

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE**

PABLO CANTALICE SANTOS FARIAS

**PAPEL DA CASPASE-1 NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS
CHIKUNGUNYA**

**RECIFE
2019**

PABLO CANTALICE SANTOS FARIAS

PAPEL DA CASPASE-1 NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS
CHIKUNGUNYA

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado Acadêmico em Biociências e
Biotecnologia em Saúde, do Instituto
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Freitas de Oliveira França

RECIFE

2019

FICHA

PABLO CANTALICE SANTOS FARIAS

PAPEL DA CASPASE-1 NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO VÍRUS
CHIKUNGUNYA

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado Acadêmico em Biociências e
Biotecnologia em Saúde, do Instituto
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 11/04/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Rafael Freitas de Oliveira França
Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes Fonseca
Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Débora Regina Lopes dos Santos
Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária/UFRRJ

Dedico este trabalho aos meus amigos
do laboratório, que me inspiraram e me
ajudaram nesse curso.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer à minha família, em especial minha mãe Valéria da Luz, por ter investido no meu ponta pé inicial: a entrada na universidade (o primeiro degrau da escada acadêmica).

Gostaria de agradecer também ao meu orientador, Rafael França, por ter me dado a oportunidade de fazer um mestrado em uma área que eu já almejava conhecer sobre desde a graduação, à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), por ter também me concedido essa oportunidade, porém no âmbito financeiro, e à Fiocruz Pernambuco, em especial o programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde (BBS), pela infraestrutura para realização dos meus trabalhos e pela disponibilidade para sanar qualquer dúvida ou problema. Aos professores do programa BBS que nos passaram conteúdos com muito boa vontade, nos estimularam a pensar e a prosseguir nessa carreira que não é fácil.

Aos membros da banca, Renato e Clarice (titulares), Joelma e Milena (suplentes) por estarem dispostos a contribuir com meu trabalho, fazendo as devidas correções.

Aos meus amigos de grupo (Team Papito), em especial Elidiane, que me ensinou a trabalhar com cultura de células; Elisa e Morganna, que me ensinaram a fazer ELISA e a usar o citômetro. Em especial também a Zé Valter, que não pertence a este grupo, mas também foi uma pessoa muito importante que me fez aprender de uma maneira simples, a fazer imunofluorescência (algo que eu sonhava em aprender a fazer). Aos demais do Team (Armando, Pêu, Renan, Thaís e Thaíse, Sayo, Suzy, Leila, Aline e Gabi) eu também sou grato pelos momentos de reunião, debates sobre experimentos e troca de ideias, além de momentos de descontração, pelos encontros e festas, que me proporcionaram conforto nessa etapa tensa.

Não somente grato aos ensinamentos e aos momentos de conforto, mas melhor que isso, sou também grato aos momentos difíceis, que me fizeram aprender mais e mais, e essa experiência levarei pra sempre comigo.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

FARIAS, Pablo Cantalice Santos Farias. **Papel da caspase-1 na infecção experimental pelo vírus Chikungunya**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

O Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, transmitido por vetores do gênero *Aedes*. Os principais sintomas da febre Chikungunya incluem febre, artralgia severa, mialgia, cefaleia e exantemas, podendo ser detectados também casos envolvendo complicações neurológicas, como a Síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalite, mielite entre outras patologias do sistema nervoso central (SNC). Dessa forma, este trabalho visa identificar o papel da caspase-1 durante infecção pelo vírus Chikungunya buscando elucidar formas de prevenção às complicações, visto que ainda não há tratamentos específicos contra o vírus. Inicialmente, a infecção foi realizada em células de linhagem neuronal (SH-SY5Y) utilizando um MOI de 0,5. Para confirmação da infecção foi realizada imunofluorescência utilizando anticorpos específicos anti-CHIKV nos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas pós infecção (hpi). Nas mesmas condições foi avaliada a cinética de replicação do vírus por meio de ensaio de placa, onde foi observado um pico da replicação em 36 hpi. Ainda sob o contexto celular foi realizado o ensaio de morte celular, utilizando anexina V/7AAD, pelo qual foi observada uma taxa de morte crescente a partir de 36 hpi. Um dos elementos da via em estudo, a caspase-1, foi marcada nos diferentes tempos detectando-se uma crescente ativação. Além disso, níveis de IL-1 β foram dosados no sobrenadante observando-se uma diminuição nesses níveis em 36 e 48 hpi. Estudos prévios já demonstraram que de fato o CHIKV é capaz de infectar e se replicar em SH-SY5Y, porém, não se tem dados à respeito dos níveis de caspase-1 ativadas em cultura celular. Em relação aos níveis de IL-1 β , torna-se importante avaliar mecanismos anti-inflamatórios que possam estar envolvidos. O CHIKV é capaz de ativar caspase-1, porém necessita-se de mais estudos a fim de elucidar mecanismos imunológicos em 36 e 48 hpi.

Palavras-chave: Vírus Chikungunya. Caspase 1. Inflamassomos.

