grupo BFL e oitavo dia para o intraplantar. Finalmente já no primeiro d.p.i. animais do grupo BFL apresentaram fortes tremores cuja frequência observada diminuiu até o quinto dia, retornando a aumentar após essa data. No grupo intraplantar, tremores só surgiram no sétimo dia.

O grupo intraplantar apresentou sinais mais tardiamente variando entre 0-2 dias, no entanto o padrão de sinais e desfecho final foi o mesmo para ambos. Decidimos então continuar nossos experimentos com a via intraplantar, visto sua maior utilização na literatura.

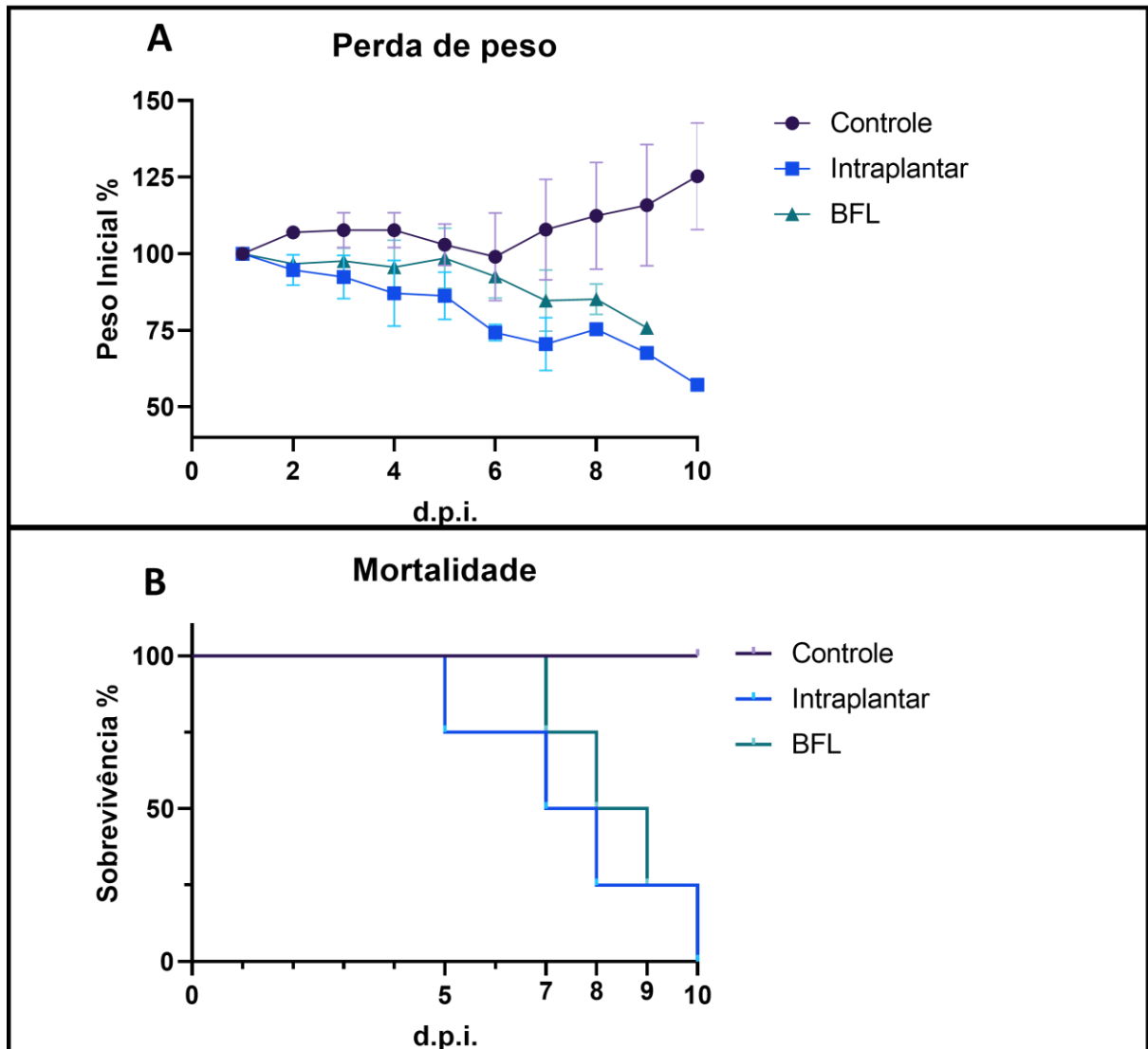


Figura 27: Variação de peso e mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV através de duas vias de inoculação - grupos de 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) foram infectados com 7×10^5 PFU de MAYV por duas vias de inoculação: via intraplantar e via BFL (abaixo da pata posterior). A) O peso foi medido diariamente e o valor mostrando em percentuais relativos ao primeiro dia. Linha roxa: controle, linha azul: via intraplantar, linha verde: BFL B) Análise da mortalidade dos animais. Linha roxa: controle, linha azul: via intraplantar, linha verde: BFL. Barras representam desvio padrão.

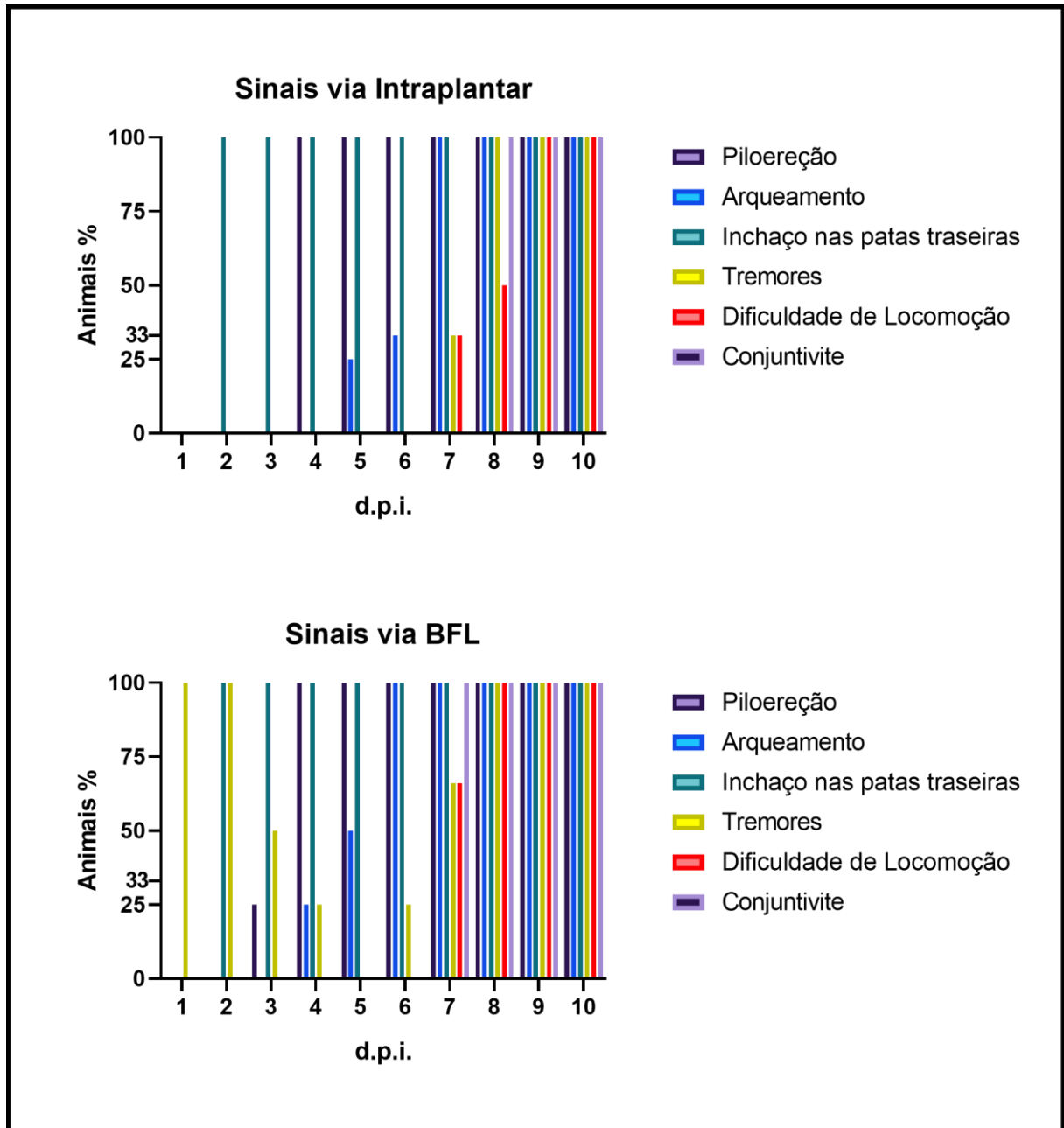


Figura 28: Observação dos sinais clínicos verificados após a infecção de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV, através de duas vias de infecção - grupos de 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) foram infectados com 7×10^5 PFU de MAYV por duas vias de inoculação: via intraplantar e via BFL (abaixo da pata posterior). Os sinais de infecção foram avaliados diariamente e representados no gráfico em percentuais do total.

6.3.3 Infecção dos camundongos C57BL/6 com MAYV e tratamento com Trametinib

Para avaliar o efeito do Trametinib em animais infectados com MAYV, foi realizado o tratamento com a administração do inibidor diariamente a partir do primeiro d.p.i. A dose do Trametinib escolhida foi de 2mg/kg, recomendada para tratamento em humanos, e selecionada

após um ensaio piloto em que não se verificou sinais clínicos aparentes ou perda de peso. As condições experimentais foram semelhantes às do tópico anterior. Três grupos distintos foram avaliados sendo eles Controle (n=3), MOCK (n=9) e tratados (n=8) todos com machos e fêmeas distribuídos de maneira heterogênea. Para os animais infectados, metade do grupo foi separada para análise de mortalidade e perda de peso e a outra metade para coleta dos órgãos no quinto d.p.i.

