

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

DÉBORA DE MENESES SOUZA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE INIBIDORES
FARMACOLÓGICOS CONTRA CHIKUNGUNYA VÍRUS**

Belo Horizonte

2020

DÉBORA DE MENESES SOUZA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE INIBIDORES
FARMACOLÓGICOS CONTRA CHIKUNGUNYA VÍRUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte

2020

043

Oliveira, Débora de Meneses Souza de.

Avaliação do potencial antiviral de inibidores farmacológicos contra Chikungunya vírus [manuscrito] / Débora de Meneses Souza de Oliveira. – 2020.

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

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim.

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

1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Antivirais. 4. Transdução de Sinais. 5. Proteína 3 que Contém Domínio de Pirina da Família NLR. I. Bonjardim, Cláudio Antônio. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

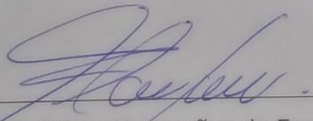
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE DÉBORA DE MENESES SOUZA DE OLIVEIRA
Nº REGISTRO: 2018684692

Às 9 horas do dia 19 de março de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs., Flávio Guimarães da Fonseca, Jaquelline Germano de Oliveira e o Prof. Cláudio Antônio Bonjardim-Orientador, para julgar o trabalho final "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE INIBIDORES FARMACOLÓGICOS CONTRA CHIKUNGUNYA VÍRUS", da aluna Débora de Menezes Souza de Oliveira, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata 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 dissertação ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Dra. Jaquelline Germano de Oliveira

Prof. Cláudio Antônio Bonjardim [Orientador]


Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador do PPGM/UFMG

Aos meus pais, irmãs e ao meu Edu!

AGRADECIMENTOS

A Deus, o presenteador desta oportunidade e da minha existência!

Aos melhores pais do mundo, Aelson e Neilza! São meus maiores incentivadores e espelho de como quero ser. Amo vocês!

Às melhores irmãs-amigas do mundo, Cássia e Queila! A confiança de vocês em mim me ajuda a persistir sempre um pouco mais nesta caminhada que escolhi. Amo vocês!

Ao meu Edu! Como conseguiria passar pelas crises, medos e frustrações sentidas ao longo deste processo sem você? Não sei. Resolvemos casar no meio disso tudo e foi a escolha mais acertada da minha vida! Amo-te demais!

Ao prof Cláudio por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Grupo de Transdução de Sinal (GTS), do qual sempre sentirei orgulho em dizer que fiz parte, e pela paciência e respeito na orientação.

Aos professores do Laboratório de Vírus: Erna Kroon, Jonatas Abrahão, Betania Drumond e Giliane Trindade. Exemplos de profissionais.

A todos labvirianos pelas trocas de experiências científicas e pessoais. Em especial, a labviriana Nidia que me acompanhou desde a minha primeira visita ao laboratório.

Apreendi demais com você!

Aos amigos e familiares, de longe ou perto, que estavam na torcida para este momento chegasse!

RESUMO

O vírus chikungunya (CHIKV) é um arbovírus transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo responsável pela febre Chikungunya (CHIKF) em humanos. A infecção é comumente caracterizada por febre, erupções cutâneas e artralgia, que em muitos casos progride para um quadro grave e crônico. Entre 2016 e 2019, foram registrados 372 246 casos confirmados de CHIKF e 542 óbitos no Brasil. Atualmente, não há antivirais ou vacinas disponíveis para tratar ou prevenir a infecção por CHIKV. Na busca por novas formas de tratar as doenças causadas por vírus, tem se destacado a pesquisa por substâncias que possuem como alvo as proteínas do hospedeiro e, eventualmente, interrompam seu ciclo de multiplicação. Neste trabalho, avaliamos os efeitos dos inibidores de MEK/ERK, Selumetinib, Binimetinib e Trametinib, e o inibidor de NLRP3, MCC950, contra CHIKV. Após a análise da citotoxicidade dos inibidores através de MTT e Cristal Violeta, a possível atividade antiviral foi avaliada por meio de ensaio de placa e Western Blot. Somente a concentração de 40 μ M de Trametinib reduziu o título de CHIKV em 1 \log_{10} em células Vero, afetando, principalmente, as etapas tardias do ciclo multiplicação. Também foram observados que CHIKV induz aumento da expressão de NLRP3 e da fosforilação de ERK1/2 após 12 hpi em células Raw 264.7. Assim, temos que Trametinib é uma alternativa potencial para tratamento de CHIKF e evidências que as vias de MEK/ERK e do inflamassoma NLRP3 são ativadas na infecção por CHIKV.

Palavras-chave: Arbovírus, antiviral, vias de sinalização, MEK/ERK, NLRP3

ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, being responsible for Chikungunya fever (CHIKF) in humans. The infection is commonly characterized by fever, rashes and arthralgia which in many cases progresses to a severe and chronic condition. Between 2016 and 2019, 372 246 confirmed cases of CHIKF and 542 deaths were recorded in Brazil. Currently, there are no antivirals or vaccines available to treat or prevent CHIKV infection. In the search for new ways to treat diseases caused by viruses, the search for substances that target host proteins that interact with the virus has been highlighted and, may eventually interrupt its replication cycle. In this study, we evaluated the effects of MEK/ERK inhibitors, Selumetinib, Binimetinib and Trametinib, and the NLRP3 inhibitor, MCC950, against CHIKV. After analyzing the cytotoxicity of the inhibitors through MTT and Crystal Violet, the possible antiviral activity was evaluated by means of a plaque and Western Blot assay. Only Trametinib, at the concentration of 40 μ M, reduced the CHIKV titer by 1 \log_{10} in Vero cells, mainly affecting the late stages of its replication cycle. It was also observed that CHIKV induces increased expression of NLRP3 and phosphorylation of ERK1/2 after 12 hpi in Raw 264.7 cells. Therefore, we conclude that Trametinib is a potential alternative to treat CHIKF and obtained evidence that the MEK/ERK and NLRP3 inflammasome pathways are activated during CHIKV infection.

Keywords: Alphavirus, antiviral, signaling pathways, MEK/ERK, NLRP3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização do genoma do CHIKV e as proteínas codificadas	15
Figura 2 - Estrutura do heterodímero pE2-E1	17
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de multiplicação de CHIKV	21
Figura 4 - Árvore filogenética baseada em sequências completas de CHIKV.....	24
Figura 5 - Distribuição mundial do vírus chikungunya	25
Figura 6 - Ciclos de transmissão enzoótico (esquerda) e urbano (direita) de CHIKV na África	27
Figura 7 - Curso da infecção de CHIKV em adultos.....	29
Figura 8 - Representação esquemática da via de MEK/ERK.....	34
Figura 9 - Componentes do Inflamassoma NLRP3	39
Figura 10 - Estrutura química dos inibidores utilizados neste estudo.....	46
Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade de Selumetinib e Binimetinib em células Vero	54
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade de MCC950 em células Raw 264.7	55
Figura 13 - Curva de multiplicação de CHIKV em células Vero.....	56
Figura 14 - Macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c após três dias de implantadas	57
Figura 15 - Infecção com CHIKV de macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c.....	58
Figura 16 - Curva de multiplicação de CHIKV em células Raw 264.7	59
Figura 17 - Avaliação da atividade antiviral dos inibidores de MEK/ERK contra CHIKV.....	61
Figura 18 - Avaliação da atividade antiviral de Trametinib durante ciclo de multiplicação de CHIKV.....	63
Figura 19 - Tratamento com Trametinib em diferentes tempos da multiplicação de CHIKV.....	65
Figura 20 - Avaliação da atividade antiviral do inibidor de NLRP3 contra CHIKV.....	66
Figura 21 - Detecção das proteínas NLRP3 e ERK 1/2 fosforiladas durante a infecção por CHIKV.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos de febre chikungunya no Brasil entre 2016 e 2019	23
Tabela 2 - Compostos com atividade antiviral contra vírus chikungunya	31
Tabela 3 - Informações gerais sobre os inibidores que serão utilizados no estudo	45
Tabela 4 - Solução de Lise.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Trifosfato de Adenosina

BSA - Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumine*

CHIKF – Febre chikungunya

CHIKV – Vírus chikungunya

CPXV - Vírus cowpox

CMC – Carboximetilcelulose

DENV – Vírus da Dengue

DMSO - Dimetilsulfóxido

dpi. - Dias pós-infecção

EEEV – Vírus da Encefalite Equina do Leste do inglês *Eastern Equine Encephalitis virus*

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ERK - Proteína cinase regulada por sinais extracelulares, do inglês *extracellular signal regulated kinase protein*

GTP - Trifosfato de guanosina

hpi – Horas pós-infecção

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, do inglês *International Committee on Taxonomy of Viruses*

kDa – quilo Daltons

MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógenos, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinase*

MAP2K - MAPK cinase, do inglês *MAPK kinase*

MAP3K- MAPKK cinase, do inglês *MAPKK kinase*

MEK - Cinase da MAPK ERK, do inglês *MAPK ERK kinase*

MEM - Meio mínimo essencial

µg - Micrograma

µL - Microlitro

mL- Mililitro

µM - Micromolar

MOI - Multiplicidade de infecção, do inglês *Multiplicity of Infection*

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NLRP3 – do inglês *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat protein-3*
nm – nanômetro
ONNV - Vírus O'nyong nyong
ORF - Janela Aberta de Leitura, do inglês *Open Reading Frame*
PBS - Salina tamponada por fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain-Reaction*
PFU – Unidade Formadora de Placas, do inglês *Plate Forming Units*
p/p - Peso por peso
p/v - Peso por volume
q-PCR - PCR quantitativa, do inglês *quatitative PCR*
RT-qPCR - PCR quantitativa em tempo Real do inglês *Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR*
RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*
RNAm – RNA mensageiro
RPM – Rotações por minuto
RT-PCR – Reação de transcriptase seguida de PCR
SDS - Dodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium dodecyl sulfate*
SFB - Soro fetal bovino
SLEV - Vírus da Encefalite de Saint Louis
SINV – Vírus Sindbis
UTR – Região não traduzida, do inglês *Untranslated Region*
VACV – Vírus vaccínia
VEEV - Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
YFV - Vírus da Febre Amarela, do inglês *Yellow fever virus*
WB - Transferência de Western
WEEV – Vírus da Encefalite Equina do Oeste

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Vírus Chikungunya	14
1.1.1 Estrutura e Organização genômica	14
1.1.2 Ciclo de Multiplicação	19
1.1.3 Filogenia, Ciclo de Transmissão e Epidemiologia	22
1.1.4 Aspectos clínicos e Tratamento	27
1.2 A interação vírus-hospedeiro e as vias de sinalização celular	31
1.2.1 Proteínas Cinasas Ativadas por Mitógenos (MAPK)	32
1.2.1.1 Proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK)	33
1.2.2 Inflamassoma NLRP3.....	34
1.2.3 CHIKV e as vias de sinalização de estudo.....	36
1.3 Os inibidores farmacológicos	37
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVO	42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1.Linhagens celulares	43
4.1.1 Vero	43
4.1.2 Macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c.....	43
4.1.3 Células Raw 264.7.....	44
4.2 Vírus	44
4.3 Inibidores Farmacológicos e Anticorpos	44
4.4 Teste de Citotoxicidade	46
4.4.1 Teste de viabilidade celular com MTT	46
4.4.2 Teste de viabilidade celular – Cristal Violeta	47
4.5 Ensaio de Placa	48
4.6 Curva de Multiplicação de CHIKV em células Vero, macrófagos intraperitoneais de BALB/c e Raw 264.7	48
4.7 Avaliação da atividade antiviral dos inibidores contra CHIKV	49
4.8 Avaliação do tratamento com Trametinib no ciclo de multiplicação de CHIKV	50

4.9 Detecção das proteínas NLRP3 e ERK 1/2 fosforiladas durante a infecção por CHIKV em Raw	50
4.9.1 Extrato proteico celular total	50
4.9.2 Transferência de Western	51
4.10 Análise de dados.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Avaliação da citotoxicidade dos inibidores farmacológicos	53
5.1.1 Avaliação da citotoxicidade de Selumetinib e Binimetinib em células Vero	53
5.1.2 Avaliação da citotoxicidade de MCC950 em Raw.....	54
5.2 Curva de Multiplicação de CHIKV em células Vero, Macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c e Raw	55
5.2.1 Curva de Multiplicação de CHIKV em células Vero.....	55
5.2.2 Curva de Multiplicação de CHIKV em Macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c e em células Raw 264.7.....	57
5.3 Avaliação da atividade antiviral dos inibidores contra CHIKV	61
5.3.1. Avaliação da atividade antiviral dos inibidores de MEK/ERK.....	61
5.3.2 Avaliação da atividade antiviral de Trametinib durante ciclo de multiplicação de CHIKV	63
5.3.3 Tratamento com Trametinib em diferentes tempos da multiplicação de CHIKV	64
5.3.4 Avaliação da atividade antiviral do inibidor da via de NLRP3	65
5.3.5 Detecção das proteínas NLRP3 e ERK 1/2 fosforiladas durante a infecção por CHIKV em Raw 264.7	66
6 CONCLUSÕES	69
7 PERSPECTIVAS	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9 ANEXO	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arborvírus, ou seja, transmitido principalmente por artrópodes, pertencente ao domínio *Riboviria*, à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*, sendo responsável pela febre Chikungunya (CHIKF) em humanos. Além de CHIKV, são reconhecidos oficialmente mais de 30 espécies de alfavírus (ICTV; MURUGAN *et al.*, 2016). As infecções por alfavírus que circulam no Velho Mundo, tais como os vírus CHIKV, O'nyong nyong (ONNV) e o Sindbis (SINV), causam comumente erupção cutânea e artrite. Diferentemente, os alfavírus encontrados no Novo Mundo são primariamente associados com encefalites, entre eles os vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Encefalite Equina do Leste (EEEV) e o da Encefalite Equina do Oeste (WEEV) (GOLD *et al.*, 2010; GRIFFIN, 2013; SUHRBIER *et al.*, 2012).

A infecção por CHIKV foi relatada pela primeira vez na Tanzânia em 1952 e as primeiras tentativas de isolamento viral aconteceram em 1953. Chikungunya é uma palavra oriunda do povo *Makonde* (língua Bantu) que significa “aquele que se curva” ou “que se dobra” referindo-se à postura dos afetados (LUMSDEN, 1955). A infecção é comumente caracterizada por uma febre aguda que progride para artralgia grave e persistente, principalmente no pulso, joelho, tornozelo e pequenas articulações das mãos e pés, no estágio crônico da doença. Outras manifestações incluem dor de cabeça, mialgia, edema das articulações, náusea e erupções cutâneas (BURT *et al.*, 2017; ROUGERON *et al.*, 2015; SINGH e UNNI, 2011; TENG *et al.*, 2015).

1.1.1 Estrutura e Organização genômica

O CHIKV é um vírus envelopado com capsídeo icosaédrico variando de 60-70 nm de diâmetro. Assim como outros vírus envelopados, é sensível ao éter, detergente e à dissecação em temperaturas acima de 58 °C (GRIFFIN, 2013; ROUGERON *et al.*, 2015; THIBERVILLE *et al.*, 2013).

O CHIKV tem um genoma de RNA fita simples, senso positivo, de aproximadamente 12 kb que codifica quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) e seis proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K, TF e E1) (BURT *et al.*, 2017; SILVA e DERMODY, 2017). A identidade da sequência de aminoácidos de proteínas não estruturais de

CHIKV e outros alfavírus varia entre 58 a 85 % e de 42 a 85 % nas proteínas estruturais (MURUGAN *et al.*, 2016).

Similarmente a outros alfavírus, o genoma de CHIKV possui duas Janelas Abertas de Leitura (*Open Reading Frame* – ORF) e é organizado da seguinte maneira: 5' - nsP1 – nsP2 – nsP3 – nsP4- região de junção (J) – C–E3 – E2–6k/TF – E1- cauda poli (A) -3' (THIBERVILLE *et al.*, 2013; SOLIGNAT *et al.*, 2009; RAMSEY e MUKHOPADHYAY, 2017). A região de junção, composta de 68 nucleotídeos (nt), não é traduzida e contém um promotor interno entre as duas ORFs e local de início para a transcrição do RNA subgenômico (MURUGAN *et al.*, 2016). Possui na porção 5' uma região não-traduzida (*Untranslated Region*- UTR) de 76 nt e uma UTR 3' mais longa com 526 nt que compreende estruturas em forma de haste-alça (*stem-loop*), que permitem o início da tradução sem o requerimento de fatores de iniciação celular, além da presença de sequências repetidas que tem sido associadas com a adaptação do vírus aos seus vetores (ROUGERON *et al.*, 2015; SOLIGNAT *et al.*, 2009) (**Figura 1**). Além das UTRs, a fita de RNA possui estruturas cap na porção 5' e cauda poli-A na 3' (ONG *et al.*, 2014). O *capping* do RNA de CHIKV pode conferir proteção contra a degradação por exonucleases do hospedeiro, além de permitir maior eficiência no processo de tradução (WONG e CHU, 2018).

O envelope viral consiste de uma bicamada lipídica oriunda da célula hospedeira e nela estão inseridas 240 cópias das glicoproteínas E1 e E2 (JOSE *et al.*, 2009; STRAUSS e STRAUSS, 1994). Essas proteínas formam heterodímeros que se agrupam como trímeros para formar 80 espículas sobre a superfície do vírion e estão envolvidas com a adsorção e a penetração viral em células susceptíveis (GRIFFIN, 2013; LUM *et al.*, 2015; ONG *et al.*, 2014; SOLIGNAT *et al.* 2009; STRAUSS e STRAUSS, 1994). As 240 cópias dessas glicoproteínas interagem com outras 240 cópias da proteína do capsídeo (GRIFFIN, 2013).

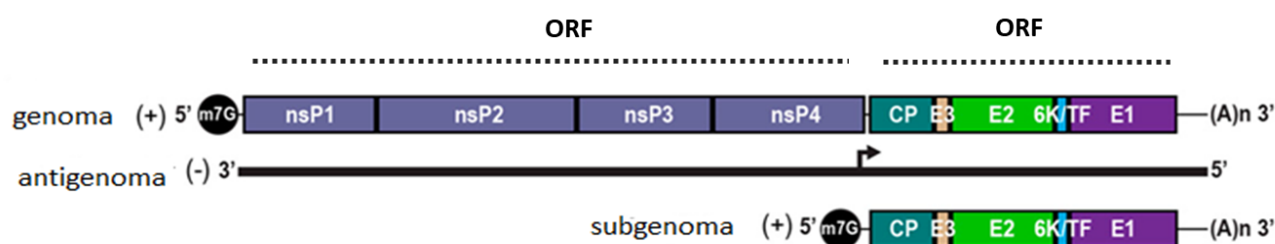


Figura 1. Organização do genoma do CHIKV e as proteínas codificadas. A fita de RNA possui estruturas cap na porção 5' e tem cauda poli-A na 3' (ONG *et al.*, 2014).

Nas porções extremas do RNA há a presença de regiões não-traduzidas (Untranslated Region- UTR), assim como a região de junção (J). O genoma viral é constituído por duas ORFs. A primeira ORF codifica as quatro proteínas não estruturais (nsP1–4), que funcionam como a maquinaria de replicação viral. A transcrição da fita de RNA senso negativo gera um RNA subgenômico senso positivo (26S RNA) que servirá como RNAm para síntese das seis proteínas estruturais: proteína do capsídeo (C), as glicoproteínas (E1 e E2 e E3) e as proteínas 6K e TF (ROUGERON *et al.*, 2015). As diferentes proteínas não estruturais e estruturais são geradas após clivagens proteolíticas de poliproteínas precursoras. (Adaptado de RAMSEY e MUKHOPADHYAY, 2017)

A glicoproteína E2 (423 resíduos de aminoácidos- aa), derivada após clivagem pela furina de pE2 (também chamado de p62) até E3 e E2 e pertence à superfamília de imunoglobulinas com três domínios denominados A, B e C na ordem da porção N a C-terminal (SOLIGNAT *et al.* 2009; VANEY *et al.*, 2013; VOSS *et al.*, 2010) (**Figura 2**). O domínio B está na extremidade distal do envelope e o domínio C está na direção do envelope, com o domínio A (132 aa) no centro, sendo o sítio de interação com o receptor celular (GRIFFIN, 2013; VOSS *et al.*, 2010; VANEY *et al.*, 2013). A porção mais interna interage com o capsídeo e tem um segundo trecho de aminoácidos hidrofóbicos e locais de miristoilação que a prendem à superfície interna do envelope (GRIFFIN, 2013). Por estar localizada mais externamente na superfície do vírion, a E2 é o principal alvo de anticorpos neutralizantes (VOSS *et al.*, 2010).

A glicoproteína E1 com aproximadamente 435 aa é recoberta pela E2 no envelope viral e é responsável pela fusão do envelope com a membrana do endossomo (JOSE *et al.*, 2009; MURUGAN *et al.*, 2016). Possui estrutura típica de outras proteínas de fusão de classe II, com três domínios denominados de I, II e III, com o I ocupando a porção central (VANEY *et al.*, 2013 (**Figura 2**). No domínio II está localizada a alça de fusão, que permanece encoberto na associação de E1/E2 até serem expostos ao baixo pH do endossomo (JOSE *et al.*, 2009; VANEY *et al.*, 2013; VOSS *et al.*, 2010).

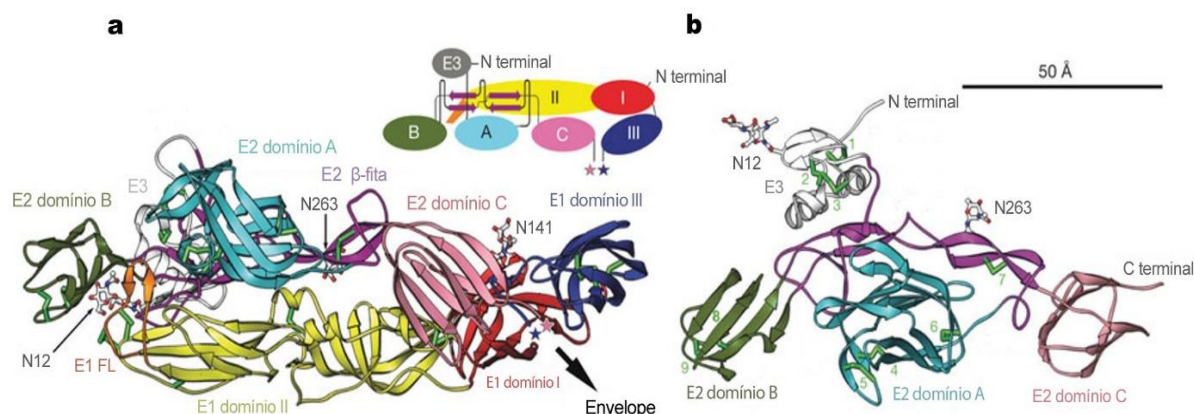


Figura 2. Estrutura do heterodímero pE2-E1. **a.** Diagrama de Ribbon do heterodímero pE2-E1. Os domínios de E1 (I, II e III) são mostrados em vermelho, amarelo e azul, respectivamente, e a alça de fusão (FL) em laranja. Em cinza e branco E3. O domínio A de E2 é colorido de ciano, B verde escuro, C rosa e roxo púrpura. A seta preta (ao lado das estrelas rosa e azul indicando a região C-terminal de p62 e E1, respectivamente) aponta para o envelope. **b.** Organização de pE2 orientada aproximadamente a 90 graus para evidenciar E3. (Adaptado de VOSS *et al.*, 2010)

E3 é uma glicoproteína α/β de 64 aa, rica em cisteína, que serve como peptídeo sinal para pE2 e possui atividade de dissulfeto isomerase auxiliando, assim, no dobramento adequado e na formação da ligação dissulfeto nas glicoproteínas virais (MURUGAN *et al.*, 2016; SOLIGNAT *et al.* 2009; VOSS *et al.*, 2010). Como parte do heterodímero pE2/E1, exerce a importante função de impedir a ativação prematura de E1, sendo liberada quando a partícula viral brota da membrana celular (GRIFFIN, 2013; JOSE *et al.*, 2009).