FARIAS, Pablo Cantalice Santos Farias. **Role of caspase-1 in experimental Chikungunya virus infection**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

Chikungunya (CHIKV) is an arbovirus of the family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*, transmitted by vectors of the genus *Aedes*. The main symptoms of Chikungunya fever include fever, severe arthralgia, myalgia, headache and exanthemas, and cases involving neurological complications such as Guillain-Barré syndrome, meningoencephalitis, myelitis and other central nervous system (CNS) pathologies may also be detected. Thus, this work aims to identify the role of caspase-1 during Chikungunya virus infection seeking to elucidate ways of preventing complications, since there are still no specific treatments against the virus. Initially, the infection was performed on neuronal lineage cells (SH-SY5Y) using a MOI of 0.5. For confirmation of infection, immunofluorescence was performed using specific anti-CHIKV antibodies at times of 12, 24, 36 and 48 hours post infection (hpi). Under the same conditions the kinetics of virus replication was evaluated by plaque assay, where a replication peak was observed at 36 hpi. Still under the cellular context was carried out the cell death assay, using annexin V / 7AAD, for which a growing death rate was observed from 36 hpi. One of the elements of the pathway under study, caspase-1, was marked at different times by detecting increased activation. In addition, IL-1 β levels were measured in the supernatant, with a decrease in these levels by 36 and 48 hpi. Previous studies have shown that in fact CHIKV is capable of infecting and replicating in SH-SY5Y, however, no data are available on activated caspase-1 levels in cell culture. Regarding IL-1 β levels, it becomes important to evaluate anti-inflammatory mechanisms that may be involved. CHIKV is able to activate caspase-1, but further studies are needed to elucidate immunological mechanisms at 36 and 48 hpi.

Key words: Chikungunya Virus. Caspase-1. Inflammassomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética do CHIKV para sequências nucleotídicas da proteína E1	20
Figura 2 - Mapa da distribuição endêmica do CHIKV, ocasionada pelos <i>Ae. aegypti</i> e <i>Ae. albopictus</i>	22
Figura 3 - Inibição da tradução pela proteína nsP2, e da formação de grânulos de estresse pela nsP3, através da degradação da subunidade RPB1 da RNA polimerase II e ligação ao G3BP, respectivamente	23
Figura 4 - Mapa do genoma e subgenoma do CHIKV	24
Figura 5 - Ciclo de replicação do CHIKV	27
Figura 6 - Ciclos de transmissão urbano e silvático do CHIKV	28
Figura 7 - Algoritmo evidenciando a correlação entre os testes moleculares e baseado em pesquisa de IgM.....	32
Figura 8 - Mecanismo de ativação dos sensores do tipo Toll e RLRs.....	37
Figura 9 - Diferentes mecanismos de ativação da via do inflamassoma levando à secreção final de IL-1 β	40
Figura 10 - Aspectos morfológicos das células SH-SY5Y em cada intervalo de tempo de infecção (MOI 0,5)	47
Figura 11 - Microscopia de imunofluorescência evidenciando antígeno do CHIKV (poliproteína estrutural) em células SH-SY5Y em um aumento de 10X	49
Figura 12 - Gráfico de cinética de replicação viral apresentando a curva de replicação em todos os intervalos de tempo previstos	50
Figura 13 - Análise realizada no FACS Aria III para identificação da população em apoptose na cultura de células SH-SY5Y.	51
Figura 14 - Análise de viabilidade celular nos diferentes tempos pós-infecção para células submetidas a LPS e ao vírus, além do controle (não-infectado)	52
Figura 15 - Marcação de caspase-1, nos diferentes tempos pós-infecção/indução	53
Figura 16 - Análise por histograma dos níveis de caspase-1 marcados ao longo do ensaio. Análises realizadas para LPS (indutor da ativação da via), células infectadas e controle (não-	

infectados)	53
Figura 17 - Ensaio ELISA direto para pesquisa da citocina pró-inflamatória IL-1 β	90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Manifestações típicas e atípicas da febre Chikungunya em pacientes	29
Quadro 2 - Diagnóstico diferencial Chikungunya x Dengue	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 7-AAD - *7-aminoactinomycin D*
- Ae - *Aedes*
- Ala - Alanina
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- BHK-21 - *Baby hamster kidney cell*
- CHIKV - *Chikungunya Virus*
- CLEC4M - *C-type lectin domain family 4 member M*
- CPV-I - *Cytopathic Vacuoles Type I*
- CPV-II - *Cytopathic Vacuoles Type II*
- CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- DC-SIGN - *Dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*
- ECSA - *East/Central/ South African*
- eIF2 α - *Eukaryotic translation initiation factor 2 α*
- ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
- FITC - *Fluorescein isothiocyanate*
- G3BP - *Ras GTPase-activating protein-binding protein*
- GAG - Glicosaminoglicano
- hpi – *Hours post infection*
- IAM – Instituto Aggeu Magalhães
- ICAM3 - *Intercellular adhesion molecule 3*
- IFIT1 - *Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1*
- IFN- β – Interferon β
- IgM – Imunoglobulina M
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-1 β – Interleucina 1 β
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-8 – Interleucina 8
- IOL – *Indian Ocean Lineage*
- IRES - *Internal ribosome entry site*
- ISG - *Interferon-stimulated genes*
- JAK – *Janus Kinase*