O grupo infectado apresentou perda de peso 2 d.p.i. enquanto o peso grupo tratado se manteve estável durante todo o curso da infecção. O grupo controle apresentou aumento de peso já a partir do primeiro d.p.i. (Figura 29 A). No grupo infectado as primeiras duas mortes ocorreram no quinto d.p.i., a segunda 7 d.p.i. e a última apenas 11 d.p.i., quando o animal já aparentava sinais de melhora. Já no grupo infectado/tratado apenas um animal veio a óbito no quarto d.p.i., mostrando uma redução na taxa de mortalidade de 75% (Figura 29 B)

Sinais de infecção também foram avaliados de acordo com os que foram observados no experimento anterior, excluindo tremores e dificuldade de locomoção que se mostraram mais arbitrários de acordo com o viés do observador. Não observamos diferença no tempo de surgimento de piloereção com ambos os grupos apresentando esse sinal a partir do primeiro d.p.i. em um animal, progredindo para os outros até o terceiro d.p.i. (Figura 30 A). Nos dois grupos o arqueamento dorsal surgiu simultaneamente em todos os animais, no entanto no grupo infectado surgiu um dia antes (3 d.p.i.) comparado ao grupo infectado/tratado (Figura 30 B). Todos os animais apresentaram inchaço nas patas traseiras a partir do segundo d.p.i., com exceção de um dos animais do grupo infectado que apresentou a partir do terceiro d.p.i. (Figura 30 C). A conjuntivite foi o sinal de infecção que apresentou maior variação. Para o grupo infectado, 2 d.p.i. surgiu em 2 dos animais infectados, e no quarto em um terceiro. No quinto dia, os dois primeiros animais vieram a óbito e o quarto passou a apresentar o sinal. Finalmente no sétimo dia o terceiro animal morreu e o último apresentou melhora na conjuntivite. Já no grupo dos animais infectados/tratados, apenas um animal apresentou o sinal 2d.p.i., o mesmo que veio a óbito no 4 d.p.i. (Figura 30 D)

Também fizemos a análise da carga genômica e de partículas infecciosas, em amostras coletadas dos animais 5 d.p.i. Os órgãos coletados foram: fígado, baço, olho, cérebro e pata traseira. A análise da carga viral foi feita pelo método de quantificação relativa pelo método de $\Delta \Delta C_t$, tendo como controle interno o alvo β -actina murina. Como pode-se observar na figura 31, houve uma tendência de redução na carga genômica para os animais tratados. O baço apresentou redução de 78%, fígado de 60%, e o cérebro de 100%. Amostras da pata e do olho

não apresentaram redução. Com relação a esses valores apenas a redução do cérebro foi considerada significativa de acordo com análise estatística por teste t ($P=0,039$).

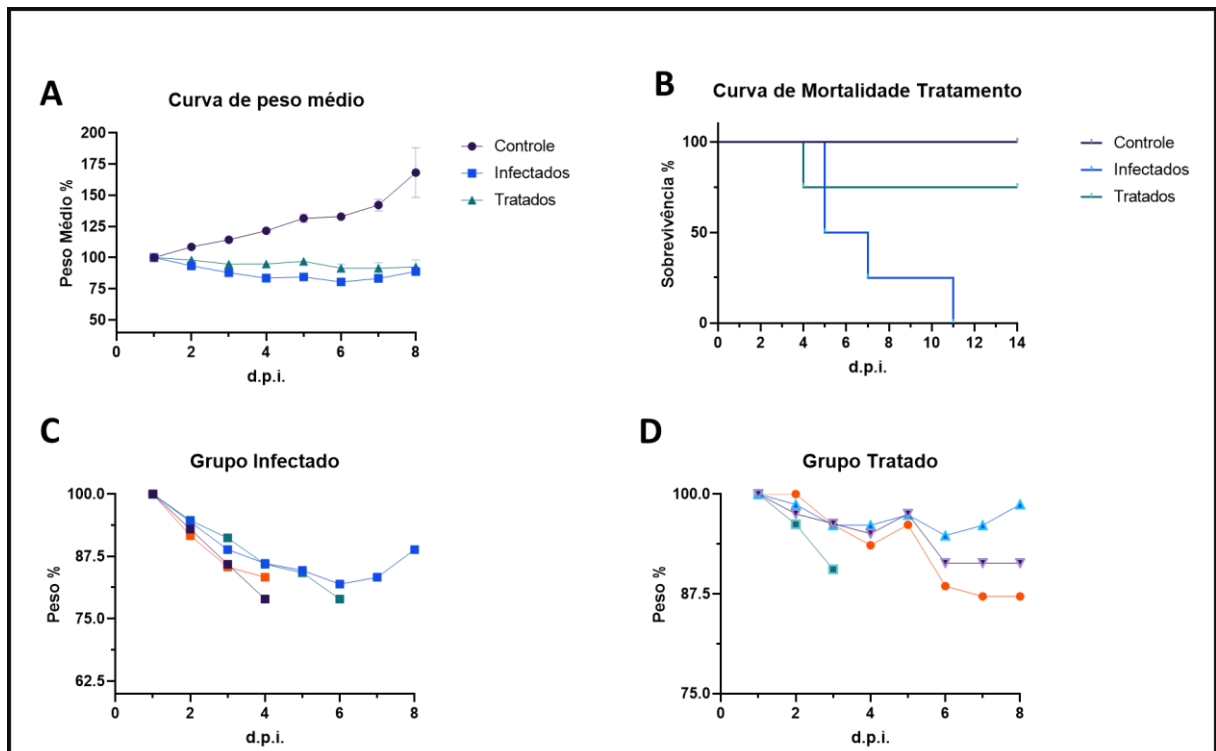


Figura 29: Variação de peso e curva de mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV e tratamento com Trametinib - grupos de 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) foram infectados com 7×10^5 PFU de MAYV e tratados com DMSO (grupo infectado) ou 2 mg/kg de Trametinib (grupo infectado/tratado). A) O peso foi medido diariamente e o valor mostrando em percentuais relativos ao primeiro dia. B) Análise da mortalidade dos animais, grupo tratado apresentou redução de 75% na mortalidade. C e D) curva mostrando o peso individual dos animais dos grupos infectado C) e infectado/tratado D). Barras representam o desvio padrão.

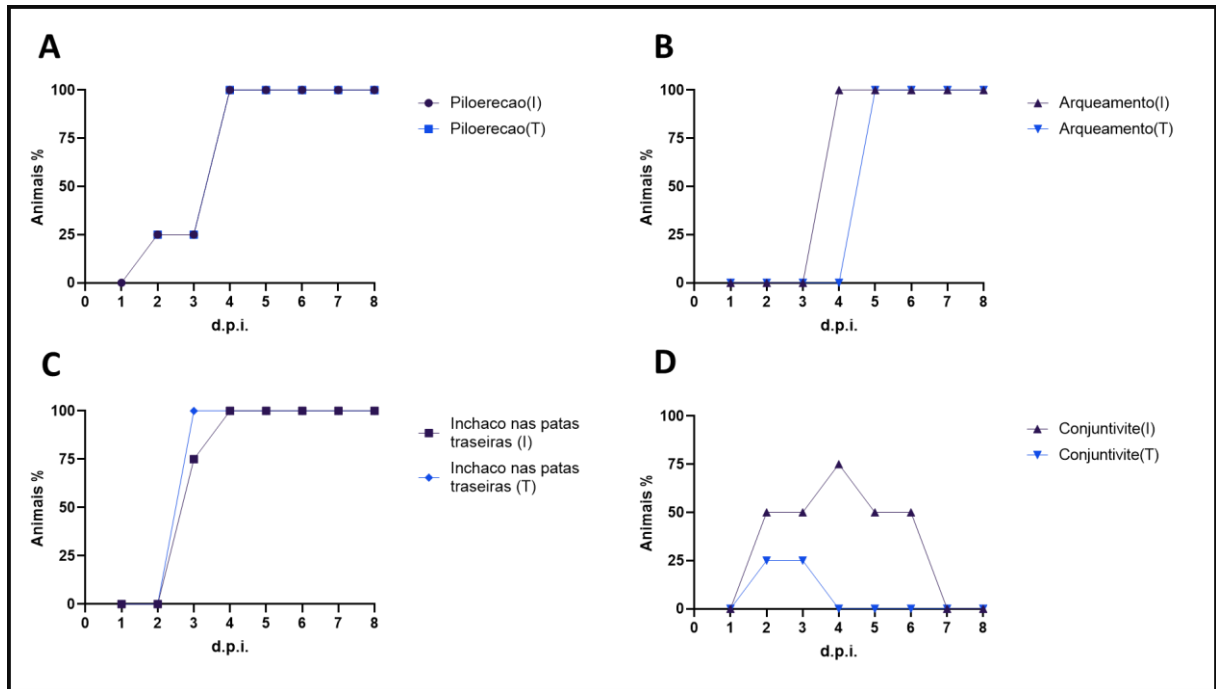


Figura 30: Observação dos sinais clínicos de camundongos C57BL/6 infectados com MAYV e tratamento com Trametinib. Grupos de 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) foram infectados com 7×10^5 PFU de MAYV e tratados com DMSO (grupo infectado) ou 2 mg/kg de Trametinib (grupo tratado). A-D) Curva mostrando surgimento de sinais de infecção. A) Piloereção B) Arqueamento C) Inchaço nas patas traseiras e D) Conjuntivite.

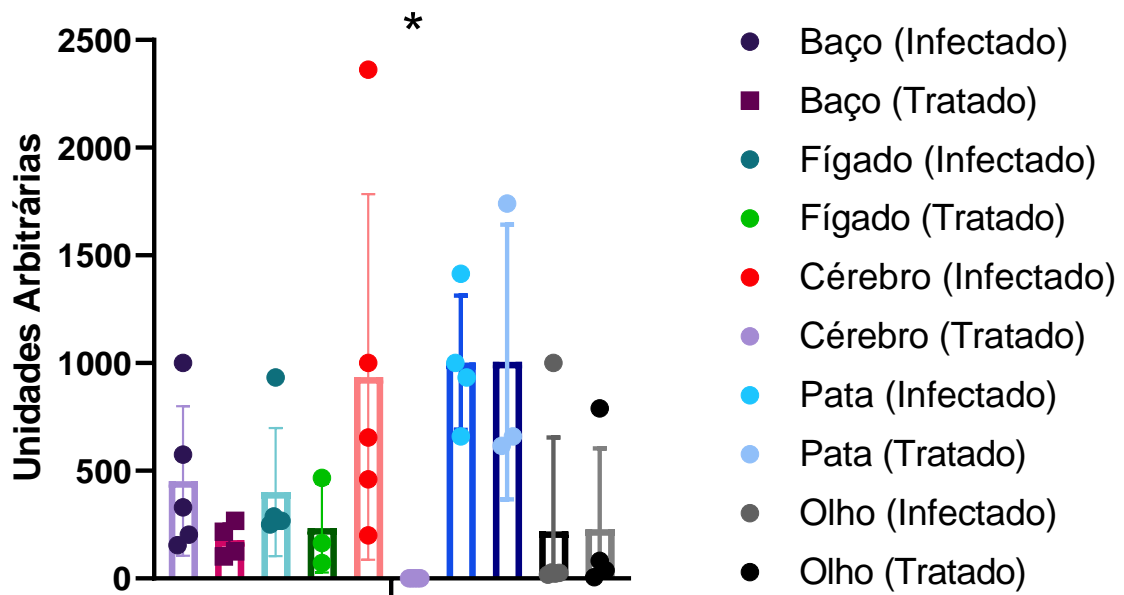


Figura 31: Análise da carga genômica dos órgãos coletados - Grupos de 4 animais (2 machos e 2 fêmeas) foram infectados com 7×10^5 PFU de MAYV e tratados com DMSO (grupo infectado) ou 2 mg/kg de Trametinib (grupo infectado/tratado). No 5 d.p.i. foram eutanasiados. Fígado, baço, cérebro, olhos, pata anterior direita foram coletados e submetidos a RT-qPCR com resultados sendo analisados pelo método de quantificação $\Delta\Delta Ct$. Baço, fígado e cérebro de animais infectados/tratados apresentaram redução de 78%, 60% e 100% respectivamente. Não foi observada diferença entre amostras da pata e do olho. Barra representa o desvio padrão. Asterisco representa grupo onde a diferença foi considerada significativa ($P < 0.05$)

VII – CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer uma linha temporal de eventos durante o ciclo de multiplicação do MAYV em alta MOI (10) incluindo: penetração, replicação do RNA, morfogênese e liberação.