A proteína do capsídeo (C) com 261 aa está relacionada à montagem e brotamento do vírion (MURUGAN *et al.*, 2016; GOH *et al.*, 2015). A proteína C possui atividade serina protease na porção C-terminal, clivando-se durante a tradução da poliproteína (MURUGAN *et al.*, 2016; JOSE *et al.*, 2009; STRAUSS e STRAUSS, 1994). A porção C-terminal também interage com outras cópias da proteína C para formar o nucleocapsídeo e com a porção citoplasmática da glicoproteína E2. Já a porção N-terminal possui carga positiva e que permite uma ligação não específica com o RNA (GOH *et al.*, 2015; GRIFFIN, 2013). Têm sido identificadas sequências de Sinal de Localização Nuclear (NLS- *Nuclear Localization Signal*) e de Sinal de Exportação

Nuclear (NES- *Nuclear Export Signals*) na proteína C de CHIKV, permitindo seu transporte ativo entre o núcleo e o citoplasma (THOMAS *et al.*, 2013; WONG e CHU, 2018).

A pequena proteína hidrofóbica 6K (61 aa) atua como peptídeo sinal para o processamento de E1, sendo clivada de E1 e E2 pela peptidase sinal (MURUGAN *et al.*, 2016; GRIFFIN, 2013). Algumas proteínas (7-30 unidades) são incorporadas dentro do vírion, mas seu papel na multiplicação viral não é bem entendido (GRIFFIN, 2013; JOSE *et al.*, 2009). Porém, tem sido sugerido com base em outros alfavírus, que essa proteína medeia a permeabilidade da membrana e o brotamento viral e pode estar envolvida na formação de canais iônicos (WONG e CHU, 2018).

A proteína TF (TransFrame - 8.3 kDa) é produzida a partir de “*ribosomal frameshifting*”. Possui o domínio transmembrana N-terminal e uma alça citoplasmática curta e rica em cisteína semelhante à proteína 6K. Alguns estudos têm mostrado que atua na etapa de brotamento e, possivelmente, como fator de virulência (RAMSEY e MUKHOPADHYAY, 2017; WONG e CHU, 2018).

As quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) são geradas diretamente do RNA genômico e estão envolvidas com a síntese de RNA (RUPP *et al.*, 2015).

A proteína nsP1 (535 aa) possui atividade enzimática de guanina-7-metiltransferase e guaniltransferase responsável pelo “*capping*” do RNA genômico senso positivo e o subgenômico 26S. É a única proteína não estrutural com capacidade de interagir com a membrana plasmática, tornando possível a ancoragem do complexo de replicação nas membranas celulares. Essa interação é mediada por uma α -hélice anfipática e palmitoilação presente em sua estrutura (JOSE *et al.*, 2009; WONG e CHU, 2018).

A proteína nsP2 (798 aa) tem múltiplas funções durante a infecção. O domínio N-terminal de nsP2 contém a atividade de helicase necessária para a abertura do RNA duplo durante a replicação, além de trifosfatase de RNA e da trifosfatase de nucleosídeos. O domínio C-terminal contém uma protease de cisteína do tipo papaína e um domínio de metil-transferase enzimática não-funcional (MTase) (JOSE *et al.*, 2009). A nsP2 está relacionada com a supressão dos processos de transcrição e tradução do hospedeiro, porém, sem afetar a síntese de proteínas virais (WONG e CHU, 2018; RUPP *et al.*, 2015). É encontrada dentro no núcleo durante a infecção,

mas seu papel ainda é desconhecido neste compartimento (JOSE *et al.*, 2009; WONG e CHU, 2018).

A nsP3 com 530 aa possui três domínios, mas seu papel na replicação ainda não foi totalmente elucidado. O macro domínio N-terminal é altamente conservado e acredita-se que atue como uma hidrolase de ADP (WONG e CHU, 2018). A região C-terminal atua como plataforma de ligação às várias proteínas do hospedeiro, incluindo G3BP e anfifisinas (BURT *et al.*, 2017). As anfifisinas podem estar relacionadas com a formação das esférulas (evaginação da membrana plasmática induzida pelos alfavírus e que abriga o complexo de replicação), dada sua habilidade de induzir a curvatura da membrana (RUPP *et al.*, 2015; SPUUL *et al.*, 2011; WONG e CHU, 2018).

A proteína nsP4 (611 aa) atua como uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), pois apresenta o característico motivo GDD encontrado nas RNA polimerases virais (STRAUSS e STRAUSS, 1994; WONG e CHU, 2018). Sua concentração é menor quando comparado com a das outras proteínas não estruturais, principalmente por sofrer rápida degradação na região N-terminal (JOSE *et al.*, 2009).

1.1.2 Ciclo de Multiplicação

No geral, os eventos de multiplicação de CHIKV se assemelham a de outros alfavírus, porém alguns aspectos de sua biologia permanecem desconhecidos (SILVA e DERMODY, 2017).

A penetração de CHIKV é mediada pela glicoproteína E2 do envelope e as partículas são internalizadas por endocitose mediada por clatrina (SILVA e DERMODY, 2017). Estudos têm mostrado que a proteína Mxra8 é o receptor que interage com E2 (ZHANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019). Os glicosaminoglicanos, que são expressos em muitos tipos celulares suscetíveis, podem funcionar como fatores de adesão para aumentar a infectividade (MURANG *et al.*, 2016; SILVA e DERMODY, 2017).

A acidificação do endossomo provoca alterações conformacionais do heterodímero E1-E2 que expõe a alça de fusão de E1 e sua consequente ligação à membrana endossomal, resultando na fusão do envelope com a membrana do endossomo (SILVA e DERMODY, 2017). Após o desnudamento, ocorre a liberação do RNA viral. O genoma é traduzido diretamente para produzir a poliproteína precursora de

proteínas não estruturais P1234, que é logo em seguida clivada pela nsP2 em P123 e nsP4 (MURANG *et al.*, 2016).

A P123 interage com a nsP4 e algumas proteínas do hospedeiro para formar o complexo de replicação (replicase viral) que sintetiza a fita negativa de RNA (SOLIGNAT *et al.*, 2009). A síntese da fita negativa está ligada à formação de estruturas denominadas esférulas, que são evaginações da membrana plasmática de aproximadamente 50 nm de diâmetro, conectadas ao citoplasma por estreita uma região (pescoço); servindo como local de replicação de RNA (KALLIO *et al.*, 2016; SPUUL *et al.*, 2011; SILVA e DERMODY, 2017). Acredita-se que as nsPs localizem-se no pescoço das esférulas, abarcando o RNA dupla fita, protegendo-o da degradação e do reconhecimento pelos receptores de reconhecimento de padrões celulares. À medida que a infecção prossegue, as esférulas são internalizadas para formar grandes vacúolos citopáticos (CPV-I) (SILVA e DERMODY, 2017).

A fita negativa é usada como molde para a síntese do RNA genômico e subgenômico (RNA 26S). O RNA 26S, quando traduzido, produz a poliproteína estrutural viral E3-E2-6K-E1. Após a síntese, a proteína do C, devido à sua atividade de clivagem autoproteolítica, é liberada da poliproteína estrutural, permitindo sua interação com o genoma recém-sintetizado e formação do nucleocapsídeo. A sequência sinal presente na região N-terminal de E3 direciona a poliproteína (E3-E2-6K-E1 ou E3-E2-TF) ao retículo endoplasmático, onde é clivada por proteases do hospedeiro, produzindo pE2 (E3-E2), a 6k ou TF e E1. Após modificações, E1 interage com pE2 formando o heterodímero que será transportado até o complexo de Golgi. Na fase tardia do transporte da via secretória, E3 é liberado pela clivagem da furina do hospedeiro. As partículas totalmente montadas adquirem a membrana plasmática com as glicoproteínas E2 e E1 e finalmente são liberadas da célula hospedeira pelo processo de brotamento. Tem sido relatado um segundo tipo de vacúolo citopático induzido por vírus, o CPV-II, na fase final da infecção, contendo glicoproteínas virais e rodeados de nucleocapsídeos (SILVA e DERMODY, 2017).

No geral, a multiplicação do CHIKV ocorre entre 8 e 16 horas após a infecção, porém, nas células dos vertebrados os vírions são tipicamente produzidos em menos de 8 horas após a infecção a 37 °C (LUM e NG, 2015).

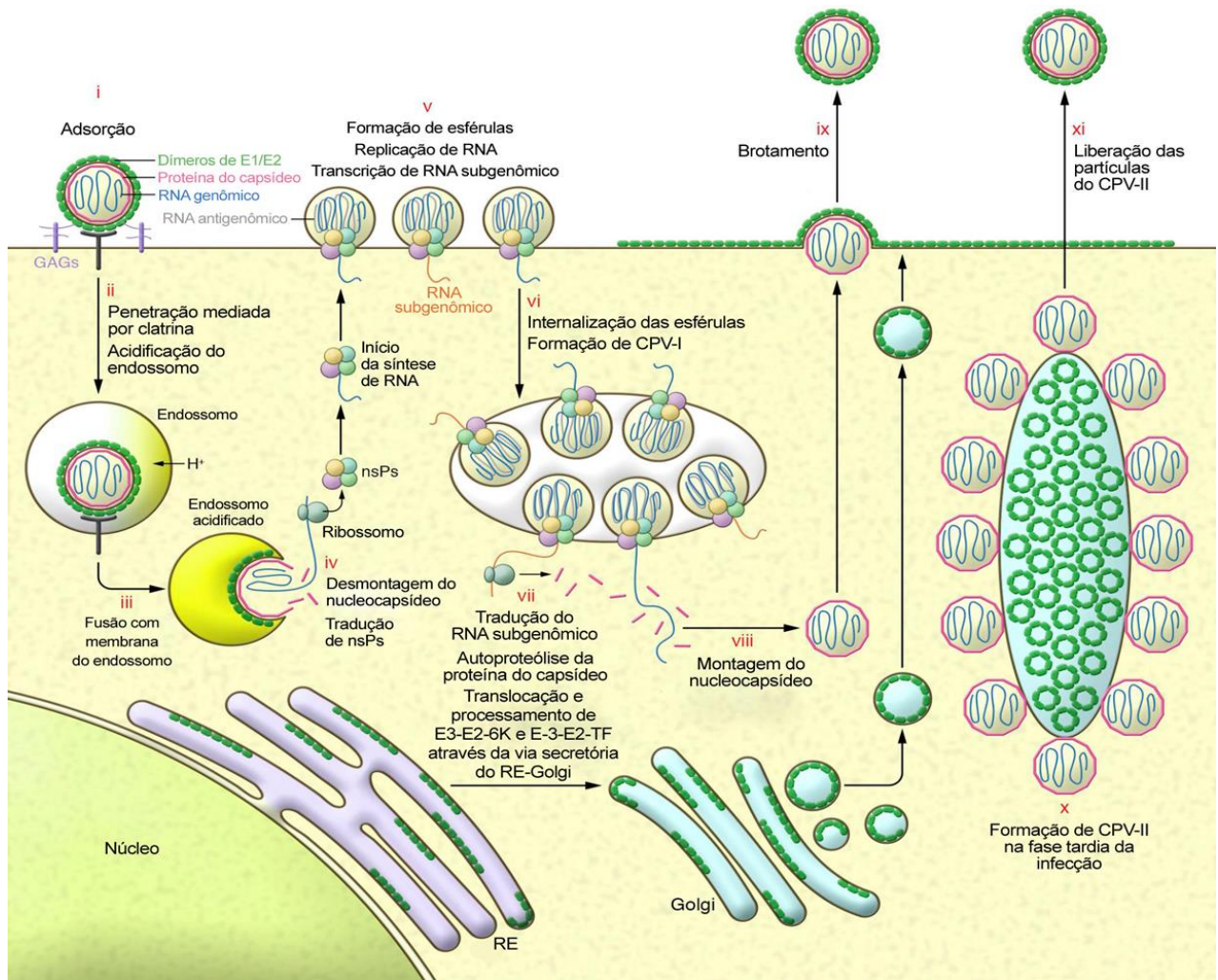


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de multiplicação de CHIKV. A penetração de CHIKV se dá por endocitose mediada por clatrina, sendo a glicoproteína E2 responsável por interagir com o receptor Mxra8. Dentro do endossomo, o baixo pH provoca a fusão do envelope com a membrana endossomal, resultando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. O nucleocapsídeo é desmontado para liberar o RNA genômico. O RNA genômico é diretamente traduzido para produzir as proteínas não estruturais (nsP1-4). As proteínas não estruturais formam a replicase viral que catalisa a síntese da fita de RNA negativa, que por sua vez serve como molde para síntese de RNA genômico e o subgenômico 26S. Esta etapa ocorre caracteristicamente dentro das esférulas. Posteriormente, as esférulas são internalizadas formando o vacúolo citopático I (CPV-I). O RNA 26S é traduzido para produzir a poliproteína estrutural (pE2-6K-E1 ou E3-E2-TF). A proteína C, por autoproteólise, é liberada e interage com o genoma para formar o nucleocapsídeo, enquanto que a outra parte da poliproteína é direcionada para o retículo endoplasmático (ER). pE2 e E1 permanecem juntos até E3 ser clivada por uma furina na fase tardia do transporte na via secretória. As partículas montadas são liberadas por brotamento através da membrana plasmática, adquirindo assim, o envelope com

as glicoproteínas virais. Na etapa tardia da infecção ocorre a formação de CPV-II contendo glicoproteínas e rodeado de nucleocapsídeos. (Adaptado de SILVA e DERMODY, 2017)

1.1.3 Filogenia, Epidemiologia e Ciclo de Transmissão

Análises filogenéticas mostram três genótipos distintos de CHIKV que foram nomeados em referência às suas distribuições geográficas iniciais: Oeste Africano, Leste/Centro/Sul-Africano (*East/Central/South African – ECSA*) e o Asiático (**Figura 4**). Acredita-se que os três genótipos tenham surgido de um ancestral comum há menos de 500 anos, com os genótipos ECSA e Asiático se divergindo nos últimos 150 anos (VIGNUZZI E HIGGS, 2017). Recentemente, um subgrupo emergiu dentro do genótipo ECSA, a linhagem Oceano Índico (*Ocean lineage – IOL*) (SILVA e DERMODY, 2017).

CHIKV se tornou uma doença global, sendo encontrado em 94 países. (CONTOPOULOS-IOANNIDIS *et al.*, 2018; MURUGAN *et al.*, 2016). Fatores como movimento humano (viagens internacionais) e ampla distribuição dos vetores favorecem este quadro (MURUGAN *et al.*, 2016; WAHID *et al.*, 2017) (**Figura 5**).

O CHIKV foi isolado pela primeira vez a partir do soro de humano febril na Tanganyika (atual Tanzânia) em 1953 durante uma epidemia que se acreditava estar associada à dengue. Há relatos de possível epidemia de CHIKV ocorrendo já em 1779 em Batávia (Jacarta, Indonésia), também documentadas como surtos de dengue (CAREY, 1971; SUHRBIER *et al.*, 2012; PRESTI *et al.*, 2014).

Entre as décadas de 1960 e 1990, surtos de CHIKV ocorreram ocasionalmente na África e Ásia, porém a falta de diagnóstico adequado e dificuldade de distinguir a infecção de outras doenças febris podem mascarar o real impacto da doença (POWER e LOGUE, 2007; TSETSARKIN *et al.*, 2016).

Em 2004, uma grande epidemia de CHIKV pelo genótipo ECSA começou no Quênia, seguindo para Comores, Seychelles, Maurício, La Reunion e em outras ilhas do Oceano Índico e a Índia (PRESTI *et al.*, 2014; CAGLIOTI *et al.*, 2013). O surto mais estudado foi o de La Reunion, com aproximadamente 266.000 casos (34% da população da ilha), sendo 250 de casos fatais, causando grande impacto social e econômico (CAGLIOTI *et al.*, 2013; PRESTI *et al.*, 2014; SOURISSEAU *et al.*, 2007; WEAVER e FORRESTER, 2015).

O primeiro caso autóctone na Europa foi relatado na Itália em 2007, a introdução de CHIKV provavelmente se deu por um homem da Índia que desenvolveu um quadro febril 2 dias após chegar no país. O genótipo circulante de CHIKV na Europa é o ECSA (WAHID *et al.*, 2017).

Nas Américas, o primeiro caso autóctone de CHIKV foi registrado em 2013 na ilha de São Martinho (Caribe), espalhando-se para outros países do Caribe, América do Norte, Central e Sul (TSETSARKIN *et al.*, 2016; WAHID *et al.*, 2017). O genótipo associado a esses surtos é o Asiático com possível introdução via viajante do sudeste da Ásia ou Oceania, ou por mosquito infectado transportado em algum voo (TSETSARKIN *et al.*, 2016). O Brasil teve a introdução de dois genótipos de CHIKV, o Asiático e o ECSA, sendo este último com atual circulação. O primeiro caso autóctone confirmado foi em Oiapoque/Amapá em 2014 pelo Asiático e, posteriormente, outros casos também foram confirmados em Feira de Santana/Bahia pelo ECSA advindo de Angola (NUNES *et al.*, 2015; TSETSARKIN *et al.*, 2016). Entre 2016 e 2019, 372 246 casos confirmados de CHIKF e 542 óbitos foram registrados no Brasil (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2017; 2018; 2019 e 2020) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Casos de febre chikungunya no Brasil entre 2016 e 2019.

	2016	2017	2018	2019
Casos prováveis	277 882	185 593	87 687	132 205
Taxa de Incidência	133	90,1	42,1	62,9
Casos confirmados	151 318 (55,7%)	151 966 (81,8%)	68 962 (78,6%)	NI
Óbitos confirmados	216	192	42	92
Região com maior taxa de incidência	Nordeste (415,7)	Nordeste (249,7)	Centro-Oeste (86,2)	Sudeste (104,6)

Taxa de incidência = número de casos a cada 100 mil habitantes/ NI – Dados não informados (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2017, 2018; 2019 e 2020)

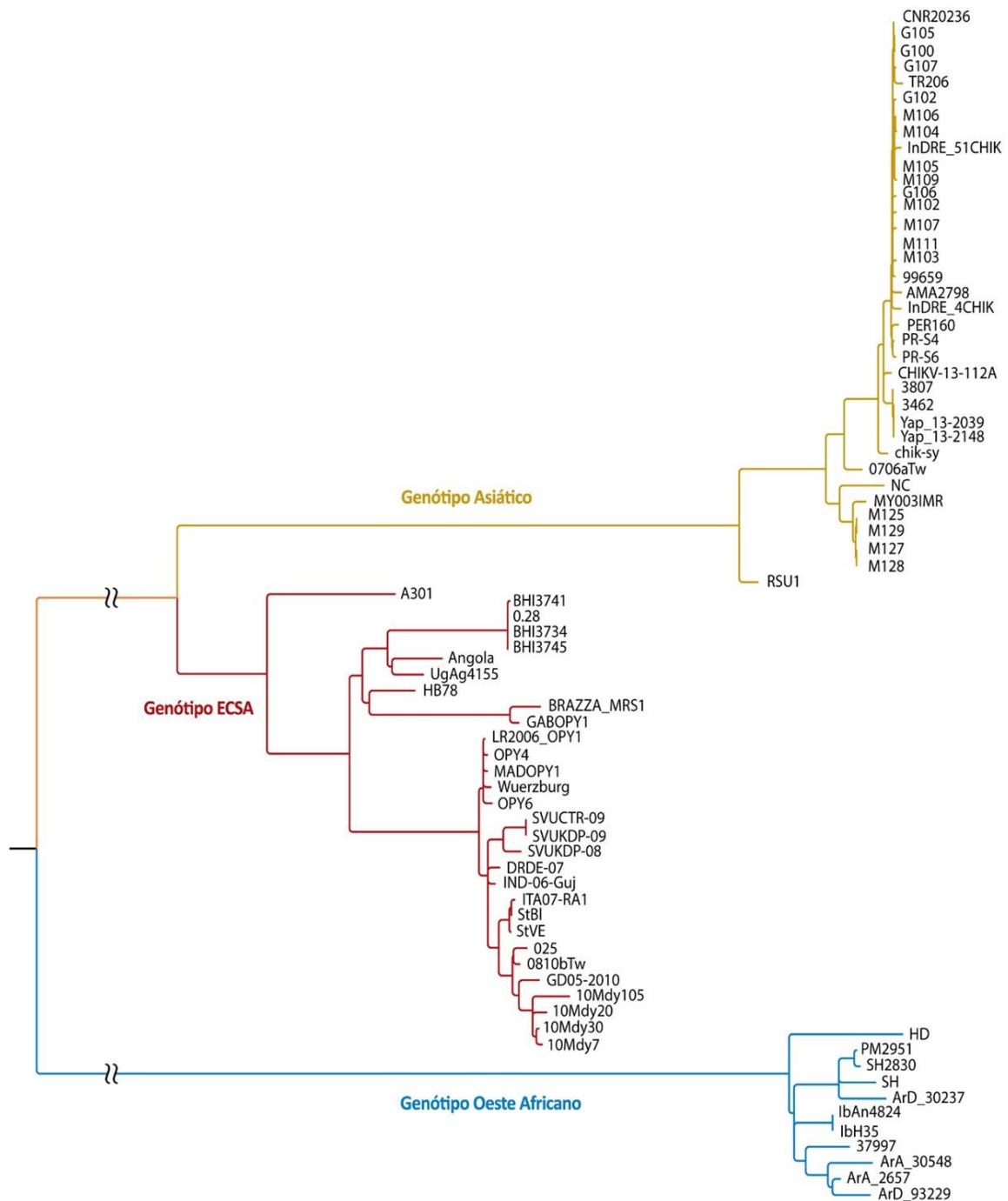


Figura 4. Árvore filogenética baseada em sequências completas de CHIKV. Genótipo Asiático em amarelo, Leste/Centro/Sul-Africano (ECSA) em vermelho e o Oeste Africano em azul. (Adaptado de VIGNUZZI E HIGGS, 2017)

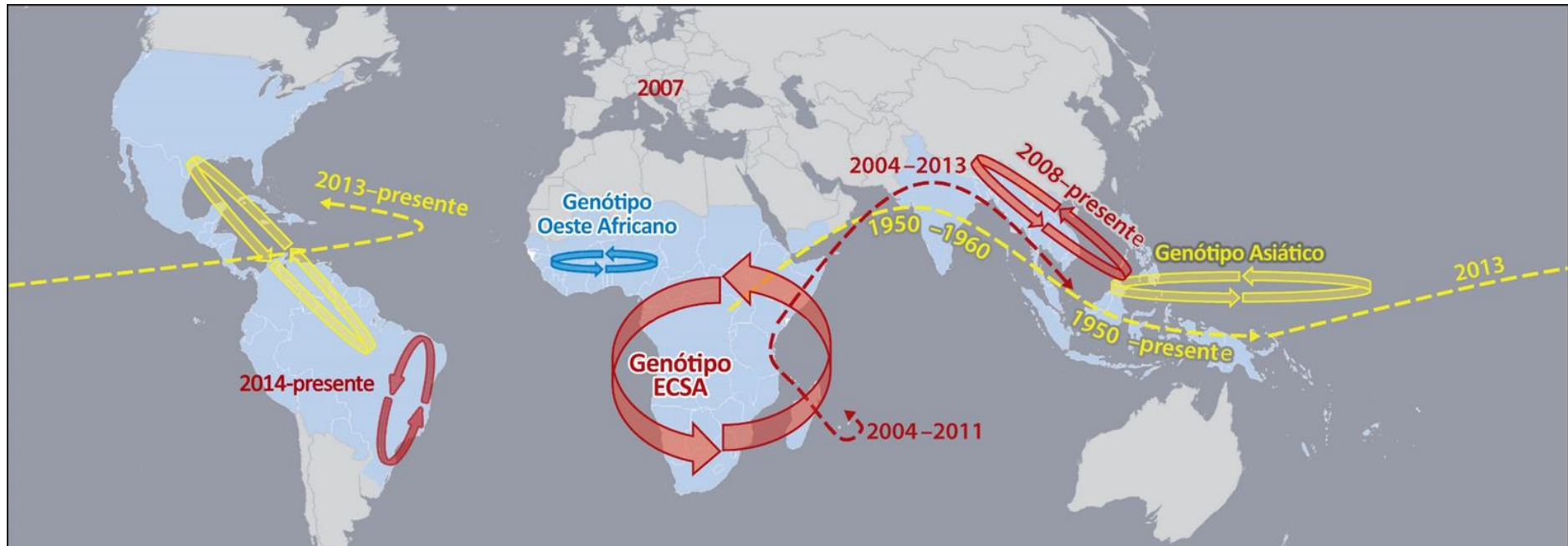


Figura 5. Distribuição mundial do vírus chikungunya. Os países com transmissão local em andamento estão sombreados em azul. Genótipo Asiático em amarelo, Leste/Centro/Sul-Africano (ECSA) em vermelho e o Oeste Africano em azul. (Adaptado de VIGNUZZI E HIGGS, 2017)

Os principais vetores de CHIKV são os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O principal vetor para a transmissão de CHIKV é o *A. aegypti*, porém, em 2006, o *A. albopictus* foi identificado como um segundo grande vetor do vírus tanto em lugares onde *A. aegypti* é considerado raro e em locais onde ambas as espécies de mosquito são encontradas (THIBERVILLE *et al.*, 2013). Este importante papel de *A. albopictus* como vetor foi relacionado à substituição do aminoácido alanina por valina na posição 226 da glicoproteína E1 de CHIKV (E1-A226V) durante a epidemia em La Reunion e, posteriormente, identificada em isolados de surtos na Índia (THIBERVILLE *et al.*, 2013; PRESTI *et al.*, 2016).