LaViTE – Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
LLC-MK2 - *Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells*
LPS - Lipopolissacarídeo
L-SIGN - *Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*
MCP-1 - *Monocyte Chemoattractant Protein-1*
MOI - *Multiplicity of infection*
MV – *Measles Virus*
MX1 - *MX Dynamin Like GTPase 1*
NALP3 - *NLR family pyrin domain containing 3*
NB2 – *Nível de Biossegurança 2*
NK – *Natural Killer*
nsP – *Non-structural protein*
OMS – *Organização Mundial da Saúde*
OPG - *Osteoprotegerina*
ORF – *Open Reading Frame*
PAHO – *Pan American Health Organization*
PAMPs - *Pathogen-associated molecular pattern*
PB – *Paraíba*
PBS - *Phosphate buffered saline*
PFU - *Plaques-forming unit* (Unidade formadora de placa)
PHB – *Prohibitin*
RANKL - *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*
RE – *Retículo Endoplasmático*
ROS – *Reactive oxygen species*
RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*
SESA – *Secretaria de Saúde do*
Amapá SFB – *Soro Fetal Bovino*
SFV – *Semliki Forest Virus*
SGB – *Síndrome de Guillain-Barré*
SINV – *Sindbis Virus*
STAT1 - *Signal transducer and activator of transcription 1*
STAT2 - *Signal transducer and activator of transcription 2*
TF - *Transframe*

TLR – *Toll-like receptor*

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor α*

U87-MG - *Uppsala 87 Malignant Glioma*

UTR – *Untranslated Region*

VEEV – *Venezuelan Equine Encephalitis Virus*

VLP – *Virus-like Particles*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL	19
2.1 Descoberta e Epidemiologia do CHIKV	19
2.2 Estrutura e Genoma Viral	23
2.3 Ciclo de Replicação	25
2.4 Transmissão	27
2.5 Sinais e Sintomas Clínicos	28
2.6 Diagnóstico	30
2.6.1 Reação em Cadeia da Polimerase - Transcriptase Reversa (RT-PCR)	31
2.6.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	32
2.6.3 Isolamento viral	32
2.6.4 Tratamento e vacinas	33
2.7 Resposta Imune Frente à Infecção por Chikungunya	35
3 JUSTIFICATIVA	41
4 OBJETIVO GERAL	42
4.1 Objetivos Específicos	42
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	43
5.1 Produção e titulação do estoque de vírus	43
5.2 Infecção de células SH-SY5Y	44
5.3 Microscopia de imunofluorescência	44
5.4 Cinética de replicação viral	44
5.5 Viabilidade celular	45
5.6 Marcação de caspase-1	45
5.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)	45
5.8 Análise Estatística	46
6 RESULTADOS	47
6.1 Microscopia de imunofluorescência	48
6.2 Cinética de replicação viral	50
6.3 Viabilidade celular	51
6.4 Marcação caspase-1	52
6.5 Quantificação de IL-1 β em sobrenadante	54
7 DISCUSSÃO	55

8 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE A – Chikungunya virus infection induces caspase-1 activation in neuroblastoma lineage cells (SH-SY5Y)	77

1 INTRODUÇÃO

Isolado em 1952 em Makonde Plateau, na Tanzânia, o vírus Chikungunya (CHIKV) foi responsável por surtos importantes ao redor do globo. Inicialmente saindo da África subsaariana em direção à Ásia causando, na década de 60, surtos na Tailândia e na Índia (HALSTEAD et al., 1969). Após uma pausa epidêmica de aproximadamente 30 anos, novos surtos foram notificados na África e La Reunion (BORGHERINI et al., 2007; CHRETIEN et al., 2007; GERARDIN et al., 2008), se espalhando inclusive pela Europa, dando início a pequenos surtos no norte da Itália, em 2007 e sul da França, em 2010 (ANGELINNI et al., 2007; REZZA et al., 2007). Em 2013 o CHIKV foi reportado nas Ilhas Saint Martin, no Caribe, perfazendo um total de mais de 650 mil casos nesse ano em toda região do Caribe (LEPARC-GOFFART et al., 2014). Em 2014 o CHIKV chega ao Brasil causando surtos importantes alcançando mais de 200 mil casos na 32ª semana epidemiológica, sendo 25% desses restritos ao estado de Pernambuco (BRITO, 2017; BRITO; TEIXEIRA, 2017).