- Morfogênese precoce foi observada na forma de precursores virais, 1 hora antes do surgimento de esférulas.
- A formação de CPV-II está relacionada ao aumento exponencial no número de partículas produzidas e liberadas.
- A liberação das partículas virais foi observada através dois mecanismos distintos: por brotamento individual e por exocitose de grupos de partículas no interior de formas gigantes.
- O Trametinib demonstrou atividade antiviral inibindo a multiplicação do MAYV em 90% durante infecções em células Vero, com IC₅₀ calculada de 10,17 µL. Em análises de MET, o inibidor reduziu o número de partículas contáveis em 82%.
- O Trametinib foi capaz de reduzir a mortalidade em 75% e carga genômica viral no cérebro, fígado, baço e pata traseira de camundongos C57BL/6 infectados/tratados com MAYV, quando comparado aos animais apenas infectados nas mesmas condições.
- O inibidor JNKi também demonstrou atividade antiviral inibindo a multiplicação do MAYV em 90% durante infecções em células Vero.

VIII – REFERENCIAS

ACOSTA, E. G.; BARTENSCHLAGER, R. The quest for host targets to combat dengue virus infections. **Current Opinion in Virology**, v. 20, p. 47–54, 1 out. 2016.

ACOSTA-AMPUDIA, Y. et al. **Mayaro: an emerging viral threat? Emerging Microbes and Infections** Nature Publishing Group, , 26 set. 2018.

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**, v. 111, p. 82–92, 1 nov. 2014.

ANDERSON, C. R. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1957.

ANDRADE, A. A. et al. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. **The Biochemical journal**, v. 381, n. Pt 2, p. 437–46, 15 jul. 2004.

AUGUSTE, A. J. et al. Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742–50, out. 2015.

AZEVEDO, R. S. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830–1832, nov. 2009.

BAKAR, F. A.; NG, L. F. P. **Nonstructural proteins of alphavirus—potential targets for drug development** VirusesMD.P.I. AG, , 9 fev. 2018.

BHALLA, N. et al. Host translation shutoff mediated by non-structural protein 2 is a critical factor in the antiviral state resistance of Venezuelan equine encephalitis virus. **Virology**, v. 496, p. 147–165, 1 set. 2016.

BONJARDIM, C. A. Viral exploitation of the MEK/ERK pathway – A tale of vaccinia virus and other viruses. **Virology**, v. 507, n. October 2016, p. 267–275, 2017.

BROWN, R. S.; WAN, J. J.; KIELIAN, M. **The alphavirus exit pathway: What we know and what we wish we knew** VirusesMD.P.I. AG, , 22 fev. 2018.

CALISHER, C. H. et al. Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, v. 8, n. 3, p. 243–248, 1974.

CAMINI, F. C. et al. Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus Research**, v. 236, p. 1–8, 15 maio 2017.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates , the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011.

- CARVALHO, C. A. M. et al. On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. **PeerJ**, v. 5, p. e3245, 2017.
- CAUNT, C. J. et al. **MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: The long and winding road** *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, , 24 set. 2015.
- CAUSEY, O. R.; MAROJA, O. M. Mayaro virus: a new human disease agent. III. Investigation of an epidemic of acute febrile illness on the river Guama in Pará, Brazil, and isolation of Mayaro virus as causative agent. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1017–1023, nov. 1957.
- CAVALHEIRO, M. G. et al. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: Involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 3, p. 1485–1499, 1 set. 2016.
- CEBALLOS-OLVERA, I. et al. JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. **Virology**, v. 396, n. 1, p. 30–36, 2010.
- CHEN, K. C. et al. Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. **Virology Journal**, v. 10, p. 169, 2013.
- CHEN, R. et al. ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 1 jan. 2018.
- CHEN, X. et al. Cisplatin induces autophagy to enhance hepatitis B virus replication via activation of ROS/JNK and inhibition of the Akt/mTOR pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 131, p. 225–236, 1 fev. 2019.
- DA SILVA CAETANO, C. C. et al. Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.
- DE THOISY, B. et al. Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326–1329, 1 out. 2003.
- DOCHI, T. 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.
- DUDLEY, D. T. et al. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7686–7689, 15 ago. 1995.
- ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. DA. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540–544, 1 set. 2017.

- FIGUEIREDO, C. M. et al. Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 1 out. 2019.
- FIRTH, A. E. et al. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, v. 5, 2008.
- FROLOVA, E. I. et al. Functional Sindbis Virus Replicative Complexes Are Formed at the Plasma Membrane. **Journal of Virology**, v. 84, n. 22, p. 11679–11695, 15 nov. 2010.
- FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. Alphavirus infection: Host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. **Viruses**, v. 8, n. 6, 11 jun. 2016.
- GIOVANNI DE-SIMONE, S. Mayaro Virus Disease. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v. 1, n. 3, 2014.
- 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**, v. 11, n. 6, p. 1–22, 1 jun. 2017.
- HELLSTRÖM, K. et al. Partially Uncleaved Alphavirus Replicase Forms Spherule Structures in the Presence and Absence of RNA Template. **Journal of Virology**, v. 91, n. 18, p. 787–804, 15 set. 2017.
- HIGASHI, N. et al. Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells. **Virology**, v. 33, n. 1, p. 55–69, 1967.
- JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. **A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly** *Future Microbiology*, 2009.
- JOSE, J.; TAYLOR, A. B.; KUHN, R. J. Spatial and temporal analysis of alphavirus replication and assembly in mammalian and mosquito cells. **mBio**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2017.
- JUNT, T. et al. Determination of natural versus laboratory human infection with Mayaro virus by molecular analysis. **Epidemiology and Infection**, v. 123, n. 3, p. 511–513, dez. 1999.
- KOLCH, W.; ARTICLE, R. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. **Biochem J**, v. 351 Pt 2, p. 289–305, 2000.
- KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 22, p. 3525–3544, 2008.
- KUJALA, P. et al. Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. **Journal of Virology**, v. 75, n. 8, p. 3873–3884, 15 abr. 2001.
- KUMAR, S. et al. Chikungunya virus nsP1 interacts directly with nsP2 and modulates its ATPase activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- KURAPATI, S. et al. Role of the JNK Pathway in Varicella-Zoster Virus Lytic Infection and Reactivation. **Journal of Virology**, v. 91, n. 17, 1 set. 2017.

- LA LINN, M. et al. Arbovirus of Marine Mammals: a New Alphavirus Isolated from the Elephant Seal Louse, *Lepidophthirus macrorhini*. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4103–4109, 1 maio 2001.
- LAI, J. H.; LIN, Y. L.; HSIEH, S. L. Pharmacological intervention for dengue virus infection. **Biochemical Pharmacology**, v. 129, n. January, p. 14–25, 1 abr. 2017.
- LAVERGNE, A. et al. Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus Research**, v. 117, n. 2, p. 283–290, 1 maio 2006.
- LIM, S. P. et al. Ten years of dengue drug discovery: Progress and prospects. **Antiviral Research**, v. 100, n. 2, p. 500–519, 2013.
- LINTHICUM, K. J. et al. Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus Infection in and Transmission by the Tick *Amblyomma cajennense* (Arachnida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 28, n. 3, p. 405–409, 1 maio 1991.
- LIU, X. et al. Decreased virulence of ross river virus harboring a mutation in the first cleavage site of nonstructural polyprotein is caused by a novel mechanism leading to increased production of interferon-inducing RNAs. **mBio**, v. 9, n. 4, 1 jul. 2018.
- LLAGONNE-BARETS, M. et al. A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. **Journal of Clinical Virology**, v. 77, p. 66–68, 1 abr. 2016.
- LONG, K. C. et al. Experimental transmission of Mayaro virus by *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750–757, 1 out. 2011.
- MARSH, M.; BOLZAU, E.; HELENIUS, A. Penetration of semliki forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. **Cell**, v. 32, n. 3, p. 931–940, 1 mar. 1983.
- MENDES, A.; KUHN, R. J. **Alphavirus nucleocapsid packaging and assembly** VirusesMD.P.I. AG, 20 mar. 2018.
- MOTA, M. T. DE O. et al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, 8 set. 2015.
- NASAR, F. et al. Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 36, p. 14622–14627, 4 set. 2012.
- NAVARRETE-ESPINOSA, J.; GÓMEZ-DANTÉS, H. Arbovirus causing hemorrhagic fever at IMSS. **Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 44, n. 4, p. 347–353, 2006.
- NAVECA, F. G. et al. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and oropouche-like viruses. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 7, p. 510–513, 1 jul. 2017.
- NAYAK, T. K. et al. P38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases Interact with Chikungunya Virus Non-structural Protein-2 and Regulate TNF Induction during Viral Infection in Macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. APR, 2019.

NEUMAYR, A. et al. **Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, Northern Peru** *Emerging Infectious Diseases*, abr. 2012.

OLIVEIRA, L. C. et al. The small molecule AZD6244 inhibits dengue virus replication in vitro and protects against lethal challenge in a mouse model. *Archives of Virology*, p. 1–11, 2020.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Epidemiological Update Dengue Situation summary in the Americas**. [s.l.: s.n.].

PEREIRA, A. C. T. C. et al. SP600125 inhibits Orthopoxviruses replication in a JNK1/2 - independent manner: Implication as a potential antipoxviral. *Antiviral Research*, v. 93, n. 1, p. 69–77, jan. 2012.

PIETILÄ, M. K.; HELLSTRÖM, K.; AHOLA, T. Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Research*, v. 234, p. 44–57, 15 abr. 2017.

PINHEIRO, F. P. et al. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and virological findings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 30, n. 3, p. 674–681, 1981.

PLESCHKA, S. RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biological Chemistry*, v. 389, n. 10, p. 1273–1282, 2008.

RAMSEY, J.; MUKHOPADHYAY, S. **Disentangling the frames, the state of research on the alphavirus 6K and TF proteins** *Viruses* MD.P.I. AG, , 18 fev. 2017.

REIS, E. V. S. et al. In-depth characterization of the chikungunya virus replication cycle. *Journal of Virology*, 17 nov. 2021.