Na África, o CHIKV apresenta dois ciclos: o ciclo enzoótico selvagem e o urbano (**Figura 6**). O ciclo enzoótico envolve primatas não humanos e possivelmente outros vertebrados (roedores e bovinos) como reservatórios e vários mosquitos do gênero *Aedes* (exemplos: *A. furcifer*, *A. fulgens*, *A. luteocephalus*) como vetores (CAGLIOTI *et al.*, 2013; TSETSARKIN *et al.*, 2016; PETITDEMANGE *et al.*, 2006; PRESTI *et al.*, 2014). Esporadicamente, pessoas que vivem próximas às matas podem ser infectadas, possivelmente através da picada do *A. furcifer*. No ciclo urbano os mosquitos *A. aegypti* e *A. albopictus* transmitem CHIKV entre os humanos. Não foi demonstrada ainda a ocorrência do ciclo enzoótico de CHIKV na Ásia e na América (CAGLIOTI *et al.*, 2013; TSETSARKIN *et al.*, 2016; WEAVER *et al.*, 2012).

Dentro do vetor, o CHIKV se multiplica em células epiteliais do mesentério. A progênie é liberada através da membrana basal para alcançar a hemolinfa e, assim, chegar nas glândulas salivares, local onde estabelece infecção persistente. Ao picar um hospedeiro, o mosquito transmite o vírus (CERVANTES-ACOSTA E SANJUÁN-VERGARA, 2016). Estudos mostraram que a mutação E1-A226V em CHIKV melhorou a infecciosidade no intestino médio de *A. albopictus* (TSETSARKIN *et al.*, 2007; TSETSARKIN *et al.*, 2009). As fêmeas dos *Aedes* estão envolvidas na transmissão, sendo demonstrada a transmissão vertical, contribuindo para maior permanência do vírus no ambiente (COFFEY *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018).

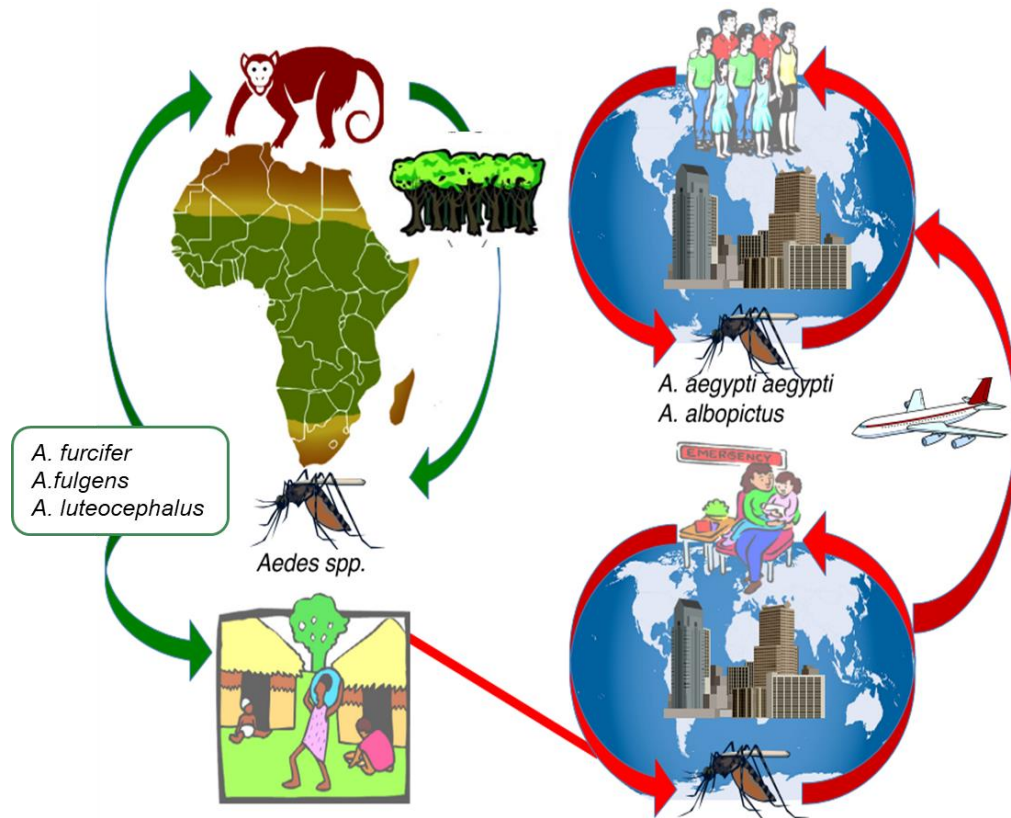


Figura 6. Ciclos de transmissão enzoótico (esquerda) e urbano (direita) de CHIKV na África. (Fonte: TSETSARKIN *et al.*, 2016)

1.1.4 Aspectos clínicos e Tratamento

Após transmissão pela picada do mosquito, o CHIKV se multiplica em células permissivas da pele, entre elas os fibroblastos, células endoteliais e macrófagos e se dissemina para o fígado, músculos, articulações e, em casos raros, o cérebro através do sangue (PETITDEMANGE *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2017; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; SILVA e DERMODY *et al.*, 2017). O período de incubação varia em média de 2 a 7 dias (**Figura 7**). Apenas 15% dos indivíduos infectados são assintomáticos (BURT *et al.*, 2017). A fase aguda da doença é caracterizada por aparecimento abrupto de febre de 39 °C (92% dos acometidos) seguido de dor de cabeça (62%), fotofobia e erupção cutânea petequial ou erupção maculopapular (50%), dor nas costas (67%), calafrios, mialgia, náuseas e vômitos (15 a 47%) (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; SUHRBIER *et al.*, 2012; THIBERVILLE *et al.*, 2013). O principal sintoma é a dor articular (87- 98%) e é frequentemente incapacitante e atinge tornozelos, pulsos, dedos, mas também podem

comprometer grandes articulações, como joelhos e cotovelos. A dor na articulação é geralmente poliarticular, bilateral e simétrica (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; SILVA *et al.*, 2018; THIBERVILLE *et al.*, 2013).

A infecção aguda pelo CHIKV induz respostas imunes inatas robustas, levando à elevação de interferon tipo I (IFN) e de numerosas quimiocinas pró-inflamatórias, citocinas e fatores de crescimento. Esta elevação nos níveis de IFN ocorre no pico de viremia, que pode chegar a 10^9 partículas virais/mL (PETITDEMANGE *et al.*, 2006; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; SILVA e DERMODY *et al.*, 2017).

Os sintomas da doença aguda por CHIKV são causados por danos celulares diretos e inflamação local, mas as contribuições específicas da replicação viral e da resposta imune do hospedeiro à infecção pelo CHIKV ainda não foram completamente elucidadas (SILVA e DERMODY *et al.*, 2017).

No geral, a infecção aguda dura entre 1 a 3 semanas, mas em cerca de 60% dos casos a artralgia/artrite pode persistir por meses ou anos. Essa fase crônica geralmente é caracterizada por flutuações no aparecimento dos sintomas e intensidade com significativa perda de movimento, astenia, alteração de humor (PETITDEMANGE *et al.*, 2006; SCHWARTZ e ALBERT, 2010; SCHILTE *et al.*, 2013; ABDELNABI *et al.* 2017). Assim, a CHIKV afeta a qualidade de vida das pessoas, tendo alto impacto social e econômico que é subestimado. A população em idade economicamente ativa é a mais afetada, pois deve faltar ao trabalho ou tem a capacidade de produzir diminuída (REZZA e WEAVER *et al.*, 2019). Schilte *et al.* (2013) estimaram que 34 milhões de euros por ano foram gastos com a artralgia, considerando custos médicos e faltas ao trabalho, em La Reunion entre 2005-2006. A demonstração de RNA e proteínas de CHIKV em macrófagos no líquido sinovial de pacientes durante a fase crônica sugere que são uma fonte persistente do vírus e contribuem para a artropatia induzida pelo vírus (SILVA *et al.*, 2018; SILVA e DERMODY *et al.*, 2017).

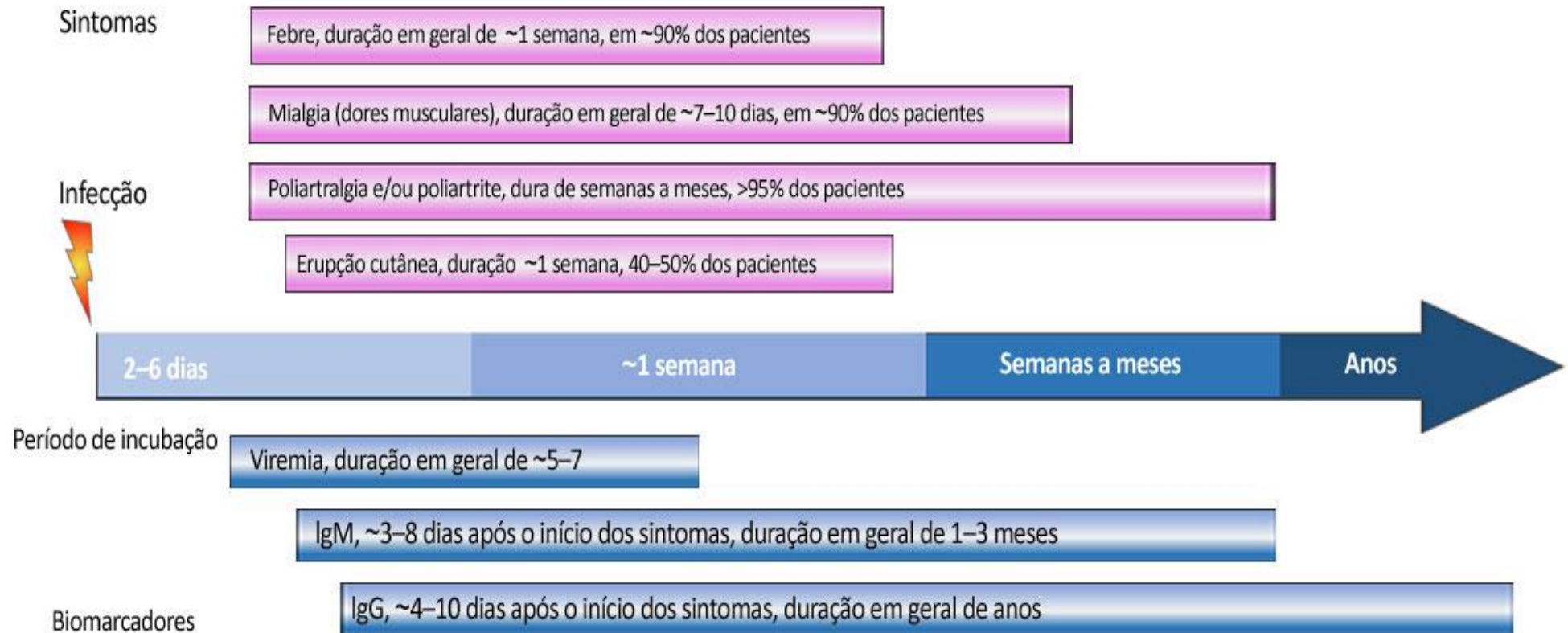


Figura 7. Curso da infecção de CHIKV em adultos. Nas caixas são mostrados os sintomas e biomarcadores com suas respectivas durações. (Adaptado de SUHRBIER *et al.*, 2012)

A morte por infecção por CHIKV ocorre em 1 a cada 1.000 indivíduos, entretanto, sintomas mais atípicos e graves são observados em infecções por CHIKV, como hemorragia, hepatite, miocardite, distúrbios neurológicos (como a síndrome de Guillain-Barré), doença ocular na fase crônica. Os sintomas atípicos são mais prevalentes entre grupos vulneráveis, incluindo neonatos, idosos acima de 65 anos e imunossuprimidos. Muitas das infecções em neonatos são resultantes da transmissão de mãe para filho durante o parto, como foi documentado na epidemia de La Reunion (2004-2005) (BURT *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018; SILVA e DERMODY *et al.*, 2017).

O diagnóstico específico pode ser conduzido basicamente de três maneiras: isolamento do vírus, detecção de RNA e sorologia. O isolamento viral pode ser feito de soro coletado de até 7 dias após o início dos sintomas e inoculado em linhagens de células de mamíferos ou de mosquito. A confirmação pode ser feita por técnicas moleculares como a reação de transcrição reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia (RT-PCR ou qRT-PCR) (SILVA *et al.*, 2018). Em fases tardias da infecção, técnicas sorológicas como ELISA e soroneutralização podem ser utilizadas. A imunoglobulina (Ig) M pode ser detectada entre 3-7 dias após o início dos sintomas e IgG entre 4-10 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2018).

Atualmente, não há antivirais ou vacinas disponíveis para tratar ou prevenir a infecção por CHIKV. Os pacientes infectados recebem analgésicos, anti-inflamatórios e paracetamol para reduzir os sintomas (ABDELNABI *et al.*, 2017; ABDELNABI *et al.*, 2015; MURANG *et al.*, 2016). Durante o surto em La Reunion, cloroquina foi utilizada como tratamento por demonstrar *in vitro* inibição de CHIKV, mas não teve efeitos sobre os pacientes (BURT *et al.*, 2017). Tem sido verificado o potencial de vários compostos contra CHIKV *in vitro* que podem atuar diretamente sobre o ciclo de multiplicação ou sobre componentes celulares. Compostos que atuam sobre proteínas ou outros componentes celulares são mais promissores, pois diminuem as chances de variantes resistentes e com potencial de atuar sobre muitas espécies virais ao mesmo tempo (ABDELNABI *et al.*, 2017; MERCORELLI *et al.*, 2018). Alguns exemplos para CHIKV estão listados na **Tabela 2**. Candidatas à vacina de CHIKV estão sendo investigadas, muitas em estudos pré-clínicos e clínicos. No entanto, embora a vacinação seja o meio mais promissor para proteger as pessoas em regiões endêmicas, o difícil equilíbrio entre a segurança da vacina, a imunogenicidade e as restrições econômicas de

produção podem impedir o desenvolvimento e o licenciamento de vacinas contra CHIKV (SILVA e DERMODY *et al.*, 2017).

Tabela 2. Compostos com atividade antiviral contra vírus chikungunya.

Composto antiviral	Mecanismo de ação no hospedeiro	Resultados <i>in vitro</i>
Decanoyl-RVCR-CMK	Inibidor de Furina I	Inibição da morfogênese Inibição da infecção por CHIKV em células satélites musculares humanas
Prostratina e TPA	Ativam a cinase C e inibem outras cinases envolvidas na apoptose	Redução do título de CHIKV em células HuH-7 e redução da apoptose
Briostatina	Modulação de cinase C	Inibição da replicação de CHIKV em células Vero
Berberina	Inibe a ativação de ERK	Redução do título de CHIKV em células BHK-21

(ABDELNABI *et al.*, 2015, 2017)

1.2 A interação vírus-hospedeiro e as vias de sinalização celular

Os vírus dependem da maquinaria da célula hospedeira para replicar seu genoma e gerar progênie. Para isto, os vírus manipulam várias vias celulares, tais como vias importantes em processos de sobrevivência e crescimento celular, para garantir sua multiplicação e disseminação e, ao mesmo tempo, modulam outras vias relacionadas à resposta imune (BONJARDIM, 2017; MATTOSCIIO *et al.*, 2013; PAUL e BARTENSCHLAGER, 2013).

1.2.1 Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPK)

As proteínas cinases (PK-*protein kinase*) são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosfato de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para resíduos treonina, serina (cinase específica para Ser/Thr) ou de tirosina (cinase específica para Tyr). Constituem a maior família de proteínas em eucariotos e são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais de proteínas até o controle transcricional (SILVA *et al.*, 2009).

As vias de transdução de sinal de PK ativadas por mitógenos (MAPK) estão entre os mecanismos mais difundidos de regulação nas células eucarióticas em resposta a diferentes estímulos. Entre os processos regulados estão crescimento e diferenciação celular, resposta ao estresse, sobrevivência e apoptose (KRISHNA e NARANG, 2008; MORRISON, 2012; PLOTNIKOV *et al.*, 2011).

Todas as cascatas da MAPK têm a arquitetura evolutiva conservada em três níveis, onde as cinases se fosforilam sequencialmente e se ativam mutuamente, enquanto as fosfatases desfosforilam essas cinases (KRISHNA e NARANG, 2008; RAUCH *et al.*, 2016). As MAPK cinase cinase (MAP3Ks) são cinases serina-treonina ativadas através de fosforilação e/ou interação com GTPases em resposta a estímulos extracelulares. Quando ativadas, as MAP3K fosforilam e ativam uma MAPK cinase (MAP2K). As MAP2K, por sua vez, depois de ativadas pelas MAP3K, são responsáveis pela ativação das MAPKs. Após sua ativação, as MAPKs fosforilam seus substratos em resíduos de serina ou treonina quando estes estão seguidos por resíduos de prolina (KRISHNA e NARANG, 2008; MORRISON, 2012). As MAPKs podem circular entre o citoplasma e o núcleo. No núcleo podem fosforilar e ativar vários fatores de transcrição que induzem um conjunto de genes, enquanto que no citoplasma podem ativar proteínas envolvidas no metabolismo, adesão celular e organização do citoesqueleto (KATZ *et al.*, 2009).

São três famílias de MAPK principais de mamíferos: a Cinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2, também conhecida como p42/44 MAPK), Janus cinase (JNK,

também conhecida como proteína ativada por stress cinase-1, SAPK1) e p38 MAP cinase (também conhecida como SAPK2/RK (KUMAR *et al.*, 2018).

1.2.1.1 Proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK)

A via de ERK foi a primeira entre as MAPK a ser identificada e é a mais compreendida. É ativada fortemente por fatores de crescimento, soro e ésteres de forbol. As duas principais isoformas, ERK1 e ERK2, possuem 83% de identidade de aminoácidos e são expressas em todos os tecidos (KRISHNA e NARANG, 2008). A via exerce importante papel na sinalização de variados agentes extracelulares e opera via diferentes receptores. A estimulação de ERK desempenha papel importante na indução de vários processos celulares como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e, sob certas condições, também na sobrevivência celular, migração, apoptose, determinação morfológica e transformação oncogênica (LIU *et al.*, 2018; PLOTNIKOV *et al.*, 2011; SHAUL e SEGER, 2007).

A sinalização por esta via é iniciada pela ativação da proteína Ras, uma pequena GTPase presente na membrana plasmática. A Ras ativada recruta e ativa a cinase Raf (MAP3K). A Raf fosforila e ativa MEK 1/2 (MAP2K) que direta e exclusivamente fosforilam ERK 1/2 (MAPK) (PLOTNIKOV *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2018) (**Figura 8**).

Após a ativação, as ERKs translocam para o núcleo e fosforilam uma variedade de substratos tais como a proteína cinase ribossômica S6 de 90 kDa chamada p90RSK, a fosfolipase A2 citosólica ou vários fatores de transcrição incluindo c-Myc, Elk-1, NF- κ B, Ets-2 e possivelmente proteínas STAT (KUMAR *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2018; WADA *et al.*, 2004).