O CHIKV é um arbovírus, classificado dessa forma por ser transmitido por vetores artrópodes hematófagos do gênero *Aedes*, pertencente ao gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae* (GRATZ, 2004) é um vírus envelopado, dotado de um capsídeo icosaédrico e um genoma de RNA fita simples, não-segmentado, senso positivo com tamanho aproximado de 12 Kb (JACOBS et al., 2017; TRICOU et al., 2017).

O seu genoma é dividido em dois quadros abertos de leitura (ORFs), uma abrangendo proteínas não estruturais nsP1-4, responsáveis pelos processos de replicação do vírus, e outra abrangendo todas as proteínas estruturais [capsídeo (C), envelope (E1, E2) e dois importantes peptídios (6K e E3)]. Seu genoma é flanqueado por duas regiões não traduzidas (UTRs), uma de 76 nucleotídeos localizada na extremidade 5'cap e outra de 526 nucleotídeos na extremidade poliadenilada (SOLIGNAT et al., 2009; TAYLOR et al., 2017; THOKA et al., 2018).

O hospedeiro humano, quando infectado, passa por um período de incubação de 3 a 7 dias (OMS, 2015). Logo após esse período surgem os sintomas da doença, que são sintomas comuns a outras arboviroses, como cefaleia, exantemas, fadiga e febre súbita acompanhada de severa poliartralgia, além de manifestações cutâneas como hiperpigmentação e lesões vesicobolhosas, e manifestações neurológicas como síndrome de Guillain-Barré, mielite e meningoencefalite (CUNHA; TRINTA, 2017; GERARDIN et al., 2016; PINHEIRO et al., 2016; PUENTE-PABLO et al., 2017).

Ainda não se sabe com exatidão quais mecanismos imunopatogênicos estão envolvidos

nas manifestações neurológicas ocasionadas pelo CHIKV, porém várias vias pró-inflamatórias que estão envolvidas na sua patogênese já tem sido descritas, como as vias de ativação e sinalização do interferon do tipo I (LUM; NG, 2015; WILSON et al., 2017) além de genes antivirais relacionados, como viperina (TENG et al., 2012), Mx1 (LANDIS et al., 1998) e Ifit1 (REYNAULD et al., 2015); e a via do inflamassoma, a qual é associada à gravidade da poliartralgia característica da doença e à degeneração óssea (CHEN et al., 2017; EKCHARIYAWAT et al., 2015). Durante o início da infecção, o CHIKV é capaz de ativar receptores do tipo Toll; como os TLR3, 7 e 8; através do reconhecimento de seu material genético por aqueles; bem como os RLRs, como por exemplo o RIG-I e o MDA5 (PRIYA; PATRO; PARIDA, 2014; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Dessa forma, esses sensores desencadearão na ativação de uma cascata de resposta pró-inflamatória, ativando proteínas mediadoras como TRAFs 3 e 6 e fatores de transcrição como IRFs 3 e 7, que irão ativar a transcrição do IFN tipo I, além da transcrição de citocinas e quimiocinas relacionadas, estabelecendo assim, o estado antiviral na região de infecção (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Entre as citocinas transcritas há a IL-1 β , uma citocina pró-inflamatória muito importante, que irá estimular a retroalimentação do IFN tipo I por meio da sua ligação ao seu receptor específico (IL-1R), ativando o fator de transcrição NF- κ B, que ativará transcrição de mais IFN tipo I (HOARAU et al., 2010; NG et al., 2009; SCHWARTZ; ALBERT, 2010). É nesse contexto onde torna-se relevante a participação da caspase-1 na imunopatogênese da febre chikungunya. Essa protease possui papel relevante na inflamação por ser ativada por um complexo multiproteico, os inflamassomas, e por participar da maturação da IL-1 β (RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012). Esses componentes fazem parte da via dos inflamassomas, uma via pró-inflamatória de grande relevância tanto no contexto de doenças infecciosas bacterianas, como virais, além de alarmes celulares (CHEN et al., 2017; DIKSHIT et al., 2017; MARTINON, 2010). Ainda não são conhecidos mecanismos intracelulares exatos pelos quais o vírus consegue ativá-la, mas sabe-se que o sensor citoplasmático mais estudado no contexto das doenças infecciosas virais é o NLRP3 (ALLEN et al., 2009; CHEN et al., 2017; WANG et al., 2018). Uma vez ativado, o NLRP3 ativa uma proteína adaptadora da via, a ASC, que irá ativar o complexo do inflamassoma, gerando recrutamento de pró-caspase-1, que sofre maturação para caspase-1 ativa, que juntamente com as caspases-4 e 5 estará envolvida na maturação da IL-1 β (a partir da pró-IL-1 β), que será finalmente liberada da célula para exercer suas funções pró-inflamatórias (RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012).