ROBINSON, D. M. et al. Inactivated Mayaro vaccine produced in human diploid cell cultures. *Military medicine*, v. 141, n. 3, p. 163–6, mar. 1976.

ROMAN-SOSA, G.; KIELIAN, M. The Interaction of Alphavirus E1 Protein with Exogenous Domain III Defines Stages in Virus-Membrane Fusion. *Journal of Virology*, v. 85, n. 23, p. 12271–12279, 1 dez. 2011.

RUPP, J. C. et al. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 1 set. 2015.

SANTIAGO, F. W. et al. Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 10, p. e0004104, 23 out. 2015.

SANTOS, F. M. et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 13, n. 5, p. e0007375, 1 maio 2019.

SATO, Y. et al. Hepatitis C virus core protein promotes proliferation of human hepatoma cells through enhancement of transforming growth factor expression via activation of nuclear factor- κ B. *Gut*, v. 55, n. 12, p. 1801–1808, 1 dez. 2006.

SCHRÄDER, T. et al. The clinically approved MEK inhibitor Trametinib efficiently blocks influenza A virus propagation and cytokine expression. **Antiviral Research**, v. 157, p. 80–92, 1 set. 2018.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. **Biology and pathogenesis of chikungunya virus** *Nature Reviews Microbiology*, jun. 2010.

SEYMOUR, R. L. et al. A rodent model of chikungunya virus infection in RAG1 ^{-/-} mice, with features of persistence, for vaccine safety evaluation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, 26 jun. 2015.

SHARMA, R. et al. Structure-function insights into chikungunya virus capsid protein: Small molecules targeting capsid hydrophobic pocket. **Virology**, v. 515, p. 223–234, 1 fev. 2018.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. **Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies** *Journal of Clinical Investigation* American Society for Clinical Investigation, , 1 mar. 2017.

SMITH, G. C.; FRANCY, D. B. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 7, n. 1, p. 89–93, mar. 1991.

SNYDER, A. J.; MUKHOPADHYAY, S. The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. **Journal of Virology**, v. 86, n. 24, p. 13609–13620, 15 dez. 2012.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, jun. 2007.

SREEKANTH, G. P. et al. JNK1/2 inhibitor reduces dengue virus-induced liver injury. **Antiviral Research**, v. 141, p. 7–18, 2017.

SRIHONGSE, S.; STACY, H. G.; GAULD, J. R. A Survey to Assess Potential Human Disease Hazards Along Proposed Sea Level Canal Routes in Panamá and Colombia. IV. Arbovirus Surveillance in Man. **Military Medicine**, v. 138, n. 7, p. 422–426, 1 jul. 1973.

TAUBITZ, W. et al. Chikungunya Fever in Travelers: Clinical Presentation and Course. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. e1–e4, 1 jul. 2007.

TESH, R. B. et al. Mayaro Virus Disease: An Emerging Mosquito-Borne Zoonosis in Tropical South America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 1, p. 67–73, jan. 1999.

THEILACKER, C. et al. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 369, 8 dez. 2013.

TUCKER, P. C.; GRIFFIN, D. E. Mechanism of altered Sindbis virus neurovirulence associated with a single-amino-acid change in the E2 Glycoprotein. **Journal of virology**, v. 65, n. 3, p. 1551–7, mar. 1991.

UCHIME, O.; FIELDS, W.; KIELIAN, M. The Role of E3 in pH Protection during Alphavirus Assembly and Exit. **Journal of Virology**, v. 87, n. 18, p. 10255–10262, 15 set. 2013.

VALENCIA, H. J. et al. Evaluation of kinase inhibitors as potential therapeutics for flavivirus infections. **Archives of Virology**, v. 166, n. 5, p. 1, 1 maio 2021.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. et al. **Early events in chikungunya virus infection—from virus cell binding to membrane fusion** *Viruses* MD.P.I. AG, , 7 jul. 2015.

VARGHESE, F. S. et al. The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. **Journal of virology**, v. 90, n. 21, p. 9743–9757, 1 nov. 2016.

WANG, K. S. et al. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. **Journal of Virology**, v. 66, n. 8, p. 4992–5001, 1992.

WEGER-LUCARELLI, J. et al. Dissecting the Role of E2 Protein Domains in Alphavirus Pathogenicity. **Journal of Virology**, v. 90, n. 5, p. 2418–2433, 1 mar. 2016.

WEISE, W. J. et al. A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 7 ago. 2014.

WENGLER, G. et al. **Entry of alphaviruses at the plasma membrane converts the viral surface proteins into an ionpermeable pore that can be detected by electrophysiological analyses of whole-cell membrane currents** *Journal of General Virology*, 1 jan. 2003.

WRIGHT, C. J. M.; MCCORMACK, P. L. Trametinib: first global approval. **Drugs**, v. 73, n. 11, p. 1245–1254, jul. 2013.

YANG, S. H.; SHARROCKS, A. D.; WHITMARSH, A. J. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. **Gene**, v. 513, n. 1, p. 1–13, 2013.

ZAMPIERI, C. A. et al. The ERK mitogen-activated protein kinase pathway contributes to Ebola virus glycoprotein-induced cytotoxicity. **Journal of virology**, v. 81, n. 3, p. 1230–40, 1 fev. 2007.

ZEKE, A. et al. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 793–835, set. 2016.

IX – PRODUÇÃO CIENTÍFICA E OUTRAS ATIVIDADES

- Co-autoria no artigo: “*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*” publicado no periódico: *Science of the Total Environment*
- Co-autoria no artigo: “*Evaluation of kinase inhibitors as potential therapeutics for flavivirus infections*” publicado no periódico: *Archives of Virology*
- Co-autoria no artigo: “*In-depth characterization of the chikungunya virus replication cycle*” a ser publicado no periódico: *Journal of Virology*
- Primeira autoria no artigo: “*A Temporal Analysis of the MAYV Replication Cycle*” submetido e aguardando resposta no periódico: *Archives of Virology* (Anexo I)
- Financiamento completo para participar do curso: “*A multidisciplinary approach to the challenge of arboviral diseases in America*” em Cuernavaca, México.
- Trabalho autônomo na empresa Simile Medicina Diagnóstica auxiliando no diagnóstico de pacientes com suspeita de COVID-19.
- Trabalho de extensão auxiliando no diagnóstico de pacientes com suspeita de COVID-19 em uma parceria da Universidade Federal de Minas Gerais com a Secretária de Saúde de Minas Gerais.

Anexo I – Artigo submetido**A STUDY OF THE MAYV REPLICATION CYCLE: CORRELATION BETWEEN THE KINETICS OF VIRAL MULTIPLICATION AND VIRAL MORPHOGENESIS,**

Diogo C. Mendonça,^{a,#} Erik V. S. Reis,^a Nídia E. C. Arias,^a Hugo J. Valencia^{a,b} Cláudio A. Bonjardim^a

^aGrupo de Transdução de Sinal, Laboratório de Vírus, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais., 31270-901 -- Avenida Antonio Carlos, 6627 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

#Author for correspondence: Address correspondence to Diogo C Mendonca:diogomendonca@gmail.com

Diogo C. Mendonça: diogomendonca128@gmail.com

Erik V. S. Reis: reis.erik@gmail.com

Nídia E. C. Arias: nidiaestherarias@gmail.com

Hugo J. Valencia hugo.valencia@untrm.edu.pe

Cláudio A. Bonjardim: cbonjardim29@gmail.com

ABSTRACT

Mayaro virus (MAYV) is mainly found in Central and South America, causing a febrile illness followed by debilitating arthritis and arthralgia similar to that caused by chikungunya virus (CHIKV), leading to sequelae that have a direct impact on a patient's productive capacity for a long period of time, resulting in economic losses. Mayaro fever is considered a neglected disease due to the limited epidemiological data, and in Brazil, it is considered a potential public health risk, with the number of cases increasing every year. Most of our knowledge about MAYV biology is inferred from data obtained from other alphaviruses, and only recently studies carried out with MAYV are becoming available. In this study, we analyzed kinetics of viral replication through standard growth curves, quantification of intracellular and extracellular particles, and RNA quantification and compared with data obtained through transmission electron microscopy at different stages of infection. This approach allowed us to establish a chronological order of events during MAYV replication and its respective timepoints, including: cell entry through clathrin-mediated endocytosis occurring at 15-30 minutes, genome replication, at 2-3 hours, morphogenesis at 4hpi and release at 4-6hpi. We also present evidence of uncharacterized events such as ribosome reorganization, clusters of early viral precursors and release through exocytosis in giant forms. Our work sheds specific new light on the MAYV replication cycle, which may contribute to the rational design of antiviral drugs.

1 INTRODUCTION

The first report of Mayaro virus (MAYV) occurred in 1954 in Trinidad and Tobago, where the virus was isolated from blood samples of rural workers in Mayaro County (Anderson et al., 1957). MAYV 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) (Koonin

et al., 2020). MAYV is classified under three genotypes: D (widely dispersed), L (limited) and N (new) with different geographic distributions (Auguste et al., 2015). The virus is transmitted mainly by the mosquito *Haemagogus janthinomys* that circulates predominantly in Central and South America (Danillo Lucas Alves and Benedito Antonio Lopes da, 2018).

The alphavirus replication cycle starts with entry into the host cell through clathrin-mediated endocytosis. Inside the endosomes, the low pH leads to the uncoating and liberation of the viral genomic RNA in the cell, which is translated into nonstructural proteins that assemble a replication complex inside vesicular structures, called spherules. In later stages of the cycle, these spherules are internalized inside large vacuoles called cytopathic vacuole I (CPV-I). After translation of structural proteins, precursor viral particles assemble with the host membrane a secondary structure called cytopathic vacuole II (CPV-II). Virions migrate to the cell membrane and are released through budding, gaining their envelope during the process (Brown et al., 2018; Jose et al., 2009; Silva and Dermody, 2017).

Despite the knowledge about the alphavirus replication cycle, specific studies with MAYV are rare, and almost all of its cycle stages are speculated based on other alphavirus species, such as Sindbis virus (SINV) and Chikungunya virus (CHIKV). The first ultrastructural studies of the MAYV replication cycle with transmission electron microscopy (TEM) were done in C6/36 and BHK-21 cells more than 30 years ago (Mezencio et al., 1990, 1989). More recently, Carvalho et al. (2017) showed that clathrin-mediated endocytosis is the main way of entry of the virus, and that it is dependent on cholesterol-enriched caveolae-derived vesicles (Carvalho et al., 2017) and Ribeiro-Filho et al. (2021) described the structure of mature MAYV particles obtained by cryo- electron microscopy (cryo-EM) (Ribeiro-Filho et al., 2021).