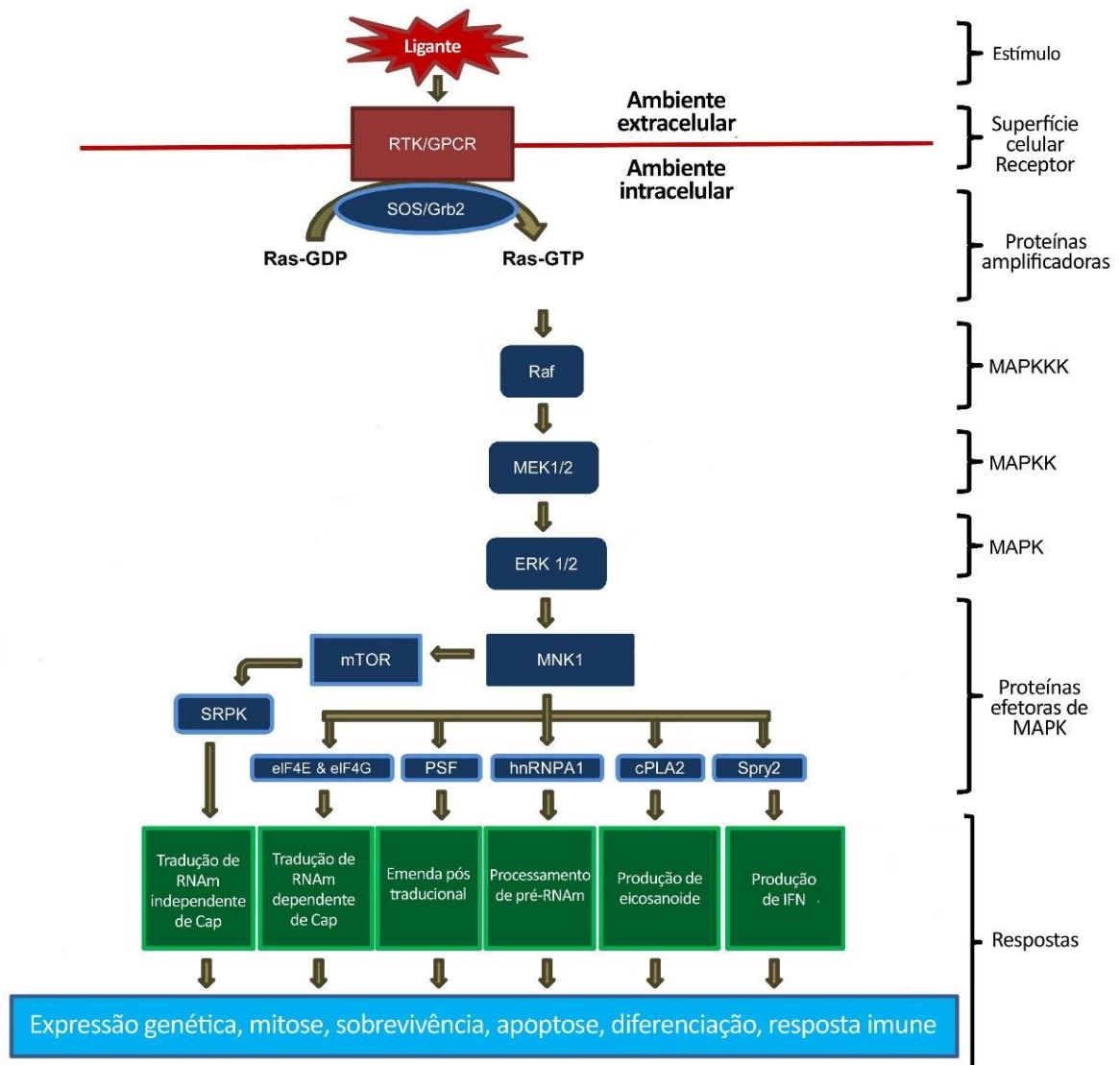


Figura 8. Representação esquemática da via de MEK/ERK. Diferentes estímulos externos são captados por receptores celulares associados à membrana e levam a ativação da proteína Ras. Uma vez ativada, a Ras fosforila a MAP3K (principalmente Raf). Essa MAP3K, por sua vez, ativa MAP2Ks (MEK1/2), o que culmina na ativação das MAPKs ERK1/2. ERK1/2, quando ativadas, atuam tanto no núcleo celular, como no citoplasma. (Adaptado de KUMAR *et al.*, 2018)

1.2.2 Inflamassoma NLRP3

Uma das estratégias do sistema imune inato é diferenciar moléculas, próprias ou não, através de sensores chamados de receptores de reconhecimento de padrões

(PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptors*) que detectam padrões associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês, *Damage associated molecular pattern*). Os PRRs são expressos em células do sistema imune, tais como macrófagos, monócitos ou células epiteliais, e podem estar presentes na membrana celular ou no citosol. Dentre esses sensores intracelulares, estão os receptores similares ao domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NLRs, do inglês *NOD-like Receptors*). As proteínas desta família são compostas de um domínio central de ligação a nucleotídeo (NACHT), a maioria possui uma região C- terminal rica em repetições de leucina (LRR) e a porção N- terminal pode conter o domínio CARD ou pirina (PYD) (**Figura 9 A**). Alguns membros da família de NLRs, como NLRP1 e NLRP3, formam complexos multiproteicos denominados de inflamassomas. Estes são compostos basicamente de um sensor, adaptador e a pro-caspase 1. Após reconhecimento de PAMPs ou DAMPs, o sensor torna-se ativo e recruta a proteína adaptadora conhecida como ASC (do inglês, *apoptosis-associated speck-like containing a CARD domain*). O domínio CARD de ASC interage com o CARD presente na pro-caspase 1, que se torna ativa e inicia o processamento e liberação de IL-1 β e IL-18 (SCHRODER e TSCHOPP, 2010; CHEN e ICHINOHE, 2015; SHRIVASTAVA *et al.*, 2016; BROZ e DIXIT, 2016; SHARMA e KANNEGANTI, 2016; AWAD *et al.*, 2017).

A ativação do inflamassoma induz à morte celular programada denominada de piroptose. Neste processo, há formação de poros que alteram a permeabilidade e consequente ruptura da membrana celular. O conteúdo liberado contém citocinas e outros elementos inflamatórios. A piroptose é mediada pela proteína gasdermina D (GSDMD) após ser clivada por caspase-1 (SHRIVASTAVA *et al.*, 2016; BROZ e DIXIT, 2016; SHARMA e KANNEGANTI, 2016; SWANSON *et al.*, 2019).

O inflamassoma NLRP3 (também conhecido como criopirina) é o mais estudado e pode ser ativado por vários estímulos tais como ácidos nucleicos, sílica, amianto, ATP extracelular, amiloide- β e cristais de ácido úrico e por patógenos como vírus, fungos e bactérias (SHARMA e KANNEGANTI, 2016; BROZ e DIXIT, 2016; MANGAN *et al.*, 2018). O nível basal de NLRP3 é baixo nas células. O aumento desse nível é depende da indução de outros receptores, como por exemplo receptores do tipo Toll e MyD88, pois reconhecem PAMPs ou DAMPs e ativam a transcrição de NLRP3 e pro-IL-1 β e pro-IL-18. Esta etapa é comumente chamada de *priming* ou sinal 1 (SHRIVASTAVA *et*

al., 2016; MANGAN *et al.*, 2018; ZAHID *et al.*, 2019). A proteína NLRP3 é ativada após a interação do seu domínio NACHT com ATP (**Figura 9 C**) (GORKA *et al.*, 2019).

São descritos três principais mecanismos para a ativação do inflamassoma NLRP3 (**Figura 9 B**). No primeiro, ATP extracelular pode induzir a formação de poros pannexina-1, que permitem a entrada de PAMPs ou DAMPs, e efluxo de K^+ através do canal iônico P2X7. No segundo, os agregados de material particulado e cristalino, tais como sílica e amianto, que são internalizados via fagocitose provocam a liberação do conteúdo lisossomal na célula. As catepsinas-B, proteases presentes nos lisossomos, ativam NLRP3. O terceiro mecanismo envolve a ativação de NLRP3 por espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCHRODER e TSCHOPP, 2010; SHRIVASTAVA *et al.*, 2016; MANGAN *et al.*, 2018).

Apesar de importante papel na defesa do organismo, o inflamassoma NLRP3 está relacionado a graves desordens inflamatórias como a Síndrome Periódica Associada à Criopirina (CAPS - *Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome*), doença de Alzheimer e diabetes tipo 2 (KELLEY *et al.*, 2019).

1.2.3 CHIKV e as vias de sinalização de ERK e Inflamassoma NLRP3

A sinalização de MAPK no contexto de infecções por alfavírus é pouco explorada (VARGHESE *et al.*, 2016). Tem sido demonstrada ativação de ERK em astrócitos de camundongos infectados pelo CHIKV (DAS *et al.*, 2015). VARGHESE *et al.* (2016) demonstraram que a substância berberina reduzia a ativação das vias de ERK, p38 e JNK em células infectadas com CHIKV, além do título viral. LUNDBERG *et al.* (2018) verificaram que o inibidor Sorafenib reduz a produção de proteínas virais em VEEV, SINV e CHIKV. Sorafenib bloqueia cinases tirosinas e Rafs, sendo demonstrada a inibição da via de MEK/ERK.

Quanto ao inflamassoma NLRP3, Chen *et al.* (2017) detectaram aumento na expressão de NLRP3, IL-1 β e IL-18 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) de pacientes infectados e em modelo murino de inflamação induzida por CHIKV. Estudo com fibroblastos dérmicos humanos infectados com CHIKV, apresentaram maior expressão de RNAm de caspase-1 e IL-1 β (EKCHARIYAWAT *et al.*, 2015). Além disso, nesse estudo foi realizada inibição da expressão de caspase-1 por silenciamento mediado por RNAi e observado aumento

significativo no número de partículas liberadas. Desta forma, há evidências do importante papel dos inflamassomas no ciclo CHIKV.

1.3 Os inibidores farmacológicos

O processo de descoberta e licenciamento de novos fármacos é demorado (8 a 12 anos) e com altos custos (em torno de 2 bilhões de dólares) (SCHOR e EINAV, 2017). É estimado que apenas 5% dos compostos que estão em alguma fase de teste clínico sejam aprovados (POLLASTRI e CAMPBELL, 2011). Tratando-se de antivirais o cenário é mais preocupante. Apenas 12 novos fármacos foram aprovados pelo *Food and Drug Administration of USA* (FDA) de 2012 a 2017 e somente para doenças relacionadas ao vírus da hepatite C e o vírus da imunodeficiência humana (HIV-1). Uma estratégia que reduz o tempo e os custos para descoberta de novos antivirais é o reposicionamento de fármacos. Nesta abordagem, é investigado possíveis efeitos antivirais de fármacos já licenciados e principalmente focando em fármacos que possuem as proteínas do hospedeiro como alvo, dada as vantagens já citadas anteriormente (ABDELNABI *et al.*, 2017; MERCORELLI *et al.*, 2018).

As cinases tornaram-se uma das superclasses de proteínas mais pesquisadas como alvo de fármacos, principalmente para o tratamento de câncer (WU *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2009). Desde o primeiro inibidor de cinase, o Imatinibe, ser aprovado pela *Food and Drug Administration of USA* (FDA) em 2001 para tratamento de leucemia mieloide crônica, outros 52 inibidores foram também aprovados para uso terapêutico em humanos. De 518 cinases conhecidas, somente 20 são alvos de inibidores aprovados pelo FDA. Entre eles estão os inibidores de MEK 1/2: Selumetinib, Binimetinib e Trametinib (ROSKOSKI, 2020; FDA, 2020).

Selumetinib (AZD6244 ou ARRY-142886) é um potente inibidor, seletivo, não competitivo com ATP, possuindo IC₅₀ de 14 nM contra MEK1 purificado (YEH *et al.*, 2007). Atualmente ensaios clínicos de fase 3 estão sendo conduzidos para tratamento de câncer de tireoide, câncer de pulmão de células não pequenas e glioma de baixo grau (ClinicalTrial.gov, 2020; JÄNNE *et al.*, 2017).

Binimetinib (MEK162, ARRY-16 ou ARRY-438162) também é inibidor seletivo das cinases MEK 1/2, não competitivo com ATP com IC₅₀ de 12 nM em ensaios de cinase

in vitro (WOODFIELD *et al.*, 2016). Atualmente é utilizado para tratamento de melanoma não ressecável ou metastático combinado com outro fármaco, o encorafenib (DUMMER *et al.*, 2018; SHIRLEY, 2018). Ensaios clínicos de fase 3 estão sendo conduzidos para tratamento de câncer de colorretal e ovariano (ClinicalTrial.gov, 2020; KOPETZ *et al.*, 2019; CUTSEM *et al.*, 2019).

O Trametinib (GSK1120212 ou JTP-74057) também é um potente inibidor, seletivo, não competitivo com ATP, possuindo IC₅₀ de 0.7-14.9 nmol/L para MEK1 e 2 respectivamente. Primeiramente foi aprovado pelo FDA para tratamento de melanoma não ressecável e, posteriormente, em combinação com Dabrafenib. Esta mesma combinação é utilizada para tratamento de câncer de pulmão de células não pequenas (ZEISER *et al.*, 2018; LIAN *et al.*, 2019).

Dada a importância das cinases na regulação de vários processos celulares, o Grupo de Transdução de Sinal (GTS) do Laboratório de Vírus da UFMG tem investigado o papel da via de MEK/ERK no ciclo de multiplicação de orthopoxvírus (VACV e CPXV) (ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006) e dos flavivírus (ZIKV, DENV, YFV e SLEV) (ALBARNAZ *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2020; RIVERO, 2019).

Existem poucos inibidores farmacológicos licenciados para uso em humanos que atuem sobre o inflamassoma NLRP3. Apenas três fármacos que atuam no bloqueio de IL-1 β foram aprovados pelo FDA: anakinumab, anakinra e rilonacept. Sendo estes utilizados para tratamento principalmente de CAPS. Porém, recentemente novos fármacos estão sendo desenvolvidos com potencial ação terapêutica. Alguns atuam indiretamente, como a glibenclamida, atualmente utilizada para tratamento de diabetes tipo 2, que em estudo *in vitro* mostrou reduzir a ativação do inflamassoma NLRP3 por inibir canais K⁺ sensíveis à ATP. Entre os que atuam diretamente sobre a proteína NLRP3 estão o MCC950, considerado o mais potente, MNS e Tranilast (ZAHID *et al.*, 2019; SWANSON *et al.*, 2019).

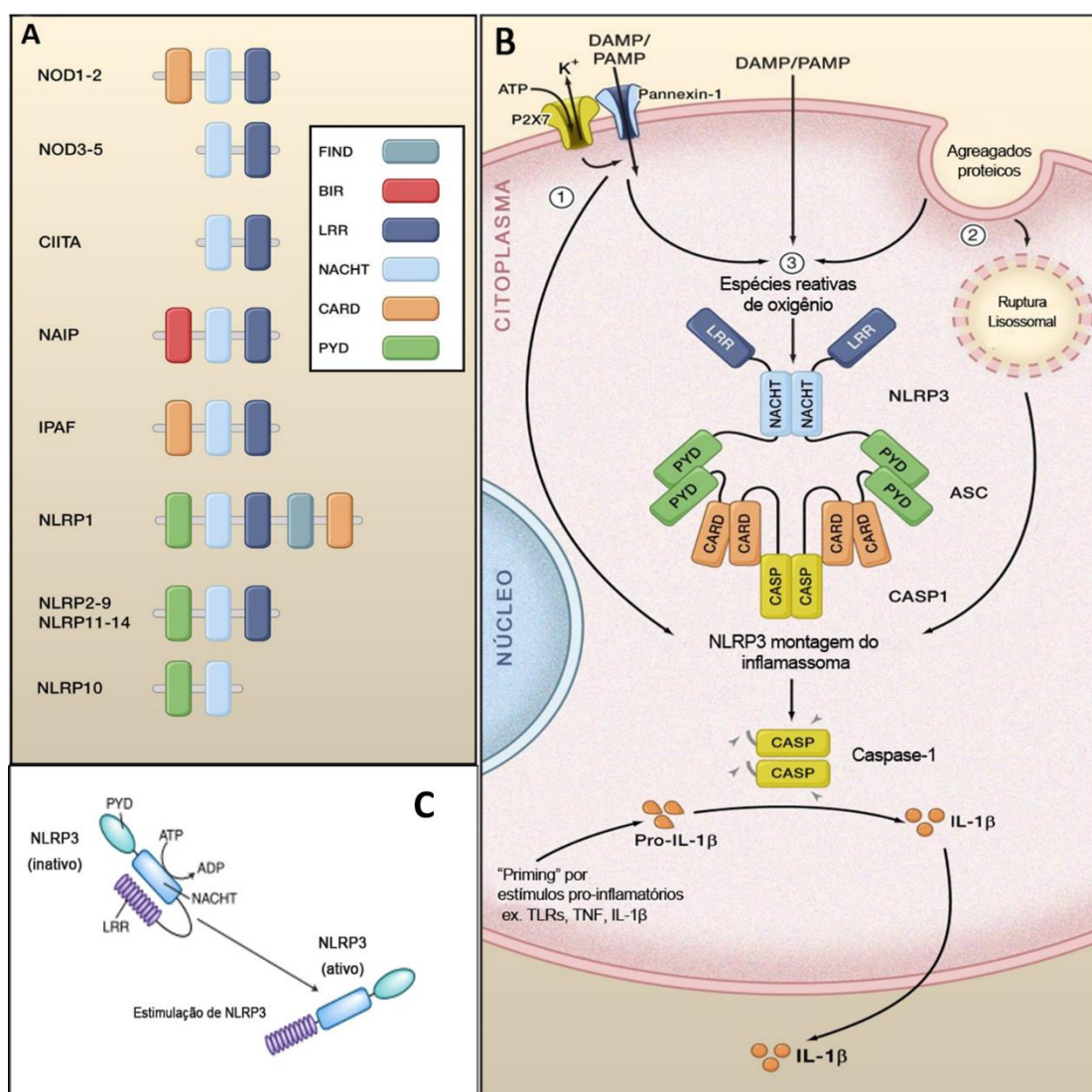


Figura 9. Componentes do Inflamassoma NLRP3.

(A) Domínios presentes na estrutura proteica dos membros da família de NLR.

(B) Três modelos principais para a ativação do inflamassoma NLRP3 são mostrados: 1 - ATP extracelular aciona a formação de poros dependente de P2X7 pelo hemicanal de pannexin-1, permitindo que os agonistas extracelulares de NLRP3 entrem no citosol e interajam diretamente o NLRP3. 2 - Agregados proteicos são absorvidos e suas características físicas levam à ruptura lisossômica. O inflamassoma NLRP3 detecta o conteúdo lisossômico no citoplasma, por exemplo, através do processamento dependente de catepsina-B ativará diretamente NLRP3. 3 - Todos os padrões moleculares associados a perigos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo ATP e material particulado e cristalinos, desencadeiam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), por sua vez, EROs desencadeiam a formação do complexo inflamassoma NLRP3. As caspases-1 se tornam ativas após interação com ASC e iniciam a maturação e e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-18.

(C) Alteração conformacional de NLRP3 após ligação de ATP no domínio NACHT.
(Adaptado de SCHRODER e TSCHOPP, 2010; GORKA *et al*, 2019)

2 JUSTIFICATIVA

O vírus chikungunya é transmitido por mosquitos *Aedes aegypti* e *A. albopictus* e é a causa de periódicas epidemias caracterizada por febre, artralgia e erupção maculopapular em todo mundo. Embora uma infecção por CHIKV tenha taxa de mortalidade menor quando comparado com outras arboviroses, 60% dos infectados apresentam sintomas crônicos, como poliartrites incapacitantes que podem durar meses ou anos, afetando a qualidade de vida dessas pessoas e, conseqüentemente, causando impactos sociais e econômicos.

A ampla distribuição dos vetores, principalmente, faz com que a CHIKV seja considerada uma ameaça real à saúde em áreas tropicais e temperadas. Apesar disso, não há atualmente nenhuma vacina aprovada ou tratamento antiviral disponível. Assim, tornam-se necessários estudos que visam avaliar o potencial de substâncias antivirais contra CHIKV.

O Grupo de Transdução de Sinal (GTS) do Laboratório de Vírus da UFMG vem avaliando a importância de vias de sinalização como de MEK/ERK no ciclo de multiplicação de orthopoxvírus e dos flavivírus. E os resultados têm mostrado o potencial antiviral de inibidores farmacológicos como Selumetinib e Trametinib contra ZIKV, DENV, YFV e SLEV. A possibilidade de tratamento dessas importantes arboviroses com estes fármacos licenciados para uso em humanos é vantajosa, pois reduz o tempo e custos do processo de descoberta de novos antivirais. Além disto, fármacos que atuam sobre as proteínas do hospedeiro diminuem as chances de variantes resistentes e possuem o potencial de afetarem o ciclo de multiplicação de várias espécies virais ao mesmo tempo.

Diante dessas experiências do grupo GTS e os poucos trabalhos que investigam a importância da via de MEK/ERK na infecção por CHIKV, este trabalho pode contribuir ao entendimento de sua biologia, além de prospectar novas possibilidades medicamentosas contra CHIKV. Outro aspecto a se considerar, é a análise de componentes da resposta inata do hospedeiro (inflamassoma) após o tratamento com potenciais antivirais.

3 OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antiviral de inibidores farmacológicos (IFs) da via MEK/ERK e a indução da proteína NLRP3 durante a infecção com o chikungunya vírus *in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o eventual efeito de Trametinib, Selumetinib e Binimetinib, inibidores de MEK/ERK, na multiplicação de CHIKV *in vitro*.
- Avaliar as etapas da multiplicação de CHIKV que possam ser eventualmente afetadas pela inibição de MEK/ERK, seja pela adição ou remoção dos inibidores em diferentes intervalos da infecção.
- Avaliar se ocorre a indução de NLRP3 e fosforilação de ERK1/2 durante a infecção por CHIKV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares

4.1.1 Células Vero

As células Vero são fibroblastos epiteliais de linhagem contínua derivadas de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*). As células foram mantidas em meio mínimo de *Eagle* (MEM), suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e com antibióticos (estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI/mL e anfotericina B (1 mg /mL) a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%.

4.1.2 Macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c

Um camundongo macho da linhagem BALB/c foi utilizado para obtenção de macrófagos intraperitoneais. O camundongo foi obtido no Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG com 4 semanas de idade e mantido no Biotério do Departamento de Microbiologia em ambiente com temperatura controlada, com água e ração em livre demanda. O uso de camundongos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA 07/2019). Foi realizado tratamento antiparasitário do animal com Albendazol adicionado a água (1 mL a cada 200 mL de água) segundo recomendação do Procedimento Operacional Padrão - Manipulação experimental de animais de laboratório do Departamento de Microbiologia. O protocolo para obtenção de macrófagos intraperitoneais foi conforme descrito por ZHANG *et al.* (2008) com modificações. Brevemente: foi realizada estimulação com a injeção 1 mL de tioglicolato a 3% no peritônio do animal já com 7 semanas. Após 4 dias, o animal foi anestesiado (100 mg/Kg de cloridrato de cetamina e 10 mg/Kg de cloridrato de xilazina) e eutanasiado por deslocamento cervical. Foi feito um lavado com meio mínimo essencial modificado por Dulbecco (DMEM) 0% de SFB suplementado com antibióticos (estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI/mL e 1 mg /mL de anfotericina B) gelado, que em seguida foi centrifugado (Sorvall - RT6000B) a 3500 rpm por 7 min a 4 °C e ressuspenso em DMEM 10% de SFB gelado. Foram obtidas ao total 3,9 x 10⁶ células, sendo contadas em câmara de Neubauer. Foram

implantadas 3×10^5 células por poço em placas de 24 poços e mantidas em estufa a 37°C , sob atmosfera de CO_2 a 5%.

4.1.3 Células Raw 264.7

Células Raw 264.7 são macrófagos originados de células de BALB/c transformadas pelo vírus da leucemia de Albelson (Taciak *et al.*, 2018). Estas células foram doadas gentilmente pela profa Dra Vivian Vasconcelos Costa (UFMG) e mantidas em DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos (estreptomicina 100 mg/mL, penicilina 100 UI/mL e anfotericina B 1 mg/mL) a 37°C , sob atmosfera de CO_2 a 5%. As células eram cultivadas até a passagem 20.