2 REFERENCIAL TEÓRICO CONCEITUAL

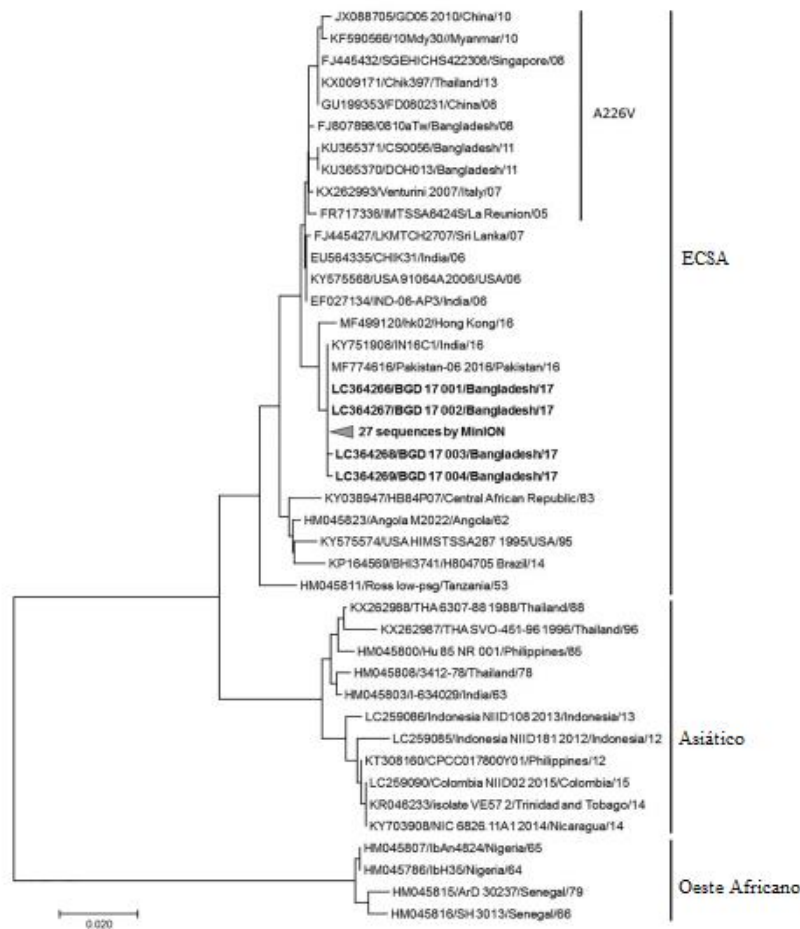
O uso de linhagem neuronal em culturas *in vitro* surge justamente para suprir o limitado número de passagens no uso de cultura primária. A SH-SY5Y é uma sublinhagem derivada da terceira subclonagem de SK-N-SH, esta oriunda de uma biópsia de tumor metastático, depositada na ATCC em 1970 por June L. Biedler. Consiste em uma cultura de células semiaderentes que podem ser cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% penicilina/estreptomicina, e mantimento em estufa úmida, 5% CO₂, 37°C.

Sob condições ideais de cultura, essa linhagem apresenta um tempo de duplicação populacional de 27 horas e uma saturação de confluência de $> 1 \times 10^6$ células/cm² (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013).

2.1 Descoberta e Epidemiologia do CHIKV

A febre Chikungunya já foi confundida com a dengue no início da década de 50 quando muitas regiões da África sofriam com os primeiros surtos. Isolado em Makonde Plateau, Tanzânia, no ano de 1952 por vários pesquisadores (dentre eles Sabin) (SABIN, 1950), o vírus foi a partir daí chamado Chikungunya (LUMSDEN, 1955). O nome Chikungunya significa “o que se curva” na linguagem Makonde (GUDO; BLACK; CLIFF, 2016), fazendo alusão a um dos sintomas característicos da doença, que é a intensa poliartralgia debilitante. Após o surto em Makonde Plateau, vários outros surtos foram identificados em outras regiões da África Subsaariana e Ásia. Estudos filogenéticos foram realizados e todos esses vírus responsáveis por estes surtos foram agrupados em um clado, denominado Leste/ Centro/ Sul Africano (ECSA) (POWERS et al., 2000; RAHMAN et al., 2017; VOLK et al., 2010) (figura 1).

Figura 1 - Árvore filogenética do CHIKV para sequências nucleotídicas da proteína E1.



Fonte: Rahman (2019, tradução nossa).

Nota: São demonstradas as diferentes importantes linhagens responsáveis pelos surtos ao redor do planeta.

A década de 60 também foi marcada por surtos na Tailândia (1962-1964) e Índia (1963-1964) (figura 2). Em 1974, outro surto na Índia teve considerável taxa de mortalidade alcançando 37,5% (MAVALANKAR et al., 2008). Após esses episódios, houve um período de pausa de epidemias do vírus durante 30 anos, provavelmente devido ao ganho de imunidade das populações dos respectivos locais (VOLK et al., 2010). Em 2004, novos surtos foram notificados na costa do Quênia, abrangendo as cidades de Mombaça e Lamu, se espalhando posteriormente para ilhas do oceano Índico em 2005, incluindo La Réunion, além do subcontinente indiano no mesmo período (BORGHERINI et al., 2007; CHRETIEN et al., 2007; GERARDIN et al., 2008; MAVALANKAR et al., 2007; RENAULT et al., 2007). À linhagem envolvida nos surtos nas ilhas do oceano Índico foi dado o nome de Linhagem do Oceano Índico (IOL), uma linhagem originada da linhagem ECSA (ARANKALLE et al., 2007; PAROLA et al., 2006; SHUFFENECKER et al., 2007). O mais bem estudado surto em