In our study our main goal was to characterize the MAYV replication cycle in Vero cells through a temporal approach establishing timepoints of the main events involved in the cycle. To do that, we, firstly determined the length of the cycle through plaque assays and, based on

that, analyzed electron microscopy images of infected cells in different time points followed by comparison with data obtained from quantification of gRNA, intracellular and extracellular particles. We were able to determine a timeline of observed events, correlating these with our kinetic data, including : increase of gRNA replication related to ribosome reorganization at 3 hpi, CPV-II formation related to exponential increase of immature particles at 5hpi and virus release through budding and exocytosis. observed at 5 and 6hpi.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Cell culture and virus

Vero cells (ATCC CCL-81) were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) (Cultilab, São Paulo, Brazil) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (200 U/mL penicillin and 40 µg/mL streptomycin) and antifungals (2 µg/mL amphotericin B) and incubated in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C. The virus used in this work was MAYV, genotype D isolate BeAr20290, isolated in 1960 from a pool of *Haemagogus spp.* The virus was kindly provided by Dr. Mauricio Lacerda Nogueira from the Faculty of Medicine of São José do Rio Preto (FAMERP, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil) and Dr. Cintia Lopes de Brito Magalhães from the Federal University of Ouro Preto (UFOP, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil).

2.2 Virus titration

In 24-well plates, 1.5×10^5 Vero cells/well were seeded one day prior to MAYV infection. Viral samples were serially diluted 10-fold in MEM with 1% FBS and used to infect the cells. After that, 3 mL of semisolid 199 medium (Cultilab, São Paulo, Brazil) with 1% carboxymethylcellulose (CMC), 2% FBS, antibiotics (200 U/mL penicillin and 40 µg/mL streptomycin) and antifungals (2 µg/mL amphotericin B) was added to each well. Plates were

incubated at 37 °C for 2 days and then fixed overnight with 3.7% formaldehyde. Finally, the cells were washed with running water and stained with 1% crystal violet for 15 minutes. Visible plaque-forming units (PFU) were counted, and viral titers were determined (PFU/mL).

2.3 Virus growth curve kinetics

To generate growth curves, Vero cells were seeded in 24-well plates (approximately 1×10^5 cells per well) 24 hours prior to the infection. Cells were infected with MAYV at multiplicities of infection (MOI) of 10, 1 and 0.1 and incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 1 hour, for virus adsorption. The supernatant was then removed and it was added 1 mL of MEM supplemented with 1% FBS. At specific times, the supernatants were collected and titrated.

To perform kinetic assays, Vero cells were infected under the same conditions as described above, at an MOI of 10. To identify the beginning of virus release the supernatants were analyzed through plaque assays. For the beginning of virus morphogenesis and RNA replication, the supernatants were discarded, and the cell monolayer was washed with 1X PBS three times. After that, 300 µL of MEM was added to each cell monolayer and subsequently frozen and thawed three times, scraped, and collected in 1.5 mL microtubes and then centrifuged at 960 g for 5 minutes at 4°C. The supernatants were titrated for morphogenesis analysis or submitted to RNA extraction and RT-qPCR for RNA analysis.

2.4 RNA extraction and RT-qPCR

Total RNA was extracted from the cell monolayer using TRIzol reagent (Life Technologies). For each well, 1 mL of TRIzol was added, and after the rupture of the monolayer, the samples were transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube. The remainder of the protocol was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 120 µL of chloroform was added to each sample, and after 10 minutes of incubating, the sample was centrifuged (12,000 g – 15 minutes – 4°C). Then, the aqueous phase was transferred to another

1.5 mL microcentrifuge tube, and 500 μ L of isopropanol was added. After 10 minutes, the solution was centrifuged (12,000 g – 10 minutes – 4°C), the flow-through was discarded, the RNA resuspended at 1 mL of ethanol 75%, centrifuged (12000 g – 5 minutes – 4 °C), the flow-through was discarded and the RNA was resuspended in 30 μ L of Nuclease-free water.

The RNA samples were submitted to a RT–qPCR protocol, using the Go-Taq 1-step RT-qPCR (Promega) reagent with primers targeting the nsP1 gene of MAYV genome: Forward 5' CACGGACMTTTTGCCTTCA 3'; Reverse 5' AGACTGCCACCTCTGCTKGAG 3'; and Probe 5'(VIC) ACAGATCAGACATGCAGG 3' (NAVECA et al., 2017). The reactions were performed using 500 nM of each primer and 200 nM of probe, 5 μ L of Go-Taq master mix, reverse transcriptase (0.2 μ L), and 3 μ L of RNA samples all in a final volume of 10 μ L. The amplification cycle was as follows: 1 cycle of 15 minutes at 45 °C, 1 cycle of 2 minutes at 95 °C and 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C.

2.5 Transmission electron microscopy

For TEM, Vero cells were infected as described in the previous section at an MOI of 10 and fixed each hour until 6 hours post-infection, with 2.5% glutaraldehyde in a 0.1 M sodium phosphate buffer for 2 hours at room temperature. Cells were postfixed with 2% osmium tetroxide and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were then analyzed under TEM (Spirit Biotwin FEI, 120 kV) at the Centre of Microscopy of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil.

2.6 Statistical analysis

Results from the kinetics experiment were analyzed with the GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). It was also used to plot the graphs and calculation of averages and standard deviation.

3 RESULTS

3.1 MAYARO VIRUS GROWTH CURVE KINETICS AND RNA SYNTHESIS

Our first step to better understand MAYV replication was to analyze the virus growth kinetics. To do so, we infected Vero cells at MOIs of 10, 1 or 0.1 and then determined the virus titer by plaque assay (Fig.1a). The replication patterns for all analyzed conditions were similar: a fast cycle with an eclipse phase at approximately 4 hpi, followed by an exponential increase in the number of particles that reached a plateau (stationary phase). The main differences were observed for the time required for the curve to reach the plateau, which occurred at 7 hpi for MOI 10 and 15 hpi for MOI 1, as well as the maximum virus yield that was 4.91×10^7 and 3.85×10^8 , respectively. For MOI 0.1, at 24 hpi the curve did not seem to have reached the plateau, so we analyzed 1 additional timepoint to confirm that, at 30 hpi. However, the virus titer was of 2.98×10^8 , very close to the value from 24 hpi (4.3×10^8) indicating that in fact the curve have reached the plateau after 24 hpi.

Next, we investigated when 1) viral RNA synthesis, 2) the production of infectious particles and 3) the liberation of virus particles in the supernatant started. Thus, Vero cells were infected with MAYV at an MOI of 10, and then the cell monolayer and the supernatant were collected to determine viral infectivity (plaque assay) and RNA synthesis (RT-qPCR). Our data shows that the measurement of RNA decreased up to 2 hpi when its synthesis started, and its amount increased up to 82 times at 4 hpi when it reached a stationary phase (Fig.1b). The determination of virus infectivity on the cell monolayer showed that the infectivity was also reduced up to 3 hpi, when morphogenesis/maturation began, increasing thereafter up to 1,600 times at 7 hpi (Fig.1c). The liberation of particles in the supernatant was verified at approximately 4 hpi and increased 1100 times at 7 hpi (Fig.1d).

3.2 MAYARO VIRUS PENETRATION OCCURS UNTIL 1 HPI

To expand our knowledge concerning the MAYV replication cycle, we undertook a more detailed analysis of the MAYV replication cycle based on TEM. To that end, Vero cells were infected with MAYV at an MOI of 10, and images were collected 15 minutes post-infection (mpi), 30 mpi, and 1 to 6 hpi in intervals of 1 hour.

Our data show that the virus started to approach the cell by 15 mpi (Fig.2a), followed by cell entry through membrane invagination, forming an endocytic vesicle surrounded by clathrin proteins (Fig.2b). By 30 mpi, the virus was observed inside an endosome (Fig.2c-d), which was followed by the uncoating of the particle through the fusion of the virus membrane with the endosome membrane (Fig.2e). Finally, at 1 hpi, the virus entry process was finished, and only uncoated virus was found inside the cell. (Fig.2f).

3.3 MAYARO VIRUS RIBOSOME REORGANIZATION AT 3HPI

During the alphavirus replication cycle, after the uncoating of the virus leading to nucleocapsid disassembly, the genomic RNA (gRNA) is directly translated to produce the nonstructural proteins (nsPs) nsP1-4, which will assemble a replication complex responsible for gRNA production (Brown et al., 2018). According with our qPCR data genomic replication started at hpi and increased exponentially at 3hpi. When we observed our infected cell at this timepoint, we observed a high amount of ribosomes (small dense spherical particles, 18–22 nm in size) distributed in the cytoplasm. These ribosomes were sometimes organized in a circular or semicircular pattern near large electron-dense structures that seemed to result from protein accumulation (Fig.3a). We also observed ribosomes surrounding large vacuole-like structures, always as a single layer (Fig.3b-c). Curiously, we sometimes found dense disorganized clusters of spherical particles larger than ribosomes and very similar to nucleocapsids that later appeared in the MAYV replication cycle (Fig.3d). These particles were observed at different sizes, which may suggest different stages of development of this same particles, however further studies are necessary to understand and characterize this structure (Fig.3e).

3.4 MAYARO VIRUS-INDUCED SPHERULE FORMATION AT 4HPI

RNA replication of alphavirus occurs inside vesicle compartments formed by nsPs directly translated from gRNA, denominated spherules (Hellström et al., 2017). As previously mentioned, this ribosome reorganization directly correlated with the increase of RNA observed by qPCR at 3hpi, and at 4hpi, when the replication seems to be reached a plateau stage we could not find these clusters of ribosomes anymore instead we started to observe a high number of spherules. These structures were observed both isolated and in groups, near and, in many cases anchored to, the cell membrane through a narrow neck (Fig.4a-c). The size of the spherules was variable (50–100 nm) with circular and elliptic shapes. We also observed small groups of sphere-like structures inside the cytoplasm (Fig.4d-e), usually near the endoplasmic reticulum (ER).

3.5 CPV-II FORMATION AT 5HPI AND ITS CORRELATION WITH MAYARO VIRUS MORPHOGENESIS

The CPV-II of the alphavirus is a virus-induced structure derived from a trans-Golgi network containing E1/E2 glycoproteins with nucleocapsids (NCs) attached to its cytoplasmic side (Jose et al., 2017). Here, we confirmed the formation of CPV-II in Vero cells infected with MAYV at an MOI of 10 starting at 5 hpi, soon after the appearance of the first spherules. CPV-II was formed in the cytoplasm, isolated and of different shapes and sizes, including half-moons (Fig.5a), curved and straight rods (Fig.5b-c) and circular shapes (Fig.5d-e). These structures are usually surrounded on a single layer by a variable number of NCs, similar to those previously described for CHIKV (Higashi et al., 1967; Reis et al., 2021). The timeline of these events was directly correlated with an exponential increase in the number of viruses collected from the cell monolayer, which is in line with our results from the kinetic assays (Fig.1c).