4.2 Vírus

Os ensaios foram realizados com CHIKV do genótipo ECSA cedido gentilmente pelo Dr. Mauricio L. Nogueira, do Laboratório de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

4.3 Inibidores Farmacológicos e Anticorpos

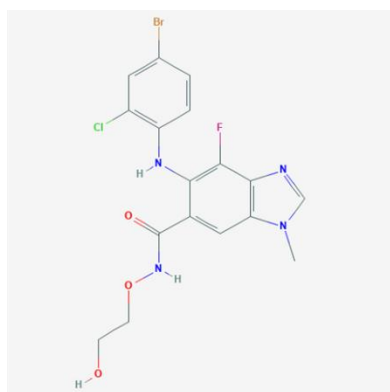
Os IFs foram adquiridos da Selleckchem, USA (**Tabela 3**) e suas estruturas químicas são mostradas na **Figura 10**. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-phospho p44/42(ERK1/2) (1:1000), anti-NLRP3 (1:1000) e anti- β -actina e o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, o anti-IgG de coelho (1:3000 para ERK1/2 e para NLRP3), obtidos da Cell Signalling e o anti-IgG de camundongo (1:3000) conjugado à peroxidase (Thermo Fisher).

Tabela 3. Informações gerais sobre os inibidores que foram utilizados no estudo. Dados coletados do PubChem e Selleckchem.

Inibidor Farmacológico	Alvo	IC ₅₀	Tratamento	Fase Clínica
Selumetinib N° de catálogo: S1008	MEK 1/2	14 nM/530 nM (Kd)	Melanoma, câncer de mama e pulmão	Fase 3 (JÄNNE et al., 2017)
Binimetinib N° de catálogo: S7007	MEK 1/2	12 nM	Melanoma	Fase 3 (KOPETZ et al., 2019; CUTSEM et al., 2019)
Trametinib N° de catálogo: S2673	MEK 1/2	0,92 nM/1,8 nM	Melanoma, câncer de tireoide	Fase 4 (ClinicalTrial.gov - NCT03340506/ NCT03975829/ NCT02645149)
MCC950 N° de catálogo: S7809	NLRP3	7,5 nM	-	-

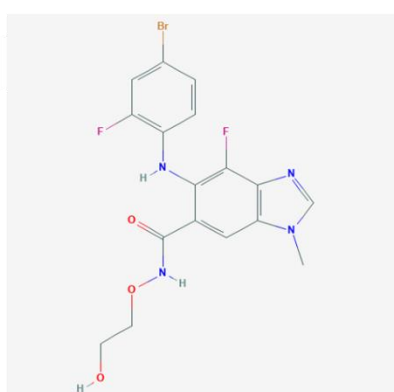
Kd: Constante de Dissociação de Equilíbrio

A



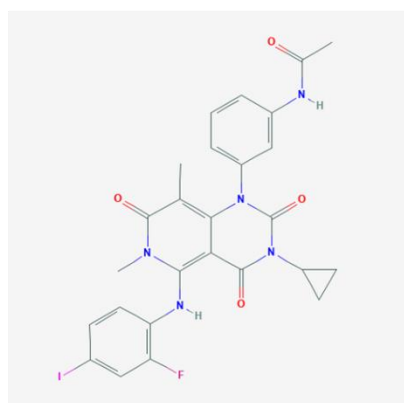
Selumetinib

B



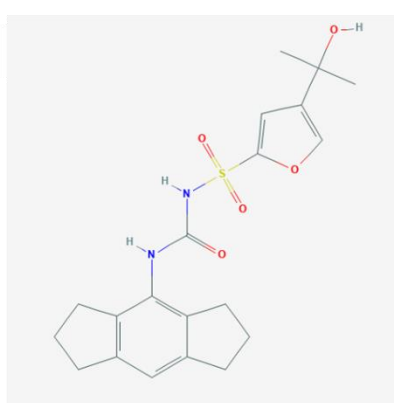
Binimetinib

C



Trametinib

D



MCC950

Figura 10. Estrutura química dos inibidores utilizados neste estudo. (Fonte: PUBCHEM)

4.4 Teste de Citotoxicidade

4.4.1 Teste de viabilidade celular com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio)

Placas de 96 poços foram preparadas com 4×10^4 de células Vero em MEM 1% de SFB ou 4×10^5 de células Raw com DMEM 3% de SFB. Os experimentos foram realizados em triplicata. Aproximadamente 24 horas após a semeadura das células, o meio de cultura das mesmas foi descartado, adicionando-se 100 μ L de seus respectivos meios a cada poço. Foram preparadas diluições dos inibidores nas seguintes concentrações: Selumetinib foram 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 μ M; Binimetinib 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 e 40 μ M e 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 30 e 40 μ M de MCC950. Para os inibidores de MEK/ERK, o DMSO foi utilizado como controle, pois é diluente dos mesmos, enquanto que o meio DMEM foi utilizado controle para o MCC950. Foram adicionados 100 μ L de cada diluição a ser testada aos poços. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. Após a incubação, o meio foi removido e adicionados 28 μ L da solução de MTT em PBS (2 mg/mL) aos poços. As placas foram novamente incubadas por 1h30 na estufa a 37°C. Em seguida, foram adicionados aos poços 130 μ L de DMSO e as placas mantidas em um agitador por 15 min. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. Os valores obtidos da absorbância das amostras foram comparados com os valores obtidos para o controle.

4.4.2 Teste de viabilidade celular – Cristal Violeta

O preparo de placas foi feito como descrito no item 4.4.1. Após 24 horas de incubação, as placas foram lavadas cuidadosamente duas vezes com PBS e adicionados 30 μ L por poço de Cristal Violeta a 0,5% (peso por volume de água destilada) por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita lavagem por

quatro vezes com água da torneira para retirada do excesso de corante e as placas foram colocadas para secar. Posteriormente, foram adicionados 160 µL de SDS 1% e mantidas sob leve agitação durante 15 min e feita a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 590 nm.

Para calcular a Concentração Efetiva Média (CE₅₀) de Trametinib contra CHIKV, células Vero foram previamente infectadas como descrito no item 4.7. Este índice mede qual a concentração que reduz 50% do título viral. Com a CE₅₀ mais a Concentração Citotóxica Média (CC₅₀), obtida por Rivero (2019) também por cristal violeta, foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS). Quanto maior é este índice, mais efetivo é o composto e sem causar efeitos citotóxicos (PRITCHETT *et al.*, 2014)

4.5 Ensaio de Placa

A suspensão viral (200 µL), após diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-6}), foi adicionada à monocamada de células Vero em placas de 12 poços ($2,5 \times 10^5$ células por poço). Para controle celular, um poço não era infectado. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C e 5% de CO₂, sendo agitadas a cada 10 min para adsorção das partículas virais. Após a adsorção, foi adicionado 1 mL por poço de meio semissólido 199 2X, suplementado com 2% de SFB e contendo 1,0% de carboximetilcelulose (CMC). As placas foram novamente incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 48 h. Em seguida, as células foram fixadas com 2 mL de solução de formalina 10% por poço, deixando-as *overnight* a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados com água corrente e adicionado Cristal Violeta 1% (p/v). Após 15 min, os poços foram lavados com água e as placas deixadas sobre papel para secarem. As contagens das placas de lise foram realizadas e o título viral expresso em Unidades Formadoras de Placa por mililitros (PFU/mL).

4.6 Curva de Multiplicação de CHIKV em células Vero, macrófagos intraperitoneais de BALB/c e Raw 264.7

Para a realização da curva de multiplicação de CHIKV em células Vero, garrafas para cultivo celular (25 cm²) foram semeadas com $1,5 \times 10^6$ células cada. No dia seguinte, o meio foi descartado e a monocamada lavada duas vezes com PBS e, em seguida, infectadas. Foram testadas duas MOIs (0,1 e 1) e em triplicata. As garrafas foram incubadas por 1 h a 37 °C e 5% de CO₂, sendo agitadas a cada 10 min para adsorção das partículas virais. Após a incubação, foram adicionados 5 mL de MEM 1% de SFB às garrafas. A coleta do sobrenadante foi realizada nos seguintes tempos: 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36 e 48 hpi (horas pós-infecção). As alíquotas foram armazenadas em freezer - 70 °C até ser realizado o ensaio de placa como descrito no item anterior.

Macrófagos intraperitoneais de BALB/c foram infectados com MOIs de 5, 1 e 0,1 por 24, 48 e 72 hpi, utilizando placa de 24 poços e em triplicata com as condições descritas no item 4.1.2. Após adição do volume para infecção em cada poço, a placa foi incubada por 1 h a 37 °C e 5% de CO₂, sendo agitada a cada 10 min. Em seguida, foi feita a lavagem com PBS e adicionado 1 mL de DMEM 3% de SFB por poço. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer - 70 °C até ser realizado o ensaio de placa.

Para a curva de CHIKV em células Raw, foram semeadas $3,2 \times 10^5$ células em cada poço de placas de 6 poços. Após 48 h, quando atingiram a confluência de 60 a 70%, a monocamada foi lavada com PBS por duas vezes e, em seguida, infectadas com MOIs 5, 1 e 0,1 (em triplicata). As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C e 5% de CO₂, sendo agitadas a cada 15 min. Após a incubação, foi feita lavagem com PBS de cada poço e, em seguida, adicionados 2 mL de DMEM 2% de SFB. O sobrenadante foi coletado nos seguintes tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16 e 24 hpi e posteriormente titulados.

4.7 Avaliação da atividade antiviral dos inibidores contra CHIKV

Foram semeadas $1,5 \times 10^5$ células Vero com MEM 1% de SFB por poço de placas de 24 poços ou $2,5 \times 10^5$ células Raw com DMEM 3% de SFB. Após 24 horas, o meio de cultura das células foi descartado e as mesmas foram pré-tratadas com os inibidores com diferentes concentrações por 30 minutos em volume final de 200 µL. As concentrações testadas dos inibidores foram: 5, 10, 20 e 40 µM de Selumetinib e

Trametinib; 2,5, 5, 10, 20 μM de Binimetinib e 2,5, 5, 10, 20 e 30 μM de MCC950. Como controle celular, monocamadas não foram pré-tratadas nem mantidas com inibidores e no caso dos inibidores de MEK/ERK, monocamadas foram pré-tratadas e mantidas com DMSO como controle do experimento. Após o pré-tratamento, as monocamadas foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com o CHIKV. Células Vero foram infectadas com MOI de 0,1 e células Raw com MOI 5 com volume final de 150 μL de meio. As placas com células Vero foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 sob agitação regular a cada 10 min durante 1 h. Enquanto que células Raw foram incubadas por 2 h e homogeneizadas a cada 15 min. Após o período de adsorção, foi realizada uma nova lavagem das monocamadas com PBS e, em seguida, adicionado 1 mL de meio por poço contendo novamente os inibidores. Células Vero e Raw foram mantidas nesta condição por 20 ou 24 hpi, respectivamente, em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO_2 . O sobrenadante foi coletado e armazenado a - 70 °C até ser realizado o ensaio de placa.

4.8 Avaliação do tratamento com Trametinib no ciclo de multiplicação de CHIKV

Para avaliar o efeito do tratamento com Trametinib durante a multiplicação de CHIKV em células Vero, foi utilizada a concentração de 40 μM . Este experimento seguiu o procedimento descrito no item anterior, mas utilizando placas de 12 poços (com $2,5 \times 10^5$ por poço). A coleta do sobrenadante foi feita nos seguintes tempos: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 e 20 hpi.

Ensaio semelhante foi realizado variando os tratamentos com 40 μM de Trametinib por 4 ou 2 h e em diferentes intervalos de tempos da infecção. O sobrenadante foi coletado 20 hpi.

4.9 Detecção das proteínas NLRP3 e ERK 1/2 fosforiladas durante a infecção por CHIKV em Raw 264.7

4.9.1 Extrato proteico celular total

Para a análise das proteínas NLRP3 e ERK 1/2 durante a infecção por CHIKV, células Raw foram semeadas em garrafas de 25 cm^2 (8×10^6 células) em DMEM 3%

de SFB. Após 24 h, as células foram infectadas conforme descrito no item 4.7, mas com volume final de aproximadamente 1,5 mL de meio. Como controle da ativação da via de NLRP3, foi utilizado 100 ng de LPS (LPS de *E. coli* 0111:B4 – Sigma). Foram analisados os tempos de 8, 12 e 24 hpi. Após a incubação, as monocamadas eram lavadas três vezes com PBS gelado e armazenadas em - 20 °C até ser realizada a extração de proteínas. Para obtenção do lisado de proteínas totais, foram adicionados 150 µL por poço da solução de lise celular, sempre mantendo as garrafas sobre o gelo por 20 min (**Tabela 4**). Em seguida, as monocamadas foram raspadas, coletadas e centrifugadas a 13.500 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5417R – rotor FA-45-24-11) durante 15 min a 4 °C para a clarificação dos sobrenadantes. Estes sobrenadantes foram coletados em tubos novos e as proteínas quantificadas pelo método de Bradford.

Tabela 4. Solução de Lise. Reagentes utilizadas na solução e suas respectivas concentrações.

Reagente	Concentração
Aprotinina	4.2 µg/mL
Leupeptina	4.2 µg/mL
Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF)	1 mM
Metavanadato de Sódio (NaVO ₃)	0,5 mM
Fluoreto de Sódio (NaF)	50 mM
Tampão para radioimunoprecipitação (RIPA Buffer)	1X
H ₂ O	q.s.p

4.9.2 Transferência de *Western*

a) Fracionamento eletroforético e transferência das proteínas

O lisado de proteínas totais foi fracionado por SDS-PAGE. Para isso, tampão LB 5X ([Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,1% (p/v);

glicerol 20% (p/v)] foram adicionados a 60 µg do extrato proteico obtido como descrito no item **5.9.1**, e desnaturados por 5 minutos a 99 °C. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida com SDS a 5 e 10%, junto com o marcador de peso molecular de proteínas (Kaleidoscope, Bio-Rad) e fracionadas a 100 V durante 2h30. Após fracionamento eletroforético, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (GE Healthcare) utilizando-se aparato adequado pela aplicação de corrente elétrica de 350 mA por 1 h. A eletroforese e a transferência foram realizadas nos equipamentos Mini-PROTEAN e Mini-Trans-Blot (BioRad). Após transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 1% em solução de ácido acético 10% para visualização da eficiência da mesma.

b) Bloqueio e Incubação com anticorpos

As membranas foram lavadas com TBS-Tween três vezes por 5 min (Tris a 50 mM, NaCl a 150 mM e Tween 20 0,1% v/v) e, em seguida, bloqueada com leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) 5% p/v em TBS-Tween durante 1 h, impedindo, assim, a ligação inespecífica dos anticorpos primários. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários específicos diluídos em TBS-Tween contendo 5% de BSA (albumina sérica bovina) a 4 °C sob leve agitação. Posteriormente, foram feitas as lavagens das membranas três vezes por 5 min com TBS-Tween e, então, adicionados os anticorpos secundários conjugados à peroxidase diluídos em TBS-Tween contendo 5% de BSA, sendo mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1 h. Para o controle das quantidades de proteínas totais aplicadas, foi utilizado o anticorpo anti-β-actina diluído em TBS-Tween 5% BSA na diluição 1:2500 e seu anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase diluído em TBS-Tween contendo 5% de BSA na diluição de 1:3000. Após o processo de incubação com os anticorpos, foram realizadas 3 novas lavagens com TBS-Tween e, em seguida, adicionados sobre a membrana 500 µL do reagente Luminata Forte (Millipore) por 2 min, conforme recomendação do fabricante. Em seguida, a membrana foi exposta contra filme (Kodak) e revelada com solução reveladora (Kodak) e fixadora (Carestream) de acordo com as instruções do fabricante.

4.11 Análise de dados

Para análise dos dados, os gráficos foram construídos utilizando o *GraphPad Prism software*, versão 6.0cx (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). A CE_{50} foi calculada por regressão não linear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da citotoxicidade dos inibidores farmacológicos

5.1.1 Avaliação da citotoxicidade de Selumetinib e Binimetinib em células

Vero

Ambas as técnicas utilizadas, MTT e Cristal Violeta, revelaram que as células Vero mantiveram a viabilidade celular acima de 80% mesmo na maior concentração testada (80 μ M) dos inibidores Selumetinib e Binimetinib (**Figura 11**). Porém, a técnica de MTT mostrou mais variações na viabilidade celular do que a coloração por cristal violeta.

O MTT é a técnica colorimétrica mais empregada em estudos que avaliam efeitos de compostos ou interação destes *in vitro* (ALMUTARY e SANDERSON, 2016; REQUENA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016). É uma técnica indireta que avalia a viabilidade celular, pois mensura o formazano, produto originado após clivagem do MTT por desidrogenases e agentes redutores presentes em células metabolicamente ativas (ŚLIWKA *et al.*, 2016; STOCKERT *et al.*, 2012). Apesar de ser mais utilizado, alguns estudos mostram que o MTT pode sub ou superestimar a viabilidade celular e, conseqüentemente, os efeitos citotóxicos dos compostos testados (ŚLIWKA *et al.*, 2016; SIMS e PLATTNER, 2009; STEPANENKO e DMITRENKO, 2015). Segundo STEPANENKO e DMITRENKO (2015), o caráter dúbio da técnica pode ser principalmente dependente da linhagem celular utilizada e a concentração do composto e sugerem a utilização de outras técnicas não-metabólicas concomitantemente.

A coloração por cristal violeta é uma técnica que pode ser feita comitadamente com o MTT (SUMITANI *et al.*, 2001; BLÄUER *et al.*, 2009). Esta técnica é aplicada somente às linhagens celulares aderentes, pois estas se desprendem quando morrem. A coloração é feita pelo corante cristal violeta que se liga ao DNA e proteínas (FEOKTISTOVA *et al.*, 2016; ŚLIWKA *et al.*, 2016; WAKELIN *et al.*, 1981). Para que os resultados sejam mais precisos, alguns parâmetros como a proliferação e tamanho das células, devem ser observados, pois variam para cada linhagem celular. As células ao continuarem a crescer, mesmo após atingirem a confluência, tornam-se menores e, conseqüentemente, os valores de absorvância não refletirão a quantidade de células viáveis (CHIBA *et al.*, 1998; SAOTOME *et al.*, 1989).

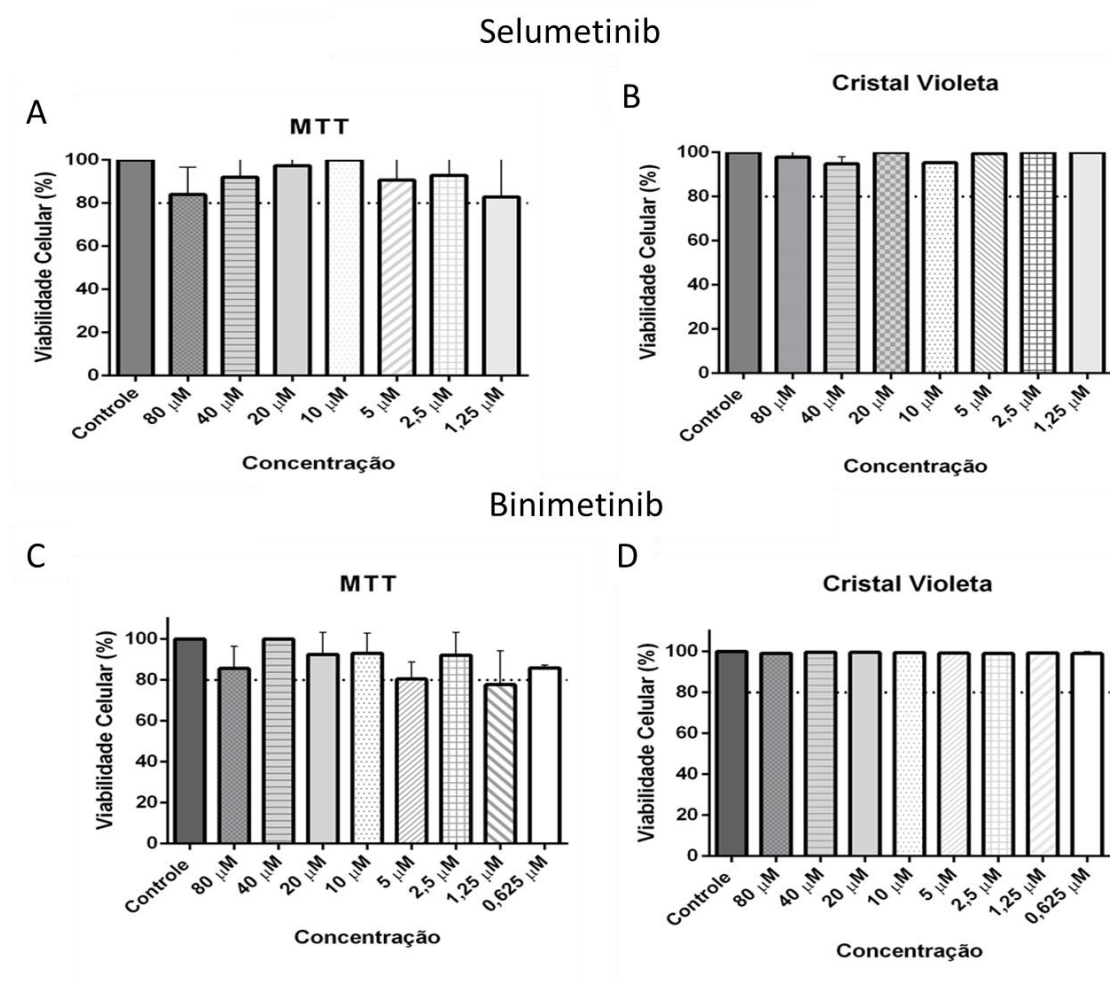


Figura 11. Avaliação da citotoxicidade de Selumetinib e Binimetinib em células Vero. Células Vero foram tratadas com concentrações diferentes de Selumetinib (A e B) e Binimetinib (C e D) por 24 h e viabilidade celular determinada com as técnicas de MTT e Cristal Violeta. Os dados de viabilidade foram representados como porcentagem do controle tratado com DMSO.

5.1.2 Avaliação da citotoxicidade de MCC950 em células Raw 264.7

Células Raw mantiveram a viabilidade celular próximo de 100%, não havendo divergências nas duas técnicas utilizadas (**Figura 12**). Bae *et al.* (2017), utilizando *Cell Counting Kit 8*, também observaram viabilidade das células A253, originadas de carcinoma epidermoide, próximo a 100% quando incubadas com 10 µM de MCC950.

MCC950 é inibidor específico de NLRP3 com IC₅₀ de 7,5 nM em macrófagos derivados de medula óssea de camundongo. O mecanismo de ação de MCC950 foi recentemente descrito. Moléculas de MCC950 se ligam ao *motif* Walker B do domínio

NACHT de NLRP3, o sítio de interação e hidrólise de ATP, assim, a proteína se mantém estruturalmente “fechada” (COLL *et al.*, 2015; TAPIA-ABELLÁN *et al.*, 2019; COLL *et al.*, 2019; GORKA *et al.*, 2019).