La Réunion abrangeu um número próximo a 300.000 casos (de uma popula o de 770.000 pessoas), e esse grande potencial de dissemina o se deve a muitos fatores incluindo viajantes infectados desembarcando na região, além da ausência de imunidade prévia ao vírus da popula o local;   muta o adaptativa (Ala 226 Val) na proteína E1 do vírus conferindo adapta o ao *Ae. albopictus* tornando-o potencial vetor naquela região; e   ampla densidade e distribui o desse vetor (BORGHERINI et al., 2007; GERARDIN et al., 2008; KUMAR et al., 2008; LAMBALLERIE et al., 2008; VAZEILLE et al., 2007).

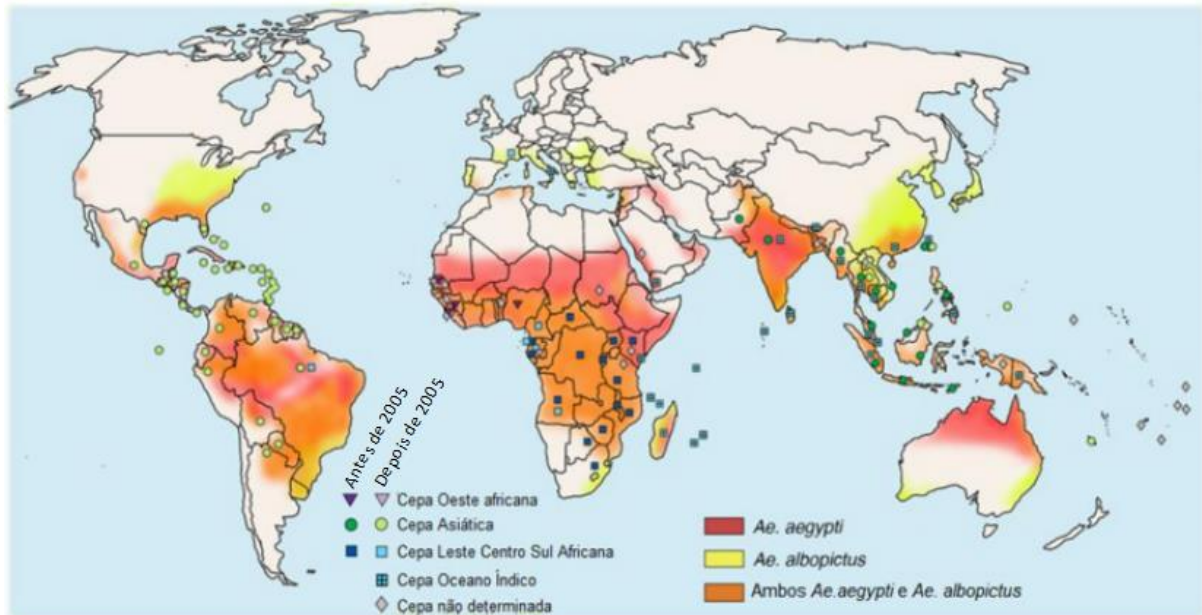
Durante a epidemia na Ásia ocasionada pela linhagem do Oceano Índico (IOL), muitos viajantes de l  espalharam o vírus para todas as regiões do globo. Isso resultou no início de pequenos surtos no norte da Itália em 2007, iniciado a partir de um viajante originado do  ndia (ANGELINNI et al., 2007; REZZA et al., 2007), e no sul da França em 2010, ambos transmitidos pelo vetor *Ae. albopictus*. Em 2008 e 2009 a epidemia ainda se espalhou provocando grandes surtos no sul da Tailândia, sendo notificados em torno de 50.000 casos associados à linhagem IOL (RIANTHAVORN et al., 2010) (figura 2).

Os primeiros casos autóctones de infec o no hemisfério oeste se deu na Ilha de Saint Martin em 2013 (LEPARC-GOFFART et al., 2014), e após isto o número de casos foram se espalhando por outras ilhas do Caribe, através de viajantes infectados de países ou ilhas ao redor daquela região, por meio do *Ae. aegypti*. Análises de sequenciamento foram efetuadas e foi visto que o genótipo circulante na região do Caribe era o asiático, provavelmente oriundo do Sudeste Asiático ou Oceania (LANCIOTTI; VALADERE, 2014). O mesmo genótipo foi relacionado filogeneticamente a outros isolados da China, em 2012, Yap entre 2013 e 2014, e Ilhas Virgens Britânicas, no ano de 2014 (LANCIOTTI; VALADERE, 2014), comprovando assim, o deslocamento desse genótipo do Leste Asiático em dire o ao Pacífico oeste. Em 2014, a Organiza o Mundial da Saúde (OMS) constatou mais de 650.000 casos autóctones na região, e dentro de um ano houve abrangência de 33 países americanos além da região do Caribe (ORGANIZA O PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2014) (figura 2).