3.6 MAYARO VIRUS RELEASE

The classical Alphavirus way of particle release is through budding from the plasma membrane. Here, we show that the budding of MAYV particles started at 4 hpi, although less frequently observed. While in Fig.6a, the particle on the left is still in the process of releasing and acquiring its envelope, the particle on the right is a newly released particle. After 5 hpi, we frequently found particles near the border of the inner cell membrane (Fig.6b), and a higher number of particles were already released from the cells (Fig.6c). It is worth noting that in addition to classical budding, at 5 hpi we also observed the formation of large vesicles derived from the cell membrane, which contained various particles. This structure was observed still attached to the cell (Fig.6d) with particles near its limiting membrane and budding. At 6 hpi, we observed another of these giant structures, localized outside the cell and densely packed with virus particles (Fig.6e). The timeline of these events was directly correlated with an exponential increase in the number of viruses collected from the cell monolayer, which is in line with our results from the kinetic assays (Fig.1c).

4 DISCUSSION

There are few studies concerning MAYV biology, especially regarding its replication cycle on mammalian cells (8–10). To fill a few gaps during this process, a temporal analysis of the first replication cycle of MAYV infection of Vero cells, which occurred at approximately 6–7 hpi, was performed. To that end, we carried out two procedures: (i) a kinetic analysis was used to determine genome replication by RT-qPCR and viral titration by plaque assay, and (ii) TEM was used to better characterize the steps of its replication cycle.

Based on these procedures, our study established a timeline of events of the MAYV replication cycle that correlated well with both our kinetic assays and ultrastructural analyses and what was partially described in the literature. Check Fig.7 for a summary of this temporal replication cycle description.

As verified with other alphaviruses (Göertz et al., 2017; Liu et al., 2018), MAYV presented a fast cycle, with a short eclipse phase up to 4 hpi, followed by exponential growth until it stabilized, reaching a plateau (Figure 1a).

MAYV entry occurs via the endocytic pathway, i.e., clathrin-mediated endocytosis as described for other alphaviruses (Marsh et al., 1983; Sourisseau et al., 2007) and via cholesterol-enriched caveolae-derived vesicles (Carvalho et al., 2017). Our micrographs showed that entry through endocytosis occurred between 15 and 30 mpi (Fig.7a) which includes the virus adsorption to the cell, penetration, and transport inside vesicles at 1 hpi (Fig.7b). It is interesting to note that the entry process is highly efficient (MOI 10); the event took place at high speed and was finalized within 30 mpi, followed by an eclipse phase (Fig.1a) that included the uncoating process at 2 hpi (Fig.7c). In fact, Carvalho et al., (2017), found similar timepoints of entry using fluorescence experiments, with most particles inside the cells at 20–30 mpi (Carvalho et al., 2017).

At approximately 3 hpi (Fig.7d), we observed ribosomes organized in a circular shape around a vacuole-like structure (Fig.3). We speculate that these structures localize where the translation of nonstructural proteins occurs preceding the spherule formation associated with the replication of viral RNA. In fact, at 4 hpi spherules can be found in every cell, as previously described for other alphaviruses (Brown et al., 2018; Higashi et al., 1967) (Fig.4). The spherules were anchored to the outer part of the cell membrane through a narrow neck where the replication complex is located and where the RNA double-stranded intermediary is able to evade degradation and recognition by pattern recognition receptors (Silva and Dermody, 2017). As the cycle progresses, spherules are internalized in large vacuoles, forming CPV-1. Of note, at this stage of infection, we also observed many groups of internalized spherules (Fig.4d-e) but did not find CPV-I structures.

Regarding morphogenesis, we first observed the formation of structures similar to viral precursors at 3 hpi (Fig.7e) in densely packed groups (Fig.3d-e), which is surprisingly early since at this time, we had still not observed the preceding events such as the formation of spherules. However, later, at 4 hpi, when we also observe spherules (Fig.7f), we did observe some actual particles including some that were already budding, albeit scarce. Finally, according to our kinetic data, from 3 to 4 hpi (Fig.1c), we observed the first increase in the number of particles on the cell monolayer. Altogether, these data suggest that these structures are indeed related to morphogenesis and may be related to an early yet uncharacterized step in the viral replication cycle.

Soon after the formation of spherules, at 5 hpi (Fig.7g), we started to observe the formation of CPV-II (Fig.5). These structures are induced by alphavirus infection and contain viral glycoproteins in their vesicles, are surrounded by nucleocapsids (Silva and Dermody, 2017) and can be found in both vertebrate and invertebrate cells. We observed different forms of CPV-II as previously described for other alphaviruses (Chen et al., 2013; Higashi et al., 1967; Reis

et al., 2021). Previous studies with CHIKV described the appearance of CPV-II at the late stage of the replication cycle occurring only after 24 hpi in invertebrate cells (Chen et al., 2013). However, in our previous study with CHIKV (Reis et al., 2021) and the present study, both carried out with vertebrate cells, we observed its appearance at early stages of the replication cycle. It appears that these differences may reflect the mechanisms of adaptation of the alphavirus to its different hosts.

The classical mechanism of alphavirus particle release is through budding, which we were able to observe as early as 4 hpi and was more frequent after 6 hpi (Fig.7h-i). Rarely, we observed giant forms, structures derived from the plasma membrane containing immature particles. These giant forms were found either still attached to the cell or already released (Fig.6d-e) and are an alternative method of viral release by exocytosis. These structures were described for some alphaviruses, in particular CHIKV, which originates from mature CPV-II and is associated with the rapid release of a large number of viral particles in later stages of infection (Chen et al., 2013).

5 CONCLUSIONS

As mentioned previously, current knowledge about MAYV biology is scarce and in many cases is inferred from other members of the Alphavirus genus, in this work we characterize the replication cycle of MAYV specifically, from entry to release in a chronological order and assigned timepoints for different phases, including penetration, RNA replication, morphogenesis and liberation, as well as events related to uncoating, particle formation, budding and exocytosis. These timepoints observed through TEM correlates with data obtained

from our kinetic studies, with genome replication starting at 2-3hpi, morphogenesis between 3-4hpi and release 4-6hpi. We also observe some undescribed events of MAYV replication including ribosome reorganization, early morphogenesis preceding spherule formation, absence of CPV-I and release through giant forms. We expect that this study expands our current knowledge concerning MAYV replication while shedding more light on viral biology and unraveling potential targets for the rational design of antiviral drugs.

Acknowledgments

We thank Dr. Maurício Lacerda Nogueira from Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP, Brazil, and Dr Cintia Lopes de Brito Magalhães from Universidade Federal de Ouro Preto, MG, Brasil for kindly providing the MAYV BeAr20290 strain.

References

- Anderson, C.R., Downs, W.G., Wattley, G.H., AHIN, N.W., Reese, A.A., 1957. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 6, 1012–1016. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1957.6.1012>
- Auguste, A.J., Liria, J., Forrester, N.L., Giambalvo, D., Moncada, M., Long, K.C., Morón, D., de Manzione, N., Tesh, R.B., Halsey, E.S., Kochel, T.J., Hernandez, R., Navarro, J.-C., Weaver, S.C., 2015. Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1742–50. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141660>
- Brown, R.S., Wan, J.J., Kielian, M., 2018. The alphavirus exit pathway: What we know and what we wish we knew. *Viruses* 10. <https://doi.org/10.3390/v10020089>
- Carvalho, C.A.M., Silva, J.L., Oliveira, A.C., Gomes, A.M.O., 2017. On the entry of an emerging arbovirus into host cells: Mayaro virus takes the highway to the cytoplasm through fusion with early endosomes and caveolae-derived vesicles. *PeerJ* 5, e3245. <https://doi.org/10.7717/peerj.3245>
- Chen, K.C., Kam, Y.-W., Lin, R.T.P., Ng, M.M.-L., Ng, L.F., Chu, J.J.H., 2013. Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. *Virology* 453, 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.05.011>
- Danillo Lucas Alves, E., Benedito Antonio Lopes da, F., 2018. Characterization of the immune response following in vitro mayaro and chikungunya viruses (Alphavirus, *Togaviridae*) infection of mononuclear cells. *Virus Res.* 256, 166–173. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2018.08.011>
- Göertz, G.P., Vogels, C.B.F.F., Geertsema, C., Koenraadt, C.J.M.M., Pijlman, G.P., 2017. Mosquito co-infection with Zika and chikungunya virus allows simultaneous transmission without affecting vector competence of *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005654>

- 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, 787–804. <https://doi.org/10.1128/JVI.00787-17>
- 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* 33, 55–69. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90093-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90093-1)
- Jose, J., Snyder, J.E., Kuhn, R., 2009. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol.* 4, 837–856. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.59>
- Jose, J., Taylor, A.B., Kuhn, R.J., 2017. Spatial and temporal analysis of alphavirus replication and assembly in mammalian and mosquito cells. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.02294-16>
- Koonin, E.V., Dolja, V.V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y.I., Yutin, N., Zerbini, F.M., Kuhn, J.H., 2020. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 84. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00061-19>
- Liu, X., Mutso, M., Utt, A., Lepland, A., Herrero, L.J., Taylor, A., Bettadapura, J., Rudd, P.A., Merits, A., Mahalingam, S., 2018. Decreased virulence of ross river virus harboring a mutation in the first cleavage site of nonstructural polyprotein is caused by a novel mechanism leading to increased production of interferon-inducing RNAs. *mBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.00044-18>
- Marsh, M., Bolzau, E., Helenius, A., 1983. Penetration of semliki forest virus from acidic prelysosomal vacuoles. *Cell* 32, 931–940. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90078-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90078-8)
- Mezencio, J.M., de Souza, W., Fonseca, M.E., Rebello, M.A., 1990. Ultrastructural study of Mayaro virus replication in BHK-21 cells. *Arch. Virol.* 114, 229–235. <https://doi.org/10.1007/BF01310751>
- Mezencio, J.M., de Souza, W., Fonseca, M.E., Rebello, M.A., 1989. Replication of Mayaro virus in *Aedes albopictus* cells: an electron microscopic study. *Arch. Virol.* 104, 299–308. <https://doi.org/10.1007/BF01315551>

Reis, E.V.S., Damas, B.M., Mendonça, D.C., Abrahão, J.S., Bonjardim, C.A., 2021. In-depth characterization of the chikungunya virus replication cycle. *J. Virol.*

<https://doi.org/10.1128/JVI.01732-21>

Ribeiro-Filho, H.V., Coimbra, L.D., Cassago, A., Rocha, R.P.F., Guerra, J.V. da S., de Felicio, R., Carnieli, C.M., Leme, L., Padilha, A.C., Paes Leme, A.F., Trivella, D.B.B., Portugal, R.V., Lopes-de-Oliveira, P.S., Marques, R.E., 2021. Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. *Nat. Commun.* 12, 3038. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23400-9>

Silva, L.A., Dermody, T.S., 2017. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J. Clin. Invest.* 127, 737.