MCC950

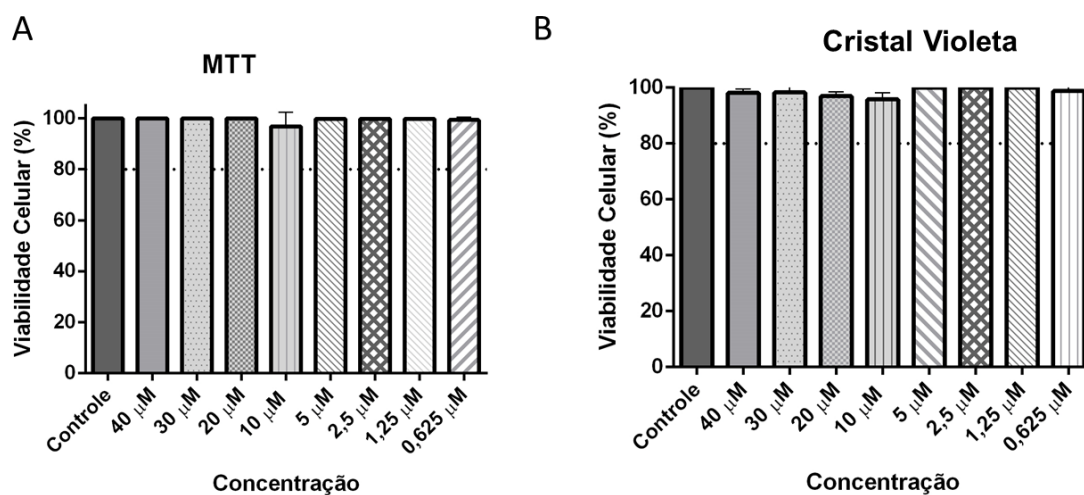


Figura 12. Avaliação da citotoxicidade de MCC950 em células Raw. Células Raw foram tratadas com concentrações diferentes de MCC950 por 24 h e viabilidade celular determinada com as técnicas de MTT (A) e Cristal Violeta (B).

5.2 Curva de Multiplicação de CHIKV em células Vero, Macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c e Raw 264.7

5.2.1 Curva de Multiplicação de CHIKV em células Vero

Para determinar o perfil de multiplicação de CHIKV em células Vero foram avaliadas duas MOIs diferentes (1 e 0,1). (Figura 13).

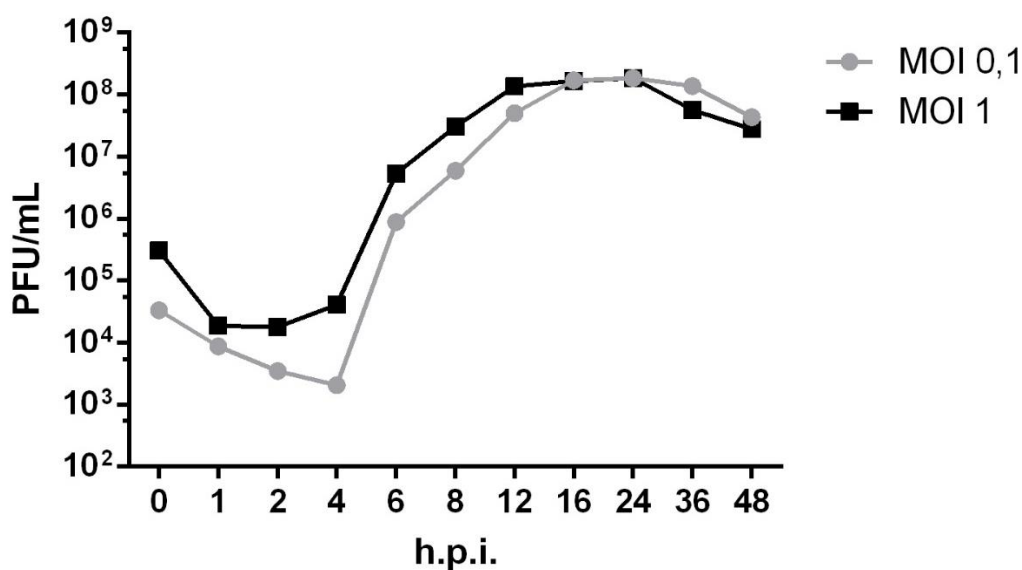


Figura 13. Curva de multiplicação de CHIKV em células Vero. Células Vero foram infectadas com MOIs 1 e 0. Os sobrenadantes foram coletados em diferentes tempos e posteriormente titulados. Os títulos foram determinados por ensaio de placa (PFU/mL). MOI (*Multiplicity of infection*): Multiplicidade de Infecção/ h.p.i: horas pós-infecção

Foram observados perfis semelhantes de multiplicação nas duas MOIs avaliadas, sendo o eclipse entre 1 e 4 hpi, a fase exponencial entre 6 e 16 hpi e a partir de 36 hpi o título começa a cair ligeiramente. Além disso, nas duas MOIs, títulos de 10^8 foram alcançados (16 e 24 hpi). Desta forma, a MOI 0,1 foi a utilizada em experimentos posteriores.

O perfil observado de multiplicação é relatado na literatura em que a fase de produção de progênie se dá entre 8 e 16 hpi (HIGASHI *et al.*, 1967; SOURISSEAU *et al.*, 2007). CHIKV se multiplica em várias linhagens celulares humanas, tais como HeLa (carcinoma cervical humano), BEAS-2B (Epitélio bronquial), SJCRH30 (Rabdomiossarcoma), HSMM (mioblastos do músculo esquelético) e 293T (Epitélio alveolar) e não humanas, como C6/36 (*Aedes albopictus*), BHK-21 (fibroblasto de rim de hamster) e CLTT (astrócito murino), por exemplo. As células epiteliais/fibroblastos, como a Vero, estão entre as mais efetivamente infectadas (SOURISSEAU *et al.*, 2007; HIGASHI *et al.*, 1967; DAS *et al.*, 2015; SALVADOR *et al.*, 2009; SOLIGNAT *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2018; HUA *et al.*, 2019).

5.2 Curva de Multiplicação de CHIKV em Macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c e células Raw 264.7

Para testarmos o inibidor MCC950, o qual inibe a NLPR3, foi necessário escolhermos um modelo celular em que essa via fosse expressa e permissiva à infecção por CHIKV. As células do sistema imune, tais como macrófagos e monócitos, são as que mais expressam genes relacionados aos inflamassomas (AWAD *et al.*, 2017; IP e MEDZHITOV, 2015). Primeiramente, um teste foi realizado com macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c macho (**Figura 14**). Estas células foram infectadas com MOIs de 5, 1 e 0,1 por 24, 48 e 72 hpi. No entanto, somente na MOI 5 foram observadas partículas viáveis em 24 e 48 hpi, embora com muito baixa produção viral (1×10^3 e $3,2 \times 10^3$ PFU/mL, respectivamente) quando comparado ao que foi inoculado (0 hpi) (**Figura 15**).

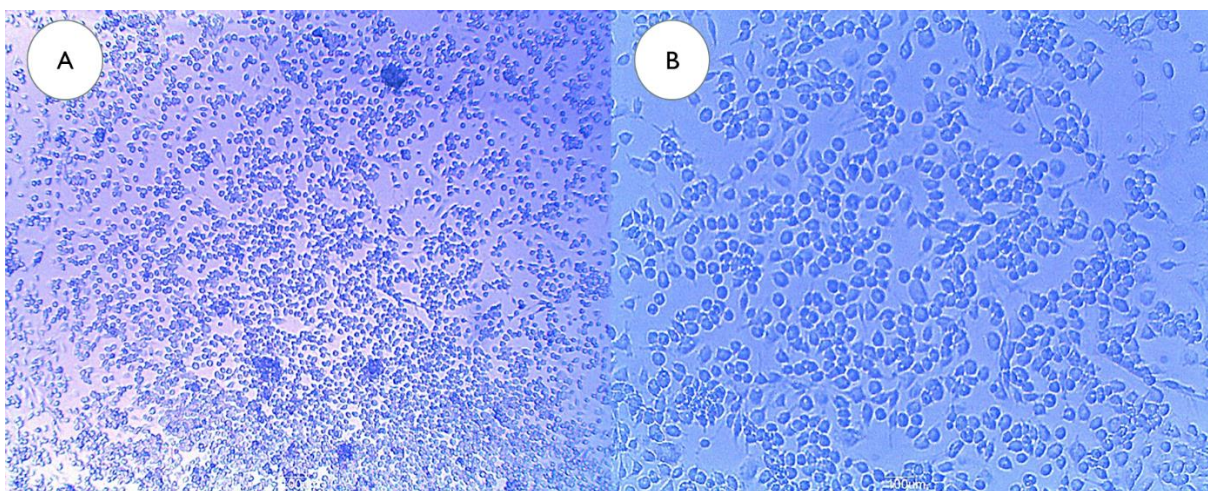


Figura 14. Macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c após três dias de implantadas. Foi realizada estimulação com a injeção de tioglicolato a 3% no peritônio de um camundongo BALB/c macho de 7 semanas. Após 4 dias, o animal foi anestesiado e eutanasiado. Foi feito um lavado com DMEM 0% de SFB, que em seguida foi centrifugado e ressuspendido em DMEM 10% de SFB. Foram obtidas ao total $3,9 \times 10^6$ células. Células em aumento de 40 (A) e 100 x (B).

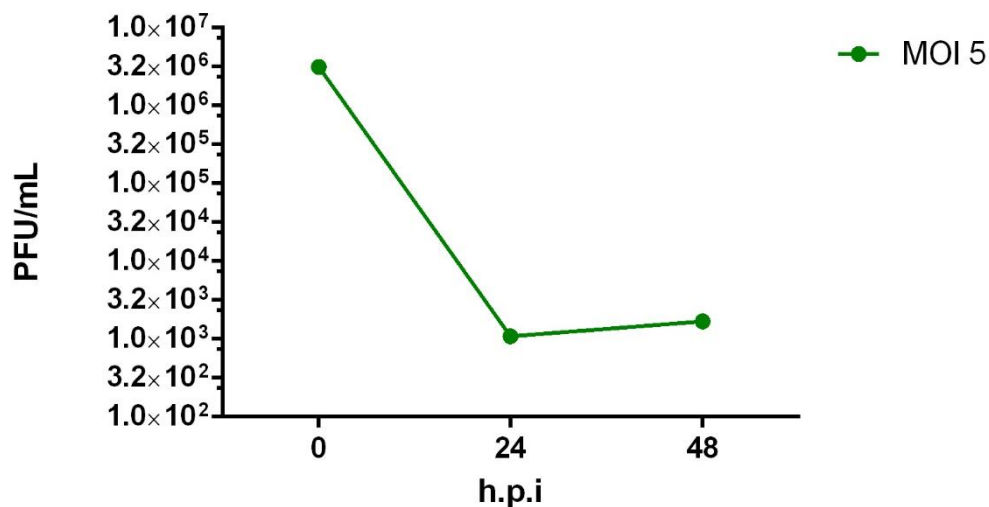


Figura 15. Infecção com CHIKV de macrófagos intraperitoneais de camundongo BALB/c. Foi realizada estimulação com a injeção de tioglicolato a 3% no peritônio de um camundongo BALB/c macho de 7 semanas. Após 4 dias, o animal foi anestesiado e eutanasiado. Foi feito um lavado com DMEM 0% de SFB, que em seguida foi centrifugado e ressuspendido em DMEM 10% de SFB e as células coletadas foram semeadas em placas de 24 poços. No dia seguinte foi feita a infecção com CHIKV (MOIs 5, 1 e 0,1), porém somente na MOI 5 foram obtidos baixos títulos virais. MOI (*Multiplicity of infection*): Multiplicidade de Infecção/ h.p.i: horas pós-infecção

Dado o rendimento não adequado com macrófagos intraperitoneais para as avaliações posteriores com o inibidor, células Raw foram escolhidas como modelo para avaliar a via de NLRP3. Foi necessário, então, determinar o perfil de multiplicação de CHIKV nesta linhagem celular. Para isto foram avaliadas três MOIs diferentes (5, 1 e 0,1) (**Figura 16**).

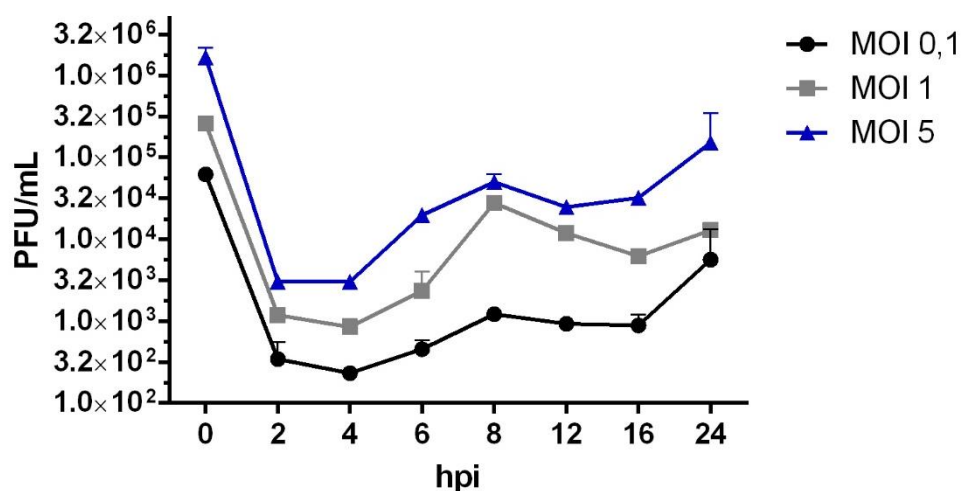


Figura 16. Curva de multiplicação de CHIKV em células Raw. Células Raw foram infectadas com MOIs 5, 1 e 0,1. O sobrenadante foi coletado em diferentes tempos e posteriormente titulado. O título foi determinado por ensaio de placa (PFU/mL). MOI (*Multiplicity of infection*): Multiplicidade de Infecção/ h.p.i: horas pós-infecção

O perfil de multiplicação de CHIKV em Raw foi diferente quando comparado com as células Vero, porém o rendimento foi superior ao obtido com os macrófagos intraperitoneais, apesar de não ter sido observado título superior ao inóculo (0 hpi) em nenhuma das MOIs testadas. Entre 1 e 4 hpi é a fase de eclipse e em 8 e 24 hpi são observados aumentos significativos dos títulos nas três MOIs. Dado o maior rendimento, a MOI 5 foi utilizada nos ensaios posteriores com as células Raw.

Poucos trabalhos mostram a infecção de CHIKV em células Raw. Kumar *et al.*, (2012) observaram, após 48 hpi (MOI 1), agrupamentos de células infectadas, correspondendo a menos de 5% do total de células. Diferentemente do que foi observado no presente estudo, os títulos de CHIKV nos tempos de 8, 24 e 48 hpi foram estáveis em aproximadamente 3×10^3 PFU/mL ao analisarem o sobrenadante. Nayak *et al.* (2017) também avaliaram a infecção CHIKV em Raw e observaram que na MOI 5, aproximadamente 15% das células foram infectadas e o pico de multiplicação ocorreu em 12 hpi.

Outras linhagens celulares derivadas do sangue tais como Jurkat (células T originadas de linfoma) THP-1 e U937 (células monocitoides), Ana-1 (macrófagos murino) e B-420 (células B) são células refratárias à infecção por CHIKV

(SOURISSEAU et al., 2007; SALVADOR et al., 2009; ZHANG et al., 2018). E mesmo as células do tipo que são efetivamente infectadas, como macrófagos primários humanos, a progênie liberada é menor quando comparada com outras linhagens, como a Vero e HeLa (SOURISSEAU et al., 2007; KUMAR *et al.*, 2012).

Neste estudo, não foram observadas alterações morfológicas ou outro efeito citopático nas células infectadas quando avaliadas por microscopia de campo claro, mesmo na maior MOI testada. Apesar disso, CHIKV é altamente citopático em outras células de mamíferos e humanos, induzindo a morte celular principalmente por apoptose. Este mecanismo também é observado em outros alfavírus, tais como SINV, vírus da Floresta Semliki (SFV) e o Mayaro (MAYV) (SOURISSEAU et al., 2007; CAVALHEIRO *et al.* 2016; NAYAK *et al.*, 2017; KREJBICH-TROTOT *et al.*, 2011). Durante o processo de apoptose, as células se tornam arredondadas, ocorre intensa condensação da cromatina, com posterior fragmentação do envelope nuclear, formação de vacúolos no citoplasma e, em etapas finais, formação de corpos apoptóticos. Na infecção por CHIKV, a formação de corpos apoptóticos constituem importante mecanismo de evasão do sistema imune e facilita a propagação viral para as células vizinhas. São conhecidas duas vias que culminam na ativação de caspase-3, a principal protease efetora da morte celular: a extrínseca e intrínseca. Na primeira, a ativação da cascata é decorrente da ligação de proteínas a receptores com domínio de morte presentes na membrana celular, a segunda é mediada pela mitocôndria (ELMORE, 2007; LUCHS e PANTALEÃO, 2010; KREJBICH-TROTOT *et al.*, 2011). Divergências na ocorrência de apoptose foram observadas nos dois trabalhos que avaliaram a infecção de CHIKV em células Raw (KUMAR *et al.*, 2012; NAYAK *et al.*, 2017). Kumar *te al.* (2012) não detectaram caspases-3 ativa após 24 hpi. Entretanto, Nayak *et al.* (2017) observaram alterações morfológicas características de apoptose, além de aumento da expressão de caspase-3 ativa nos tempos de 12 e 24 hpi e que CHIKV ativava as duas vias apoptóticas. Essas diferenças foram atribuídas às diferentes condições experimentais e a linhagem dos vírus analisados.

5.3 Avaliação da atividade antiviral dos inibidores contra CHIKV

5.3.1. Avaliação da atividade antiviral dos inibidores de MEK/ERK

Foram testadas concentrações crescentes não citotóxicas de Selumetinib, Binimetinib e Trametinib para verificar o efeito contra CHIKV (MOI 0,1) em células Vero (**Figura 17**). As concentrações testadas de Trametinib e Selumetinib foram baseadas em observações anteriores do nosso grupo de pesquisa (RIVERO, 2019; REIS, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

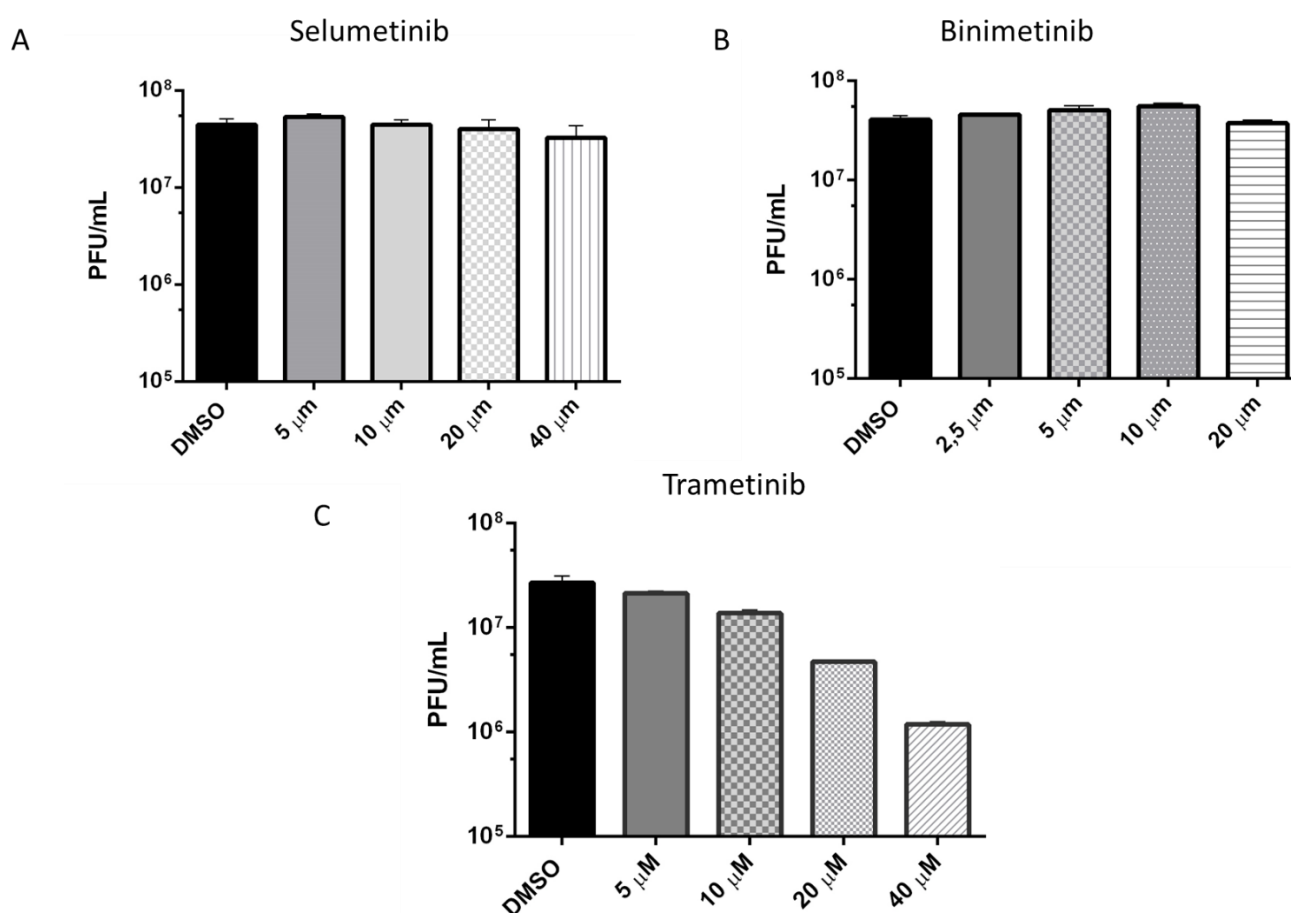


Figura 17. Avaliação da atividade antiviral dos inibidores de MEK/ERK contra CHIKV. Células Vero foram carenciadas com MEM 1% por 24h, pré-tratadas com as concentrações determinadas de Selumetinib (A), Binimetinib (B) e Trametinib (C) por 30 min, infectadas com CHIKV com MOI de 0,1 e incubadas com os inibidores por 20 hpi. O controle para cada tratamento foi com DMSO, o diluente desses inibidores. O sobrenadante foi coletado e posteriormente titulado. O título viral foi determinado por ensaio de placa (PFU/mL).

MOI (*Multiplicity of infection*): Multiplicidade de Infecção/ h.p.i: horas pós-infecção

Somente com a concentração de 40 μM de Trametinib foi observada redução do título de CHIKV ($1 \log_{10}$). A CE_{50} foi de 5,16 μM e IS de 101,6. Visto isto, possivelmente a via de MEK/ERK é utilizada pelo vírus durante seu ciclo de multiplicação. Assim, Trametinib (40 μM) foi utilizado em ensaios posteriores para se determinar qual ou quais etapas do ciclo de multiplicação de CHIKV podem ser mais afetadas devido ao efeito do inibidor.

Apesar do resultado negativo com as concentrações testadas de Selumetinib e Binimetinib contra CHIKV, o nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a importância da via de MAPK e de seus inibidores para o ciclo de alguns vírus. Entre os vírus estudados estão membros da família *Flaviviridae*, como dengue vírus (DENV-2 e DENV-3), vírus da febre amarela (YFV), Zika vírus (ZIKV) e o da encefalite de Saint Louis (SLEV). Pioneiramente, Albarnaz *et al.* (2014) demonstraram que o inibidor U0126, um dos primeiros inibidores de MEK desenvolvidos, afetava as etapas de replicação e de montagem de novas partículas de YFV em células Vero. Em trabalhos posteriores, observou-se que Selumetinib (20 μM) reduziu os títulos de DENV-2, DENV-3 e SLV em células BHK-21 entre 2 e 3 \log_{10} e protegeu camundongos A129 de desenvolverem doença similar a febre hemorrágica causada pelo DENV-2. (AGUIAR, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Rivero (2019) demonstrou que a multiplicação de YFV, assim como, as etapas de morfogênese e liberação de ZIKV também são afetadas por Selumetinib. Tem sido descrito a ação antiviral de Selumetinib e de outros inibidores de cinases contra o vírus da influenza A (IAV) (HAASBACH *et al.*, 2013; PERWITASARI *et al.*, 2015).