No Brasil os primeiros casos autóctones ocorreram na cidade de Oiapoque, no Amapá, no dia 13 de setembro de 2014 (NUNES et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2014). Alguns dias mais tarde outros casos autóctones também foram relatados em Feira de Santana, na Bahia, originado a partir de um viajante virêmico vindo de Angola. Foi identificada a introdu o do genótipo ECSA através do mesmo viajante, o que divergia do genótipo asiático identificado em Oiapoque e circulante nas Américas (TEIXEIRA et al., 2014). Os números cresceram e em outubro do mesmo ano já eram notificados mais de 650 casos autóctones em todo país (BRAZILIAN HEALTH PORTAL, 2015) (figura 2). Enquanto o Brasil enfrentava um início

da epidemia, a Europa também notificava alguns casos (ao total 12 casos autóctones) da doença em Montpellier, na França, iniciados a partir de um viajante virêmico vindo de Camarões, infectado com o genótipo ECSA do vírus, apresentando a mutação adaptativa E1-Ala 226 Val, a qual permite-o ser transmitido pela espécie *Ae. albopictus*, já bem estabelecido em muitas regiões da Europa (DELISLE et al., 2015).

Figura 2 - Mapa da distribuição endêmica do CHIKV, ocasionada pelos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*.



Fonte: Silva e Dermody (2017, tradução nossa)

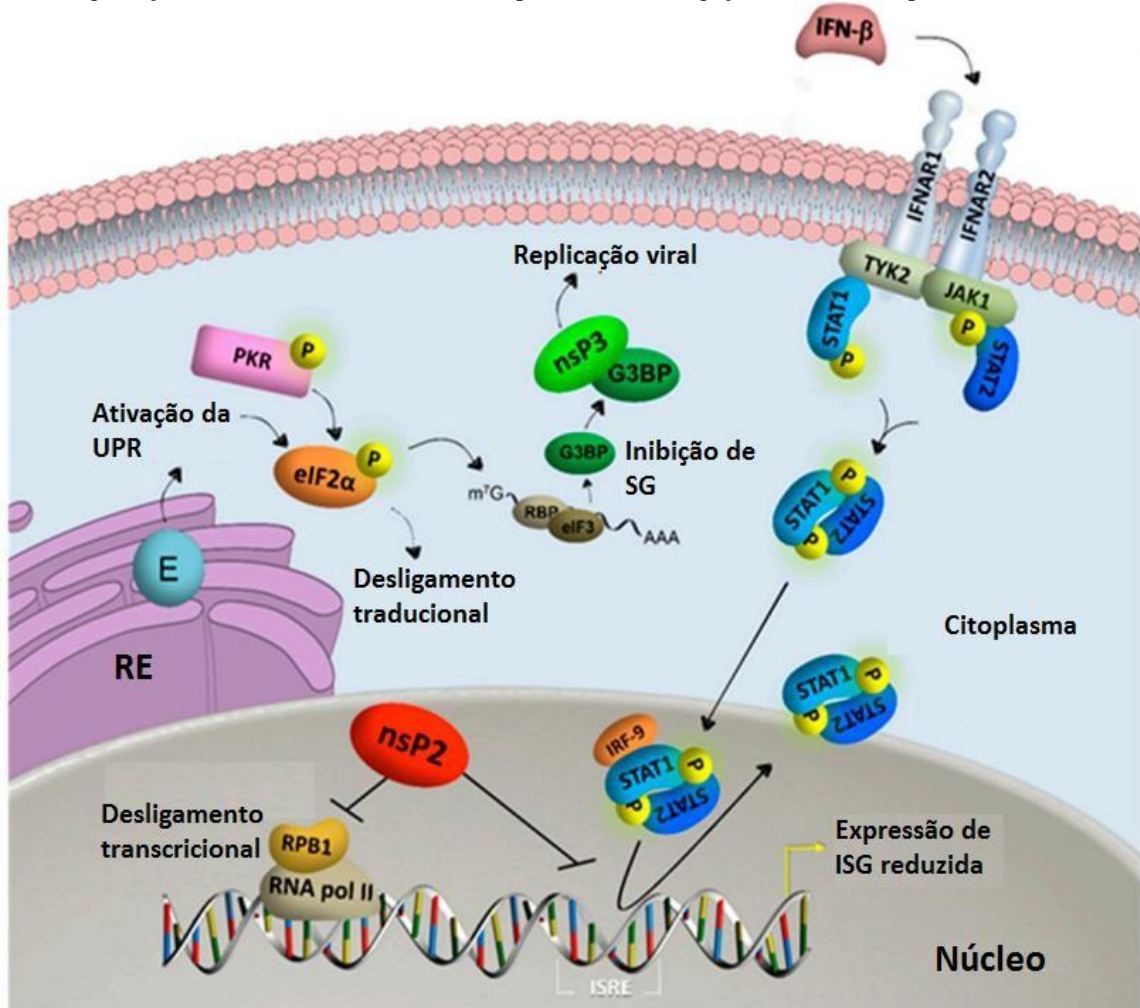
Nota: Os símbolos demonstrados indicam diferentes linhagens do vírus, enquanto que sua coloração faz referência à época de circulação. Triângulo roxo escuro referencia a circulação da linhagem Oeste Africana antes de 2005, enquanto que o roxo claro indica a mesma atividade após o ano de 2005, e assim por diante para as outras linhagens. As cores no mapa concordam com o tipo de vetor incidente na região, sendo vermelho indicando *Ae. aegypti*, amarelo para *Ae. albopictus* e laranja para ambos