<https://doi.org/10.1172/JCI84417>

Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Roux, K.L., 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, F.A., Arenzana-Seisdedos, F., Desprès, P., Michault, A., Albert, M.L., Schwartz, O., 2007. Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLoS Pathog.* 3, 0804–0817. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.0030089>

Funding

This work was supported by grants awarded to C.A. Bonjardim: Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - CBB – APQ-01670-11; CBB – AUC-00071-15; FAPEMIG/ PPSUS (Pesquisa Para o Serviço Único de Saúde) – CBB – APQ - 04178-17; APQ-03360-17.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests

Author Contributions

Diogo C. Mendonça: study conceptualization and design, methodology, investigation and first draft writing. Erik V. S. Reis: methodology, investigation and reviewing. Nídia E. C. Arias: methodology and investigation. Hugo J. Valencia: design, reviewing and editing. Cláudio A. Bonjardim: study conceptualization, funding acquisition, supervision and writing -reviewing and editing.

Data Availability

Viral samples will be available upon request.

FIGURE LEGENDS

Fig.1 MAYV growth kinetics and RNA synthesis. (a) MAYV replication cycle. Vero cells were infected with MAYV at MOIs of 10, 1 and 0.1, and virus growth was monitored at different time points up to 24 hpi. The viral growth curves showed similar patterns with the eclipse phase at approximately 4 hpi followed by an exponential phase. (b–d) MAYV RNA replication and virus infectivity. Vero cells were infected with MAYV at an MOI of 10 and assessed at different time points. (b) The cell monolayer was collected and submitted to RNA extraction followed by qPCR. RNA replication started at approximately 2 hpi, reaching a plateau at 4 hpi. (c, d) Viral infectivity from the cell monolayer or from the supernatant was determined by plaque assay. (c) Particle production started approximately 3–4 hpi. (d) Particle liberation started at approximately 5–6 hpi. Error bars indicate standard deviations from the means

Fig.2 Mayaro virus the cell entry. Vero cells were infected with Mayaro virus (MAYV) at an MOI of 10 and were assessed by TEM at (a) 15 mpi (b, c) 30 mpi and (d–f) 1.0 hpi (a) A MAYV particle outside of the cell. (b) A MAYV particle undergoing clathrin-mediated

endocytosis. (c, d) MAYV particle inside an endosome surrounded by clathrin proteins and (e) the uncoating of virus particles. (f) MAYV particle outside an endosome but inside the cell. The images show electron micrographs with scale bars

Fig.3 Mayaro virus ribosome reorganization. Vero cells infected with Mayaro virus (MAYV) at an MOI of 10 were assessed at 3 hpi by TEM. (a) Ribosomes arranged in a circular pattern close to the nucleus, with the white rectangles showing a higher magnification. (b) Ribosomes arranged in a circular pattern around a vacuole-like structure. (c) Giant cluster of ribosomes and three vacuole-like structures surrounded by nucleocapsids. (d) Cluster of nucleocapsid-like particles (white dashed rectangles). (e) Two clusters of nucleocapsid-like particles, one smaller (white dashed square) and the other larger, may represent a higher stage of development. The images show electron micrographs with scale bars

Fig.4 Mayaro virus-induced spherule formation. Vero cells infected with Mayaro virus (MAYV) at an MOI of 10 were assessed at 4 hpi by TEM. (a–c) Spherules outside and anchored to the cell with dashed rectangles (a) showing a higher magnification. (d, e) Spherule-like structures inside the cell near the endoplasmic reticulum. The images show electron micrographs with scale bars

Fig.5 CPV-II formation correlates with Mayaro virus morphogenesis. Vero cells infected with Mayaro virus (MAYV) at an MOI of 10 were assessed 5–6 hpi by TEM. Different forms of CPV-II were observed, including (a) half-moons, (b) curved rods, (c) straight rods and (d, e) circular shapes. The images show electron micrographs with scale bars

Fig.6 Mayaro virus release. Vero cells infected with Mayaro virus (MAYV) at an MOI of 10 were assessed 4–6 hpi by TEM. (a) - First budding particles observed at 4 hpi. While the particle on the left acquires its envelope, the particle on the right is released. (b) A number of articles near the cell membrane at 5 hpi. (c) A higher number of articles were released at 6 hpi. (d)

Formation of a giant form containing viral particles at 5 hpi. (e) Giant form released at 6 hpi. The images show electron micrographs with scale bars

Fig.7 Timeline of events of the MAYV replication cycle. (a) Viral penetration starts at 15–30 mpi through clathrin-mediated endocytosis. (b) At 1 hpi, particles are internalized into cell vesicles. (c) At 2 hpi, the uncoating process begins, and RNA replication begins. (d, e) At 3 hpi, morphogenesis of particles starts with d) reorganization of ribosomes and (e) formation of the first viral particles. (f) At 4 hpi, spherules were found in every cell, and the first particles began to bud from the cells. (g) At 5 hpi, CPV-II was abundant in the cytoplasm, and the number of particles increased exponentially. At 6 hpi, most of the particles left the cells either by (h) budding or by (i) exocytosis inside giant forms