Rivero (2019) também avaliou o potencial de Trametinib contra ZIKV, DENV-3 e YFV em células Vero, observando reduções de 3 \log_{10} (20 μM), 1 \log_{10} (20 μM), 3 \log_{10} (40 μM), respectivamente. Para ZIKV, obteve CE_{50} de 3 μM e IS de 175 demonstrando uma potente atividade antiviral para famílias virais distintas. Outros estudos demonstram que o poliomavírus de células Merkel (MCPyV), o vírus da Infuenza A (IAV) e o HIV-1 são também afetados pelo tratamento com Trametinib (DOCHI *et al.*, 2017; SCHRÄDER *et al.*, 2018, LIESKE *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016).

Quanto ao Binimetinib, inicialmente, esperava-se algum tipo de atividade antiviral por apresentar IC₅₀ até menor quando comparado ao Trametinib. E não foram encontrados até o momento trabalhos que evidenciem seu potencial antiviral.

5.3.2 Avaliação da atividade antiviral de Trametinib durante ciclo de multiplicação de CHIKV

O efeito antiviral de Trametinib (40 µM) foi avaliado ao longo do ciclo de multiplicação de CHIKV em células Vero. (Figura 18).

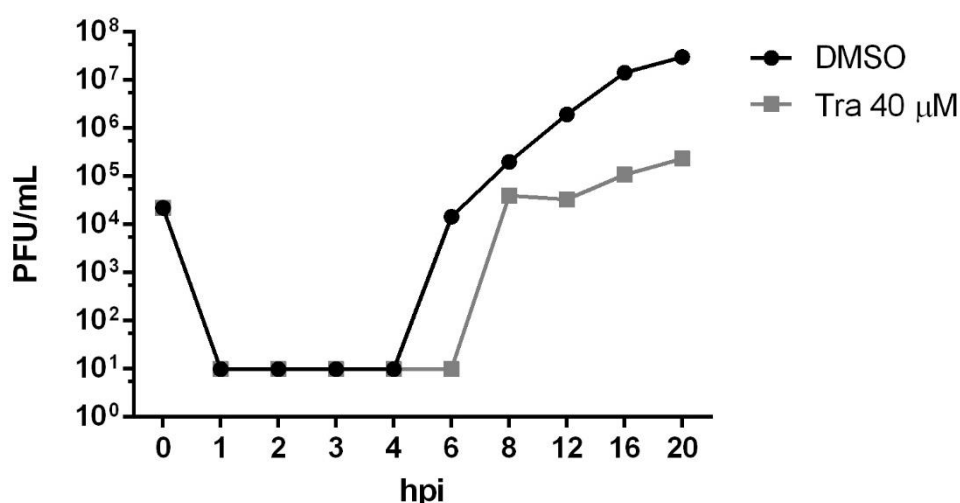


Figura 18. Avaliação da atividade antiviral de Trametinib durante ciclo de multiplicação de CHIKV. Células Vero foram implantadas em placas com MEM 1%, pré-tratadas com 40 µM de Trametinib por 30 min, infectadas com CHIKV com MOI de 0,1 e incubadas com inibidor ao longo de todo o experimento. O DMSO foi utilizado como controle. Nos tempos determinados, o sobrenadante foi coletado e posteriormente titulado. O título foi determinado por ensaio de placa (PFU/mL). MOI (*Multiplicity of infection*): Multiplicidade de Infecção/ h.p.i: horas pós-infecção

Quando comparado ao controle, a liberação de novas partículas de CHIKV é retardada quando observado o tempo de 6 hpi no tratamento com 40 µM de Trametinib, apresentando diferença de até 3 log₁₀. Esta diferença diminui rapidamente em 8 hpi, mas não foi observado aumento significativo dos títulos virais nos tempos posteriormente analisados. Em 20 hpi, a diferença da curva com 40 µM de Trametinib do controle é de 2 log₁₀, sugerindo que a etapa de liberação da progênie é a mais afetada na infecção de CHIKV quando tratada com Trametinib. Diferentemente, no

experimento de avaliação de atividade antiviral dos inibidores (**Figura 17**), houve redução de somente 1 \log_{10} do título viral no tratamento com Trametinib. Esta diferença pode ser resultado de se utilizar inibidor recém diluído nesse segundo experimento, mesmo se tratando de mesmo lote.

Reis (2019) também avaliando o mesmo tratamento e condições experimentais similares em células Vero contra CHIKV, nos tempos de 8, 16 e 24 hpi, observou redução de 1, 2 e 1 \log_{10} , respectivamente. Apesar dos poucos tempos analisados, é possível observar que a diferença de títulos entre o tratamento e controle nos tempos mais tardios diminui. Reis (2019), por microscopia eletrônica de transmissão, também observou que no tratamento com 40 μ M de Trametinib, as esférulas foram visualizadas somente no tempo 16 hpi, enquanto que nas células com DMSO, foram visualizadas em 8 hpi, demonstrando assim, retardo no ciclo de CHIKV na presença de Trametinib.

5.3.3 Tratamento com Trametinib em diferentes tempos da multiplicação de CHIKV

Para maior entendimento de qual ou quais etapas do ciclo de multiplicação de CHIKV são afetadas pelo tratamento com 40 μ M de Trametinib em células Vero, foram realizados tratamentos por 4 ou 2 horas em diferentes intervalos da infecção por CHIKV (MOI 0,1), o sobrenadante foi coletado e titulado após 20 hpi (**Figura 19**).

No tratamento de 10 a 12 hpi foi observada diferença significativa em comparação ao controle de 4 \log_{10} . Não houve diferença nos títulos virais nos tratamentos dos demais tempos analisados. Desta forma, há reforço da hipótese de que o Trametinib afeta significativamente etapas mais tardias do ciclo, possivelmente o momento de liberação da progênie de CHIKV em células Vero. Semelhantemente, Rivero (2019) observou que as etapas de morfogênese e liberação da progênie de ZIKV foram afetadas após tratamento no intervalo de tempo de 12 a 18 hpi em células Vero. Mais análises devem ser feitas para entendimento do efeito de Trametinib especificamente nas etapas tardias.

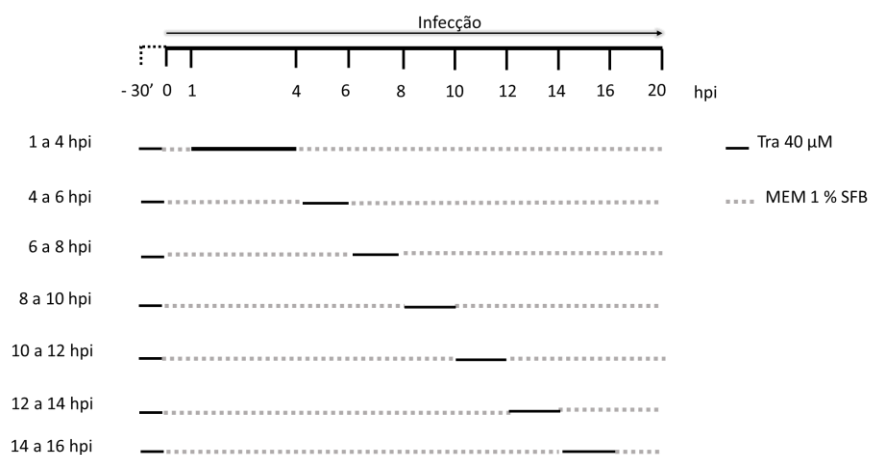
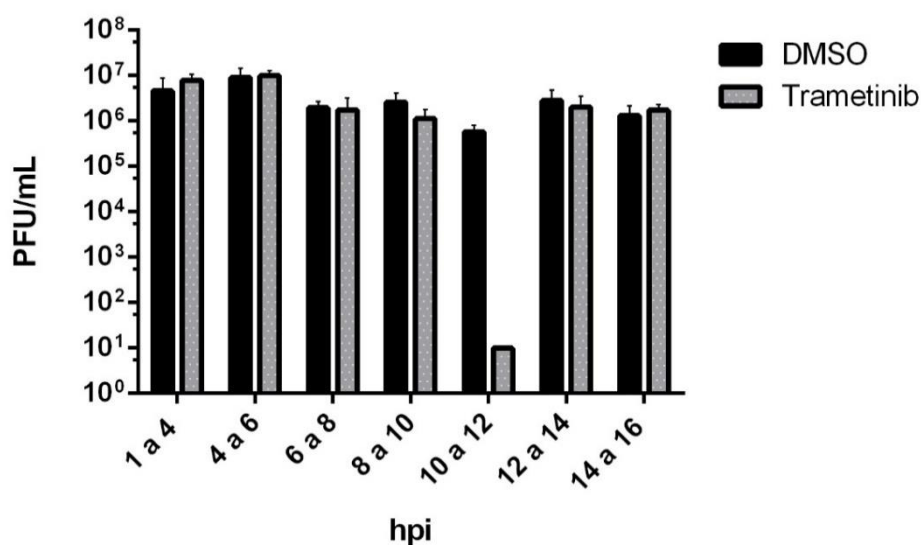


Figura 19. Tratamento com Trametinib em diferentes tempos da multiplicação de CHIKV. Células Vero foram implantadas em placas com MEM 1%, pré-tratadas com 40 μM de Trametinib por 30 min, infectadas com CHIKV (MOI de 0,1) e tratadas por 4 ou 2 horas em diferentes intervalos da infecção como mostrado no esquema acima. Os sobrenadantes foram coletados 20 hpi e posteriormente titulados. Os títulos foram determinados por ensaio de placa (PFU/mL).

MOI (*Multiplicity of infection*): Multiplicidade de Infecção/ h.p.i: horas pós-infecção

5.3.4 Avaliação da atividade antiviral do inibidor da via de NLRP3

Concentrações crescentes não citotóxicas de MCC950 foram testadas para verificar o efeito contra CHIKV (MOI 5) em células Raw (**Figura 20**). Porém, não foram observadas reduções significativas, demonstrando que o inibidor MCC950 não exerce

atividade antiviral. Chen *et al.* (2017), avaliando se MCC950 inibia NLRP3 em modelo murino após infecção por CHIKV, observaram reduções de edemas nas patas, mas não encontraram diferenças nas cargas virais ou de RNA nas articulações de animais tratados quando comparados ao controle. Assim, apesar de não afetar a multiplicação de CHIKV, MCC950 é um inibidor promissor para o tratamento de inflamações induzidas pelo vírus.

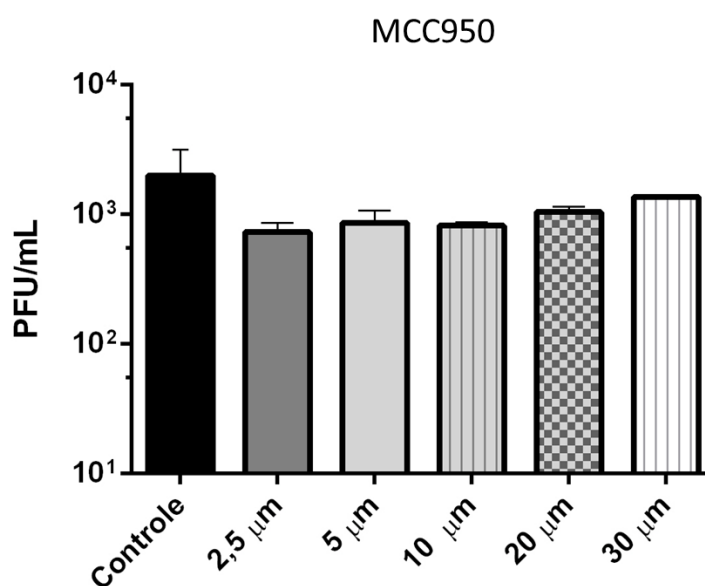


Figura 20. Avaliação da atividade antiviral do inibidor de NLRP3 contra CHIKV.

Células Raw foram pré-tratadas com as concentrações de MCC950 por 30 min, infectadas com CHIKV com MOI de 5 e incubadas com o inibidor por 24 hpi. Células Raw não tratadas e infectadas e foram utilizadas como controle.

O sobrenadante foi coletado e posteriormente titulado. O título foi determinado por ensaio de placa (PFU/mL). MOI (*Multiplicity of infection*): Multiplicidade de Infecção/ h.p.i: horas pós-infecção

5.3.5 Detecção das proteínas NLRP3 e ERK 1/2 fosforiladas durante a infecção por CHIKV em células Raw 264.7

Avaliou-se como a infecção de CHIKV afeta a expressão da proteína NLRP3 e a fosforilação de ERK 1/2 (**Figura 21**). No tempo de 12 hpi foi possível observar um incremento da expressão de NLRP3, similar ao controle com LPS, quando comparado com o controle celular (canaletas 4,5 e 6). Nos demais tempos analisados não houve diferenças em relação ao controle celular. Da mesma forma, somente no tempo de 12 hpi foi possível observar aumento da fosforilação de ERK 1/2.

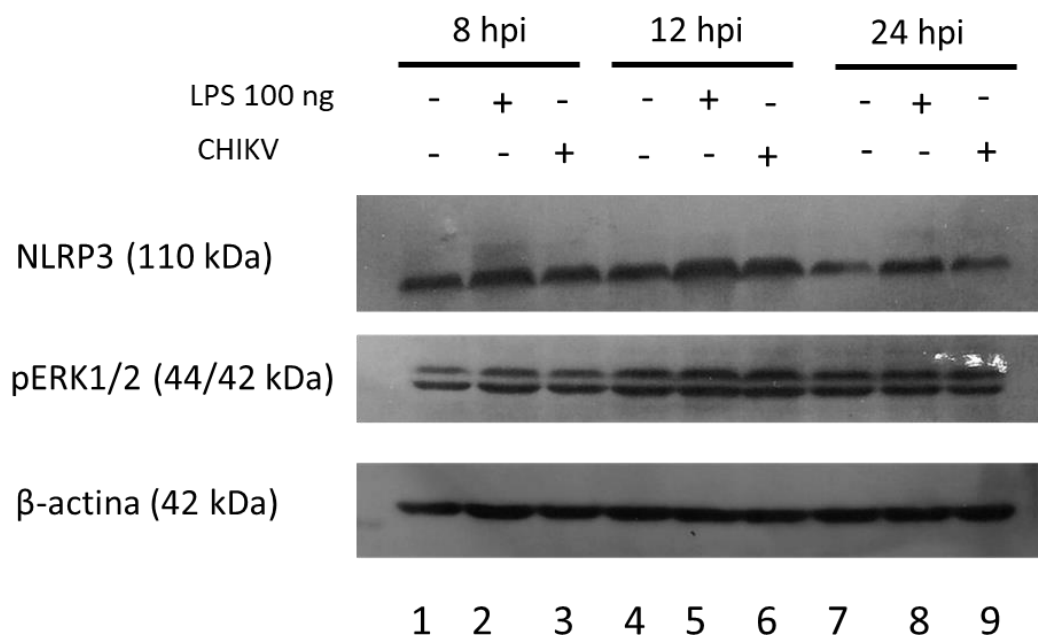


Figura 21. Detecção das proteínas NLRP3 e ERK 1/2 fosforiladas durante a infecção por CHIKV. Células Raw foram infectadas com CHIKV (MOI 5) ou incubadas com 100 ng de LPS por 8, 12 e 24 hpi. Transferência de Western foi realizada com 60 μ g de extrato proteico e a quantidade de proteínas aplicada em cada canaleta foi normalizada pela detecção de β -actina.

A ativação de componentes do inflamassoma NLRP3 tem sido relatada para outros vírus, tais como alfa herpesvírus humano 1 (HHV-1), DENV, vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus da estomatite vesicular (EMCV). As proteínas PB1-F2, M2 e o RNA do vírus influenza ativam o inflamassoma NLRP3. Diferentemente, somente uma proteína do cardiovírus, a viroporina 2, tem papel na ativação (WU *et al.*, 2013; JOHNSON *et al.*, 2013; CHEN e ICHINOHE, 2015; KURIAKOSE e KANNEGANTI, 2017). Liu *et al.* (2019) demonstraram que ZIKV causa insuficiência renal aguda, tanto em camundongos recém-nascidos quanto em adultos, induzida pela super estimulação de NLRP3 e consequente resposta inflamatória. Também tem sido demonstrado que o inflamassoma NLRP3 contribui na patogenicidade de MAYV em modelo murino, além de aumentar os níveis de caspases-1 ativas, IL-1 β e IL-18 no soro de indivíduos infectados (CASTRO-JORGE *et al.*, 2019).

A via de MEK/ERK tem importante papel em diferentes etapas da multiplicação de vários vírus. Em células Vero, por exemplo, YFV estimula a ativação de ERK em tempos precoces do ciclo, de 15 min a 6 h pós-infecção. Tem sido demonstrada a ativação desta via na penetração do vírus Ebola, síntese de proteínas do IAV, morfogênese e liberação de HIV-1. Alguns vírus podem induzir ativação em fases temporalmente distintas (ALBARNAZ *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2018). Rodríguez *et al.* (2014) observaram que o vírus Junín ativa ERK 1/2 nos primeiros 30 min pós-infecção e segundo pico de fosforilação a partir de 7 hpi em células Vero.

No presente estudo, foi observado que o tratamento com Trametinib no intervalo de 10 a 12 hpi afetou significativamente a multiplicação de CHIKV em células Vero. A maior indução de ERK 1/2 em células Raw também ocorreu em 12 hpi, sugerindo, assim, a importância desta via nas etapas tardias do ciclo de CHIKV.

6 CONCLUSÕES

- Células Vero e a linhagem celular de macrófagos, a Raw 264.7, são infectadas pelo CHIKV genótipo ECSA. Porém, em Raw foram obtidos menores títulos virais quando comparado a Vero.
- Trametinib reduziu o título de CHIKV, afetando, principalmente, etapas tardias do ciclo de multiplicação em células Vero.
- CHIKV estimula a expressão de NLRP3 e a fosforilação de ERK 1/2 durante a infecção de células Raw.

7 PERSPECTIVAS

- Definir qual(is) etapa(s) do ciclo de multiplicação do CHIKV é (são) afetada(s) pelo tratamento com Trametinib em células Vero.
- Verificar o papel da resposta inata do hospedeiro (Inflamassoma) durante a infecção de células Raw com o CHIKV após o tratamento com Trametinib utilizando modelo animal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Chikungunya virus infections: time to act, time to treat. *Current Opinion in Virology*, v. 24, p. 25–30, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.016>>.
- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral Research*, v. 121, n. June, p. 59–68, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.017>>.
- 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, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.09.004>>.
- ALBUQUERQUE, I. G. C. DE *et al.* Chikungunya virus infection: report of the first case diagnosed in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 1, p. 128–129, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822012000100026&lng=en&tlng=en>.
- ALMUTARY, A.; SANDERSON, B. J. S. The MTT and Crystal Violet Assays: Potential Confounders in Nanoparticle Toxicity Testing. *International journal of toxicology*, v. 35, n. 4, p. 454 – 62, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207930>>. Acesso em: 18 jan. 2020.
- ANDRADE, A.; SILVA, P.N.; PEREIRA, A.C. *et al.* The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem. J.* 381, 437–446, 2004.
- AWAD, F., ASSRAWI, E., JUMEAU, C., GEORGIN-LAVIALLE, S., COBRET, L., DUQUESNOY, P., ... KARABINA, S. A. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS ONE*, v. 12, n. 4, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175336>>.
- BAE, J. Y., LEE, S. W., SHIN, Y. H., LEE, J. H., JAHNG, J. W., & PARK, K. . P2X7 receptor and NLRP3 inflammasome activation in head and neck cancer. *Oncotarget*. v. 8, n. 30, p. 48972–48982, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.18632/oncotarget.16903>>.
- BLÄUER, M. *et al.* Vitamin D inhibits myometrial and leiomyoma cell proliferation in vitro. *Fertility and Sterility*, v. 91, n. 5, p. 1919–1925, maio 2009.
- BONJARDIM, C.A. Viral exploitation of the MEK/ERK pathway–A tale of vaccinia virus and other viruses. *Virology*, v. 507, p. 267-275, 2017.
- BROZ, P., & DIXIT, V. M. . Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 7, p. 407– 420, 2016. Disponível

em: <<https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>>.

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

CAGLIOTI, C. *et al.* Chikungunya virus infection: an overview. *The new microbiologica*, v. 36, n. 3, p. 211–27, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912863>%0Ahttp://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2013/3/211.pdf>.

CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: A case of mistaken identity? *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, v. 26, n. 3, p. 243–262, 1971.

CASTRO-JORGE, L. A. *et al.* The NLRP3 inflammasome is involved with the pathogenesis of Mayaro virus. *PLoS Pathogens*, v. 15, n. 9, p. 1–27, 2019.

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, 2016.

CERVANTES-ACOSTA, G.; SANJUÁN-VERGARA, H. Virus chikungunya: Características virales y evolución genética Chikungunya Virus: Viral Features and Genetic Evolution. *Salud Uninorte*, v. 32, n. 2, p. 292–301, 2016.

CHEN, I.-Yin; ICHINOHE, Takeshi. Response of host inflammasomes to viral infection. *Trends in microbiology*, v. 23, n. 1, p. 55-63, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.007>>.

CHEN, W., FOO, S. S., ZAID, A., TENG, T. S., HERRERO, L. J., WOLF, S., ... MAHALINGAM, S. . Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. *Nature Microbiology*, v. 2, n. 10, p. 1435 –1445, 2017. Disponível em:<<https://doi.org/10.1038/s41564-017-0015-4>>.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro*, v. 12, n. 3, p. 251–258, 1998.

_____. ClinicalTrials.gov. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. Acesso em: 18 fev 2020.

COFFEY, L. *et al.* Chikungunya Virus–Vector Interactions. *Viruses*, v. 6, n. 11, p. 4628–4663, 24 nov. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/6/11/4628>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

- COLL, R. C., HILL, J. R., DAY, C. J., ZAMOSHNIKOVA, A., BOUCHER, D., MASSEY, N. L., ... SCHRODER, K. . MCC950 directly targets the NLRP3 ATP- hydrolysis motif for inflammasome inhibition. *Nature Chemical Biology*, v. 15, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41589-019-0277-7>>.
- COLL, R. C., ROBERTSON, A. A. B., CHAE, J. J., HIGGINS, S. C., MUÑOZ-PLANILLO, R., INSERRA, M. C., ... O' NEILL, L. A. J. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature Medicine*, v. 21, n. 3, p. 248 - 257, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nm.3806>>.
- CONTOPOULOS-IOANNIDIS, D. *et al.* Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 6, p. e0006510, 13 jun. 2018. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006510>>. Acesso em: 1 out. 2018.
- COULTHARD, L. R. *et al.* p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, v. 15, n. 8, p. 369–379, 1 ago. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491409001142>>. Acesso em: 2 ago. 2018.
- DARLING, N. J.; COOK, S. J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1843, n. 10, p. 2150–2163, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.009>>.
- DAS, I. *et al.* Heat shock protein 90 positively regulates Chikungunya virus replication by stabilizing viral non-structural protein nsP2 during infection. *PLoS ONE*, v. 9, n. 6, 2014.
- DAS, T. *et al.* Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 2, p. 294–310, 2015.
- 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. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.177>>.
- DONATO, J.; FRAZÃO, R.; ELIAS, C. F. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v. 54, n. Figure 1, p. 591–602, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-27302010000700002&script=sci_arttext%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085763>.
- DUMMER, R., ASCIERTO, P. A., GOGAS, H. J., ARANCE, A., MANDALA, M., LISZKAY, G., ... FLAHERTY, K. T. Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or

- encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, v. 19, n. 10, p. 1315 – 1327, 2018. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30497-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30497-2)>.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. [S.l.]: *NIH Public Access*., 2007.
- FDA. *FDA approves selumetinib for neurofibromatosis type 1 with symptomatic, inoperable plexiform neurofibromas*. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-selumetinib-neurofibromatosis-type-1-symptomatic-inoperable-plexiform-neurofibromas>. Acesso: 28 jun. 2020.
- FEOKTISTOVA, M; GESERICK, P; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2016, n. 4, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>>.
- FORRESTER, N. L. *et al.* Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. *Journal of Virology*, v. 86, n. 5, p. 2729–2738, 2012. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.05591-11>>.
- GOH, L. *et al.* The Chikungunya Virus Capsid Protein Contains Linear B Cell Epitopes in the N- and C-Terminal Regions that are Dependent on an Intact C-Terminus for Antibody Recognition. *Viruses*, v. 7, n. 6, p. 2943–2964, 8 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/7/6/2754>>. Acesso em: 12 set. 2018.
- GORKA, O. Walking over the inflammasome Endocytosis mediates the internalization of proteins and lipids at the plasma membrane and plays essential roles. *Nat Chem Biol* V.15, 552-553, jun. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41589-019-0292-8>>.
- GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In *Fields Virology: Sixth Edition (Vol. 1)*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP). p. 651- 686, 2013.
- HASBACH, E., HARTMAYER, C., & PLANZ, O. Antiviral Research Combination of MEK inhibitors and oseltamivir leads to synergistic antiviral effects after influenza A virus infection in vitro. *Antiviral Research*, v. 98, n. 2, p. 319 – 324, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.006>>.
- HIGASHI, N., MATSUMOTO, A., TABATA, K., & NAGATOMO, Y. Electron microscope study of development of Chikungunya virus in green monkey kidney stable (VERO) cells. *Virology*, v. 33, n. 1, p. 55 – 69, 1967. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90093-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90093-1)>.
- ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/>>. Acesso em: mar de 2020.

- IP, W. K. E., & MEDZHITOV, R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nature Communications*, v. 6, n. 1, p. 1 – 11, 2015 Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncomms7931>>.
- JÄNNE, P. A., VAN DEN HEUVEL, M. M., BARLESI, F., COBO, M., MAZIERES, J., CRINÓ, L., ... VANSTEENKISTE, J. Selumetinib plus docetaxel compared with docetaxel alone and progression-free survival in patients with KRAS-mutant advanced non-small cell lung cancer: The SELECT-1 randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, v. 317, n. 18, p. 1844 – 1853, 2017. Disponível em: < <https://doi.org/10.1001/jama.2017.3438>>.
- JOHNSON, K. E.; CHIKOTI, L.; CHANDRAN, B. Herpes Simplex Virus 1 Infection Induces Activation and Subsequent Inhibition of the IFI16 and NLRP3 Inflammasomes. *Journal of Virology*, v. 87, n. 9, p. 5005 – 5018, 1 maio 2013.
- JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. Replication and Assembly. *Review Literature And Arts Of The Americas*, p. 837–856, 2009.
- JOUBERT, P.-E. *et al.* Inhibition of mTORC1 Enhances the Translation of Chikungunya Proteins via the Activation of the MnK/eIF4E Pathway. *PLOS Pathogens*, v. 11, n. 8, p. e1005091, 28 ago. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005091>>. Acesso em: 2 out. 2018.
- KALLIO, K. *et al.* RNA Replication and Membrane Modification Require the Same Functions of Alphavirus Nonstructural Proteins. *Journal of Virology*, v. 90, n. 3, p. 1687–1692, 2016. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02484-15>>.
- KATZ, M.; AMIT, I.; YARDEN, Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1161–1176, 1 ago. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488907000043>>. Acesso em: 21 set. 2018.
- KELLEY, N. *et al.* The NLRP3 inflammasome: An overview of mechanisms of activation and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. [S.l.]: MDPI AG. , 1 jul. 2019.
- KREJBICH - TROTOT, P. *et al.* Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. *The FASEB Journal*, v. 25, n. 1, p. 314 – 325, 29 jan. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.10-164178>>. Acesso em: 3 mar. 2020.
- KOPETZ, S., GROTHEY, A., YAEGER, R., VAN CUTSEM, E., DESAI, J., YOSHINO, T., ... TABERNERO, J. Encorafenib, binimetinib, and cetuximab in BRAF V600E – mutated colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 381, n. 17, p.

- 1632 – 1643, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908075>>.
- KURIAKOSE, T.; KANNEGANTI, T. Regulation and functions of NLRP3 inflammasome during influenza virus infection. *Molecular Immunology*, v. 86, p. 56 – 64, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2017.01.023>>.
- 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.
- KUMAR, R. *et al.* Role of MAPK/MNK1 signaling in virus replication. *Virus Research*, v. 253, n. April, p. 48–61, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.028>>.
- KUMAR, S., GIRY, C., KERILLIS, L. C. DE, M, A., GASQUE, P., & HOARAU, J. Mouse macrophage innate immune response to chikungunya virus infection. *Virology Journal*, v. 9, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-313>>.
- LEE, R. H. C., HUSSAIN, K. M., JANG, J., & CHU, H. Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 13, n. 8, p. 1 – 19, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007610>>.
- LIAN, T., LI, C., & WANG, H. Trametinib in the treatment of multiple malignancies harboring MEK1 mutations. *Cancer treatment reviews*, 81, 101907, 2019.
- LIESKE, N. V. *et al.* Targeting Tuberculosis and HIV Infection-Specific Regulatory T Cells with MEK/ERK Signaling Pathway Inhibitors. *PLOS ONE*, v. 10, n. 11, p. e0141903, 6 nov. 2015. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141903>>. Acesso em: 3 mar. 2020.
- LIU, F. *et al.* Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 8, n. 4, p. 552–562, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2018.01.008>>.
- LIU, T. *et al.* Zika virus infection induces acute kidney injury through activating NLRP3 inflammasome via suppressing Bcl-2. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. AUG, p. 1 – 17, 2019.
- LIU, W. *et al.* Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host and Microbe*, v. 19, n. 6, p. 775 – 787, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.024>>.
- LUCHS, A.; PANTALEÃO, C. Apoptose e modelos in vivo para estudo das moléculas relacionadas a este fenômeno Apoptosis and in vivo models to study the molecules related to this phenomenon. *Apoptosis*, v. 8, p. 495 – 497, 2010.
- LUM, F. M.; NG, L. F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya

- pathogenesis. *Antiviral Research*, v. 120, p. 165–174, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.009>>.
- LUNDBERG, L. *et al.* Repurposed FDA-Approved drug sorafenib reduces replication of Venezuelan equine encephalitis virus and other alphaviruses. *Antiviral Research*, v. 157, n. May, p. 57–67, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.07.005>>.
- MANGAN, M. S. J., OLHAVA, E. J., ROUSH, W. R., & SEIDEL, H. M. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. v. 17, n. 8, p. 588-606, ago. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97>>.
- MATTOSCIO, D.; SEGRÉ, C. V.; CHIOCCA, S. Viral manipulation of cellular protein conjugation pathways: The SUMO lesson. *World journal of virology*, 2(2), 79, 2013.
- MORRISON, D. K. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 4, n. 11, p. a011254, 1 nov. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125017>>. Acesso em: 21 set. 2018.
- MURUGAN, S.B; SATHISHKUMAR, R. Chikungunya infection: A potential re-emerging global threat. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 10, p. 933–937, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.020>>.
- NAYAK, T. K., MAMIDI, P., KUMAR, A., & SINGH, L. P. K. ([s.d.]). Regulation of Viral Replication , Apoptosis and Chikungunya Virus Infection in Macrophages. *Viruses*, v. 9, n. 1, p. 1 - 21, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/v9010003>>.
- NUNES, M. R. T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. *BMC Medicine*, v. 13, n. 1, 2015.
- OLIVEIRA, L.C.; RIBEIRO, A.M.; ALBARNAZ, J.; TORRES, A.A.; GUIMARÃES, L.F.Z.; PINTO, A.K.; PARKER, S.; DORONIN, K.; BRIEN, J.D.; BULLER, M.R.; BONJARDIM, C.A. The small molecule AZD6244 targeting mek inhibits dengue virus replication *in vitro* and protects against lethal challenge mouse model. *Archives of Virology*, 165, 671-681, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04524-7>>
- ONG, R. Y.; LUM, F. M.; NG, L. F. P. The fine line between protection and pathology in neurotropic flavivirus and alphavirus infections. *Future Virology*, v. 9, n. 3, p. 313–330, 2014.
- PAUL, D.; BARTENSCHLAGER, R. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World journal of virology*, v. 2, n. 2, p. 32, 2013.
- PERWITASARI, O., YAN, X., O'DONNELL, J., JOHNSON, S., & TRIPP, R. A. Repurposing kinase inhibitors as antiviral agents to control influenza A virus replication. *Assay and drug development technologies*, v. 13, n. 10, p. 638-649, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4692129/>>.

- PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Current perspectives Control of immunopathology during chikungunya virus infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 135, n. 4, p. 846–855, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.039>>.
- PIZÓN, C.E; SERRANO, M.L; SANABRIA, M.C. Papel de la vía fosfatidilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Rev. Cienc. Salud* . v 7, n2. Bogotá May/Aug. 2009. Disponível em: www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-72732009000200007.
- PLOTNIKOV, A. *et al.* The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1813, n. 9, p. 1619–1633, 1 set. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910003228>>. Acesso em: 2 ago. 2018.
- POLLASTRI, M. P.; CAMPBELL, R. K. Target repurposing for neglected diseases. *Future medicinal chemistry*, v. 3, n. 10, p. 1307 – 1315, 2011.
- POWERS, A. M.; LOGUE, C. H. Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*, v. 88, n. 9, p. 2363–2377, 2007.
- PRESTI, A. *et al.* Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 7, n. 12, p. 925–932, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60164-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60164-4)>.
- PRESTI, A. *et al.* Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of Chikungunya virus: An updating review. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 41, p. 270–278, 2016.
- PRITCHETT, J. C.; NAESENS, L.; MONTOYA, J. Treating HHV-6 Infections: The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. The Laboratory Efficacy and Clinical Use of Anti-HHV-6 Agents. [S.l.]: Elsevier B.V., 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-62703-2.00019-7>>.
- RAUCH, N. *et al.* MAPK kinase signalling dynamics regulate cell fate decisions and drug resistance. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 41, p. 151–158, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.019>>.
- RAMSEY, J.; MUKHOPADHYAY, S. Disentangling the Frames, the State of Research on the Alphavirus 6K and TF Proteins. *Viruses*, v. 9, n. 8, p. 228, 18 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/9/8/228>>. Acesso em: 18 mar. 2020.
- REIS, V.S. *Avaliação do papel da via de sinalização MEK/ERK no ciclo de multiplicação do chikungunya virus e do potencial antiviral de inibidor farmacológico da via*. 2019. 86 p. Exame de Qualificação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

- REQUENA, R.; VARGAS, M.; CHIRALT, A. Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. *LWT*, v. 101, p. 183–190, 1 mar. 2019.
- REZZA, G.; WEAVER, S. C. Chikungunya as a paradigm for emerging viral diseases: Evaluating disease impact and hurdles to vaccine development. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. [S.l.]: Public Library of Science. , 2019.
- RIBEIRO, A.M. *Avaliação da atividade antiviral do inibidor farmacológico AZD6244 da via sinalizadora celular MEK 1 no ciclo de multiplicação do Dengue vírus, e seu possível efeito terapêutico em modelo murino AG129*. 2015. 105 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.
- RIVERO, H.J.V. *Avaliação da Atividade Antiviral de Selumetinib, Trametinib, Saracatinib e Bosutinib contra o Dengue Virus, Zika Virus e Yellow Fever Virus: Foco nas Etapas do Ciclo de Multiplicação do Isolado Zika Pe-243*. 2019. 153 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.
- ROBERTS, G. C. *et al.* Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in Chikungunya virus research. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 14641, 7 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-15269-w>>. Acesso em: 28 ago. 2018.
- RODRIGUEZ, M. E. *et al.* Raf/MEK/ERK pathway activation is required for Junin virus replication. *Journal of General Virology*, v. 95, n. Pt_4, p. 799–805, 1 abr. 2014. Disponível em: <<http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.061242-0>>. Acesso em: 1 out. 2018.
- ROSKOSKI, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacological Research*. [S.l.]: Academic Press. , 1 fev. 2020.
- ROUGERON, V. *et al.* Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *Journal of Clinical Virology*, v. 64, p. 144–152, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.032>>.
- RUPP, J. C. *et al.* Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology*, v. 96, n. 9, p. 2483–2500, 2015.
- SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. *Toxicology in Vitro*, v. 3, n. 4, p. 317–321, 1989.
- SCHILTE, C. *et al.* Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 3, p. e2137, 21 mar. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002137>>. Acesso em: 22 set. 2018.

- 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.
- SCHOR, S.; EINAV, S. Repurposing of Kinase Inhibitors as Broad-Spectrum Antiviral Drugs. *DNA and Cell Biology*, v. 37, n. 2, p. 63 – 69, 2018.
- SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. *Cell*. [S.l.]: Elsevier., 19 mar. 2010.
- SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2368>>.
- SCREENING, P.; BIOACTIVE, O. F.; MUSHROOM, E. World Journal of Pharmaceutical Research. v. 4, n. 5, p. 1603–1618, 2015.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Boletim Epidemiológico. v.48, n.3, 2017. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-v--rus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>. Acesso em: 02 mar 2020.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. v.49, n.2, 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>. Acesso em : 02 mar 2020.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. v.50, 2019. Disponível em : <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>. Acesso em : 02 mar 2020.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE – MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (dengue, chikungunya e Zika), Semanas Epidemiológicas 01 a 52. v.51, 2020. Disponível em : <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>. Acesso em : 02 mar 2020.
- SHARMA, A. *et al.* Miltefosine inhibits Chikungunya virus replication in human primary dermal fibroblasts. *F1000Research*, v. 7, p. 9, 2018. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/7-9/v1>>.
- SHARMA, A.; BALAKATHIRESAN, N. S.; MAHESHWARI, R. K. Chikungunya Virus

- Infection Alters Expression of MicroRNAs Involved in Cellular Proliferation, Immune Response and Apoptosis. *Intervirology*, v. 58, n. 5, p. 332–41, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26829480>>. Acesso em: 2 out. 2018.
- SHARMA, D., & KANNEGANTI, T. D. . The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*, v. 213, n. 6, p. 617 – 629, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>>
- SHAUL, Y. D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1213–1226, 2007.
- SHIRLEY, M. Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs*, v. 78, n. 12, p. 1277 – 1284, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40265-018-0963-x>>.
- SHRIVASTAVA, G., JUÁREZ, M, L., CORDERO, J, G., Sánchez, D, M, E., & BARRÓN, L, C. Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunologic research*, v. 64, n. 5-6, p. 1101-1117, 2016. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s12026-016-8873-z>>.
- SILVA, J.V.J.; LUDWIG-BEGALL, LF; OLIVEIRA-FILHO, E.F; OLIVEIRA, R.A.S.; DURÃES-CARVALHO, R.; LOPES, T.R.R.; SILVA, D.E.A.; GIL, L.H.V.G. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta Tropica*. 2018. Disponível em: <[10.1016/j.actatropica.2018.09.003](http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.09.003)>.
- SILVA, N. M. DA *et al.* Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 27, p. e2017127, 3 set. 2018. Disponível em: <<https://www.scielosp.org/article/ress/2018.v27n3/e2017127/pt/>>. Acesso em: 19 set. 2018.
- SILVA, L. A.; DERMODY, L. Chikungunya virus : epidemiology , replication , disease mechanisms , and prospective intervention strategies Find the latest version : Chikungunya virus : epidemiology , replication , disease mechanisms , and prospective intervention strategies. v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.
- SILVA, B. V. *et al.* Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova*, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000200032&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 23 set. 2018.
- SILVA, P.N. *et al.* Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochemical Journal* 398(1): 83-95. 2006.
- SIMS, J. T.; PLATTNER, R. MTT assays cannot be utilized to study the effects of STI571/Gleevec on the viability of solid tumor cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 64, n. 3, p. 629–633, jul. 2009.

- SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Reviews in Medical Virology*, v. 21, n. 2, p. 78–88, 1 mar. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.681>>. Acesso em: 20 set. 2018.
- ŚLIWKA, L. *et al.* The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions. *PLoS ONE*, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.
- SOARES, J. A. P. ; LEITE, F. G. G. ; ANDRADE, L. G. ; TORRES, A. A. ; DE SOUSA, L. P. ; BARCELOS, L. S. ; TEIXEIRA, M. M. ; FERREIRA, P. C. P. ; Kroon, E G ; SOUTO-PADRON, T. ; BONJARDIM, C. A. . Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infection is required for both host survival and viral replication. *Journal of Virology* , p. 1-11, 2009.
- SOLIGNAT, M. *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology*, v. 393, n. 2, p. 183–197, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.024>>.
- SOURISSEAU, M. *et al.* Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 6, p. e89, 2007. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030089>>. Acesso em: 28 ago. 2018.
- SPUUL, P. *et al.* Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells. *Journal of virology*, v. 85, n. 10, p. 4739–51, 15 maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21389137>>. Acesso em: 12 set. 2018.
- STOCKERT, J. C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, v. 114, n. 8, p. 785–796, 2012.
- STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.
- SUHRBIER, A.; JAFFAR-BANDJEE, M. C.; GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses-an overview. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 8, n. 7, p. 420–429, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2012.64>>.
- SUMITANI, K. *et al.* Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2 production. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 30, n. 1, p. 41 – 47, jan. 2001. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-0714.2001.300107.x>>. Acesso em: 19 jan. 2020.
- SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* v 19, 477 – 489, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>>.
- TAPIA-ABELLÁN, A. *et al.* MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an

- inactive state. *Nature Chemical Biology*, v. 15, n. 6, p. 560–564, 1 jun. 2019.
- TENG, T. S. *et al.* A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 2015.
- THIBERVILLE, S. D. *et al.* Chikungunya fever: Epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, v. 99, n. 3, p. 345–370, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.06.009>>.
- THOMAS, S. *et al.* Chikungunya virus capsid protein contains nuclear import and export signals. *Virology Journal*, v. 10, n. 1, p. 269, 28 ago. 2013. Disponível em: <<http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-269>>. Acesso em: 12 set. 2018.
- TSETSARKIN, K. A. *et al.* Epistatic Roles of E2 Glycoprotein Mutations in Adaption of Chikungunya Virus to *Aedes Albopictus* and *Ae. Aegypti* Mosquitoes. *PLoS ONE*, v. 4, n. 8, p. e6835, 31 ago. 2009. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006835>>. Acesso em: 19 set. 2018.
- VAN CUTSEM, E., HUIJBERTS, S., GROTHEY, A., YAEGER, R., CUYLE, P.-J., ELEZ, E., ... TABERNERO, J. Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Safety Lead-In Results From the Phase III BEACON Colorectal Cancer Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 37, n. 17, p. 1460 – 1469, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1200/JCO.18.02459>>.
- 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, 2016. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01382-16>>.
- VOSS, J.E; VANEY, M.C; DUQUERROY, S.; VONRHEIN, C., *et al.* Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. v. 468, n. 7324, p. 709-712, 2010. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature09555>
- VIGNUZZI, M.; HIGGS, S. The Bridges and Blockades to Evolutionary Convergence on the Road to Predicting Chikungunya Virus Evolution. *Annual Review of Virology*, v. 4, n. 1, p. 181–200, 2017. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-101416-041757>>.
- WADA, T.; PENNINGER, J. M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*, v. 23, n. 16, p. 2838–2849, 12 abr. 2004. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1207556>>. Acesso em: 21 set. 2018.
- WADA, Y. *et al.* Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. *Virology*, v. 505, n. February, p. 102–112, 2017.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2017.02.014>>.

WAHID, B. *et al.* Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 58, p. 69–76, 2017.

WAKELIN, L. P. G. *et al.* Interaction of Crystal Violet with Nucleic Acids. *Biochemistry*, v. 20, n. 20, p. 5779 – 5787, 1981.

WEAVER, S. C. *et al.* Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*, v. 94, n. 3, p. 242–257, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002>>.

WEAVER, S. C.; FORRESTER, N. L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research*, v. 120, p. 32–39, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>>.

WOODFIELD, S. E., ZHANG, L., SCORSONE, K. A., LIU, Y., & ZAGE, P. E. Binimetinib inhibits MEK and is effective against neuroblastoma tumor cells with low NF1 expression. *BMC Cancer*, v. 16, n. 1, p. 172, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12885-016-2199-z>>.

WONG, K. Z.; CHU, J. J. H. *The interplay of viral and host factors in chikungunya virus infection: Targets for antiviral strategies*. [S.l.: s.n.], 2018. v. 10.

WU, P.; NIELSEN, T.E.; CLAUSEN, M.H. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discovery Today*, v. 21, n. 1, p. 5-10, 2016.

WU, M. F. *et al.* CLEC5A is critical for dengue virus-induced inflammasome activation in human macrophages. *Blood*, v. 121, n. 1, p. 95–106, 3 jan. 2013.

XU, Y. *et al.* Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 39, n. 6, p. 268–276, 2014.

YEH, T. C. *et al.* Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clinical Cancer Research*, v. 13, n. 5, p. 1576–1583, 1 mar. 2007.

ZEISER, R.; ANDRLOVÁ, H.; MEISS, F. Trametinib (GSK1120212). In: *Small Molecules in Oncology*. Springer, Cham, 2018. p. 91-100.

ZHANG, X.; GONCALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Current Protocols in Immunology*. [S.l.]: NIH Public Access. , 2008

ZHANG J.; YANG P.L.; GRAY, N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer*. 9: 28-39, 2009.

ZHANG, R. et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, v. 557, n. 7706, p. 570 – 574, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>>.

ZHANG, R. et al. Expression of the Mxra8 Receptor Promotes Alphavirus Infection and Pathogenesis in Mice and Article Expression of the Mxra8 Receptor Promotes Alphavirus Infection and Pathogenesis in Mice and Drosophila. *CellReports*, v. 28, n. 10, p. 2647- 2658.e5, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.105>>.

ZHANG, X., HUANG, Y., WANG, M., YANG, F., WU, C., HUANG, D., ... ZHANG, R. Differences in genome characters and cell tropisms between two chikungunya isolates of Asian lineage and Indian Ocean lineage. *Virology Journal*, v. 15, n. 1, p. 1 – 10, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12985-018-1024-5>>.

ZHANG, Z. X. et al. BRAF kinase inhibitor exerts anti-tumor activity against breast cancer cells via inhibition of FGFR2. *American journal of cancer research*, v. 6, n. 5, p. 1040 – 52, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27293997>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

ZAHID, A. et al. Pharmacological inhibitors of the nlrp3 inflammasome. *Frontiers in Immunology*. [S.l.]: *Frontiers Media S.A.* , 2019.

9 ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

COMPROVANTE

Comprovamos o recebimento da solicitação de uso de animais para o projeto intitulado "Avaliação de inibidores farmacológicos da via de sinalização de MEK/ERK no ciclo de multiplicação do Chikungunya vírus", protocolo do CEUA: 7/2019 sob a responsabilidade de Claudio Antonio Bonjardim que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino).

Belo Horizonte, 23/04/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br