Figure 1

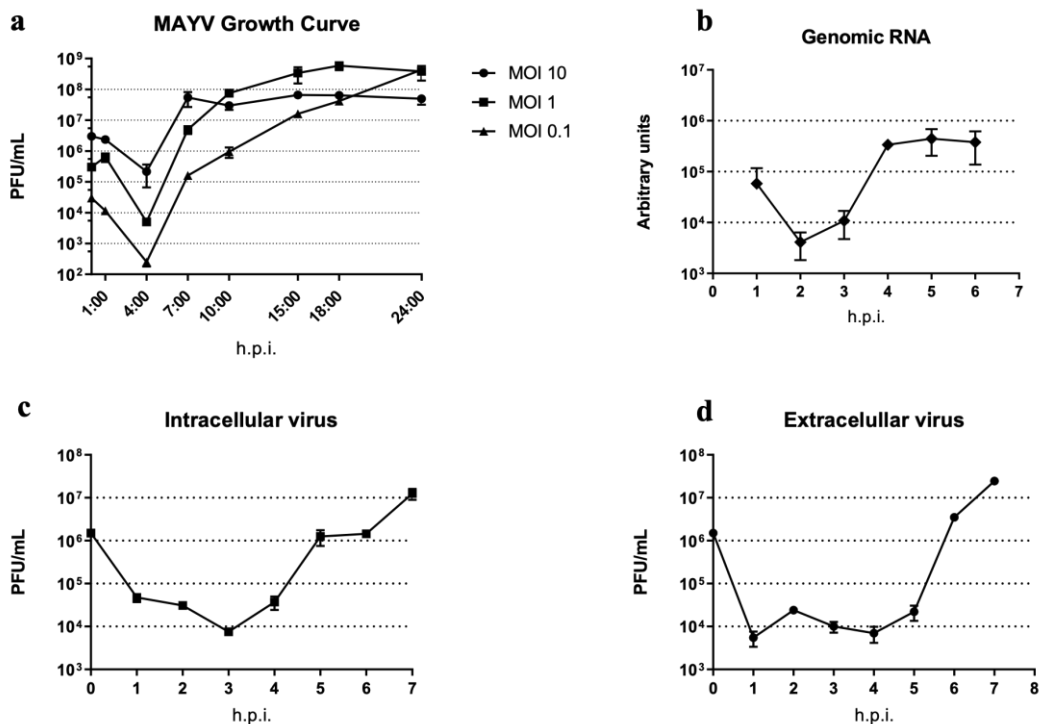


Figure 2

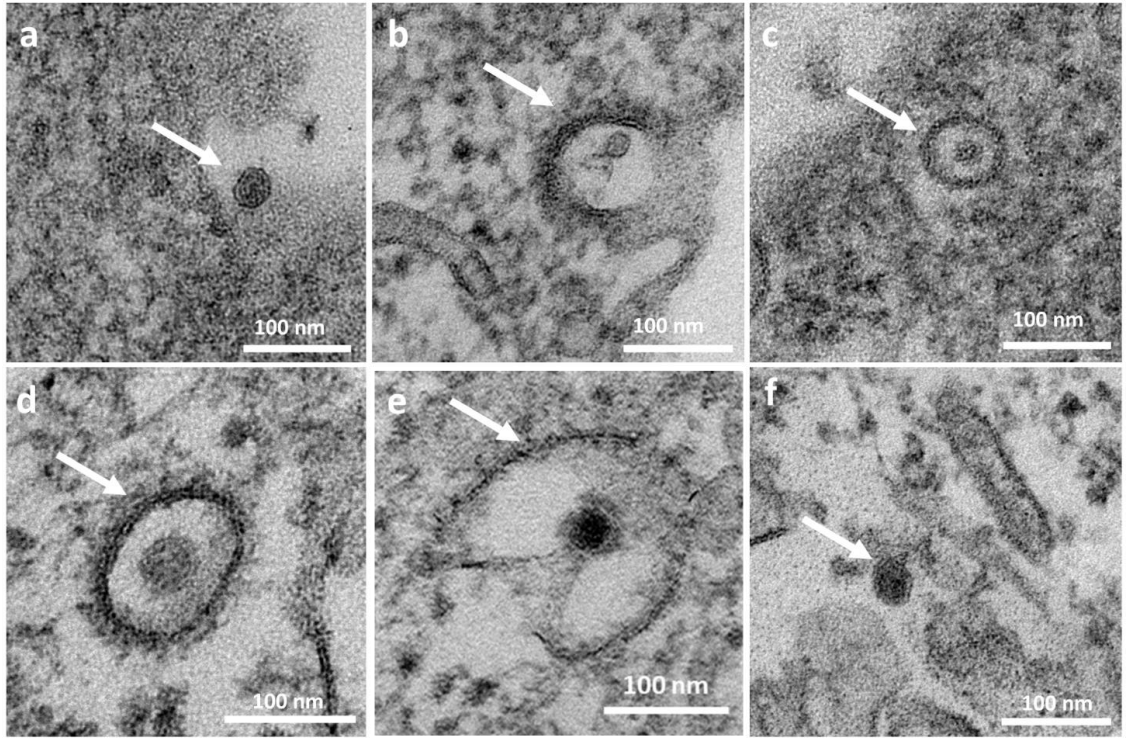


Figure 3

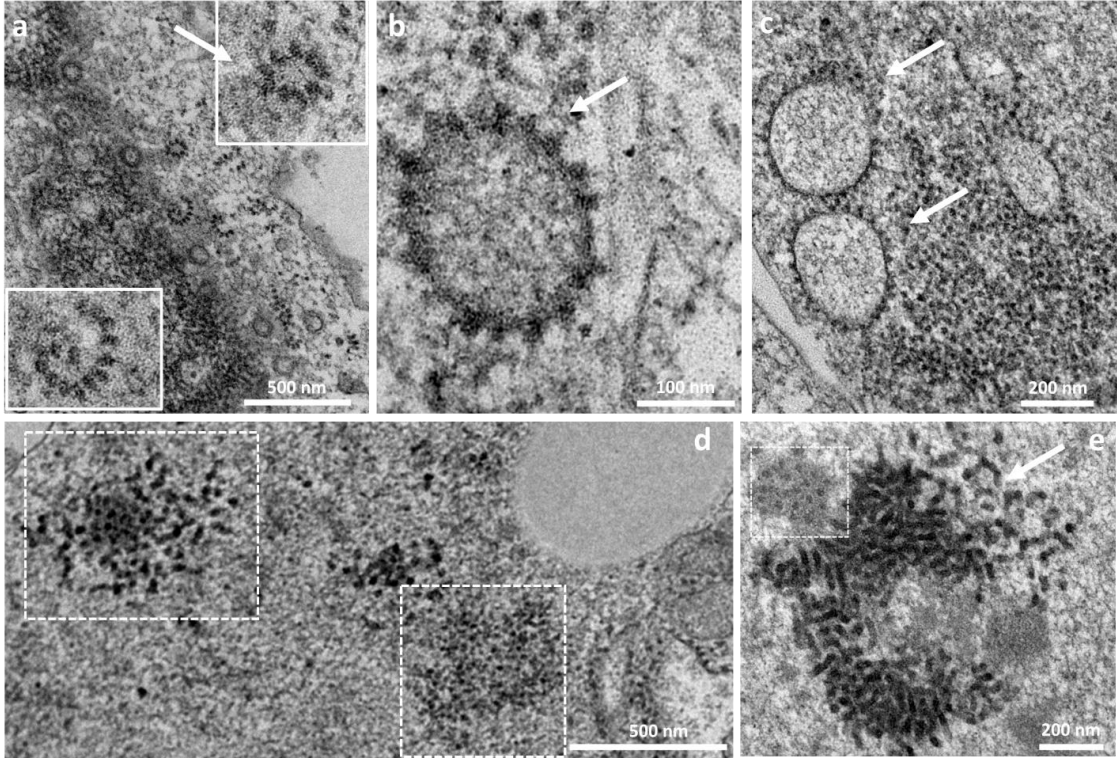


Figure 4

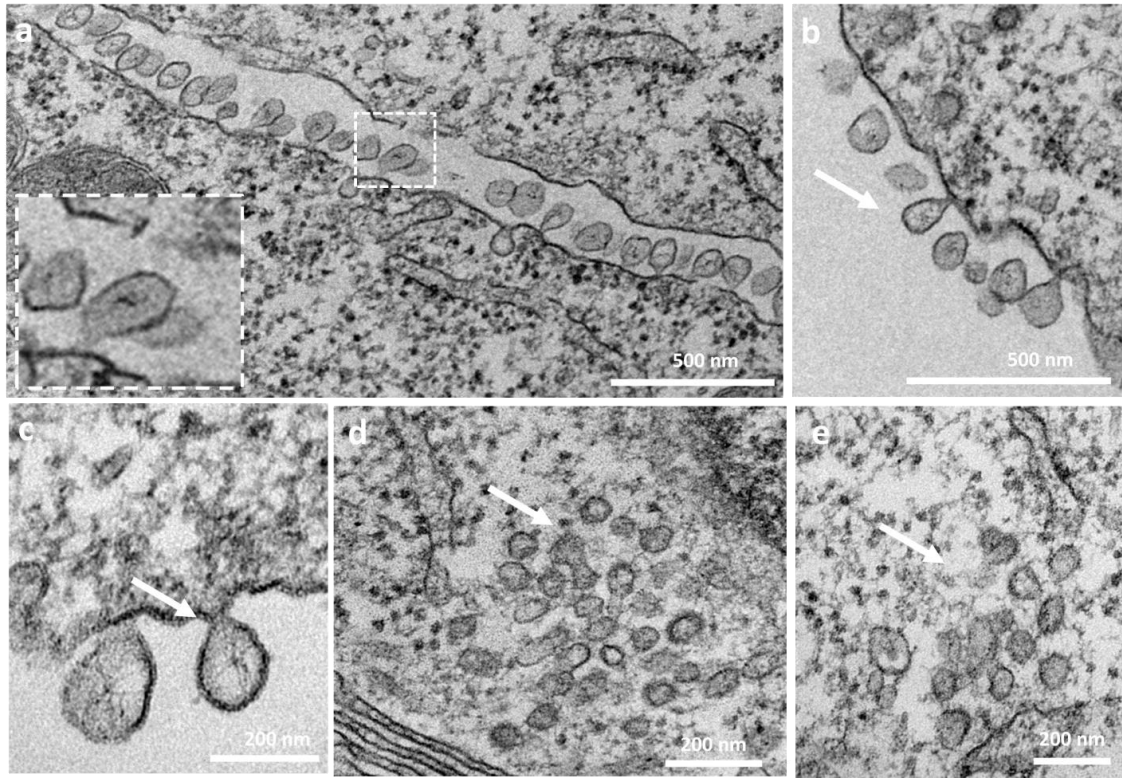


Figure 5

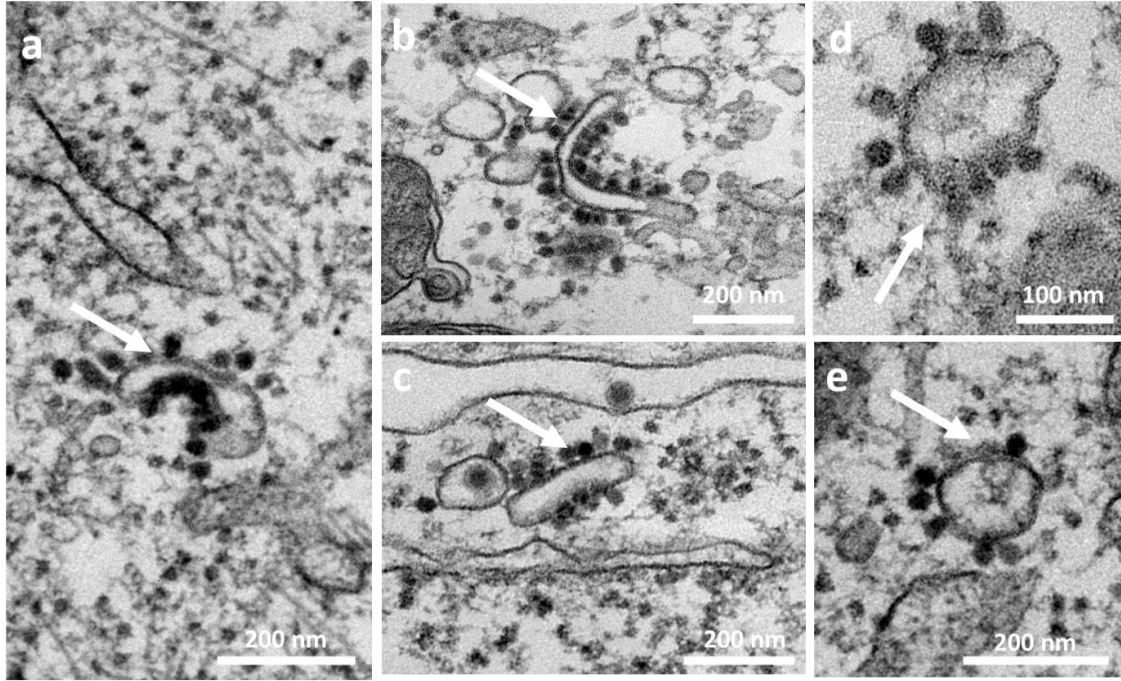


Figure 6

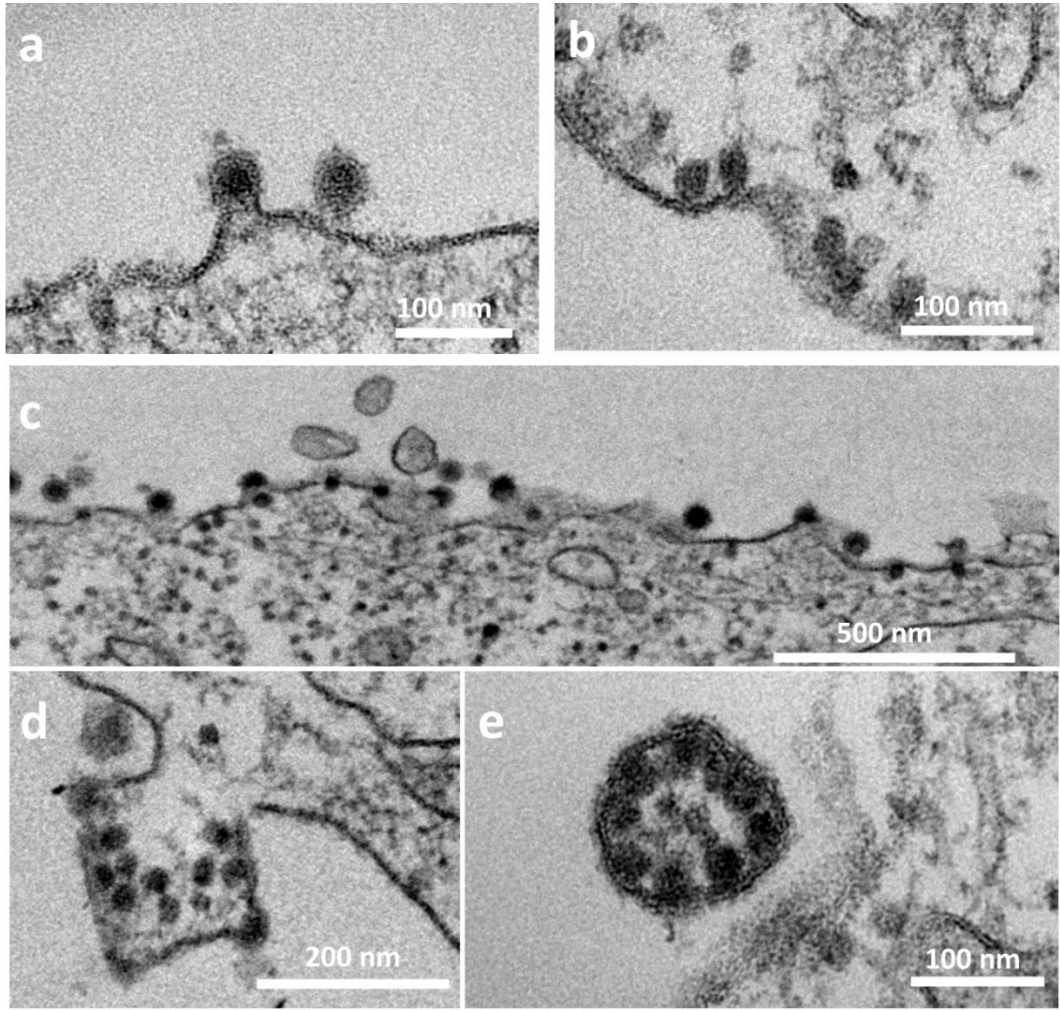


Figure 7