É de suma importância também ter ciência dos papéis das nsPs em relação à inibição da resposta antiviral hospedeira, pois estas influenciam na patogênese do vírus de maneira significativa. Não só o CHIKV mas têm-se relatado nsPs também de outros alfavírus como o vírus Sindbis (SINV), o vírus da Floresta de Semliki (SFV) e o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) como principais causadores de desligamento de transcrição em células hospedeiras de diferentes maneiras (AKHRYMUK; KULEMZIN; FROLOVA, 2012; FROLOVA et al., 2002; FROS et al., 2010; SIMMONS et al., 2009).

Durante a infecção por CHIKV foi demonstrado que a proteína nsP2 antagoniza a principal via de resposta antiviral, a via do interferon, através do desligamento geral da transcrição do hospedeiro (GARMASHOVA et al., 2007), conseqüentemente impedindo a transcrição do IFN- β , e por meio da ligação a transdutores *downstream* de IFN tipo I e II, tais

como proteínas Janus Kinase (JAK), inibindo assim a ativação da via JAK-STAT (AKHRYMUK; KULEMZIN; FROLOVA, 2012; FROS et al., 2012). Outro mecanismo de ação da nsP2 é a degradação da subunidade RPB1 da RNA polimerase II, realizando assim, o bloqueio geral da transcrição (FROS et al., 2012). Além da nsP2, a nsP3 tem sido relatada também como importante influenciadora na virulência do CHIKV, porém atuando na supressão de grânulos de estresse celular através da ligação às proteínas RAS, que são estimuladas por proteínas ativadoras de GTPase (G3BP) (figura 3).

Figura 3 - Inibição da tradução pela proteína nsP2, e da formação de grânulos de estresse pela nsP3, através da degradação da subunidade RPB1 da RNA polimerase II e ligação ao G3BP, respectivamente



Fonte: Fros e Pijlman (2017, tradução nossa)

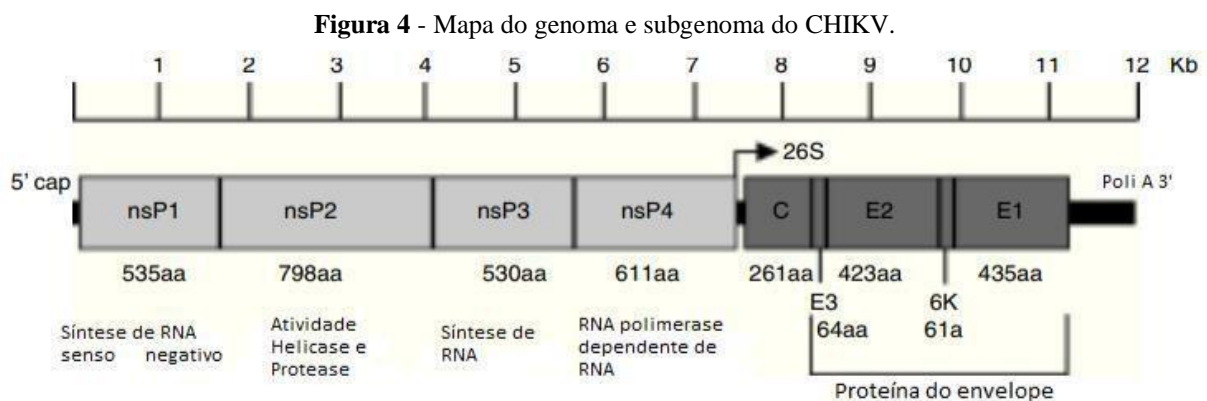
2.2 Estrutura e Genoma Viral

O CHIKV é um vírus envelopado, dotado de um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 70 nm de diâmetro que guarda em seu interior um RNA fita simples polaridade positiva (POWERS et al., 2001; SHARMA et al., 2018). Seu genoma é dividido

em dois Quadros de Leitura Abertos (ORFs), uma contendo proteínas estruturais, correspondente ao seu subgenoma, e outra contendo as não-estruturais, além de duas regiões não traduzidas (UTRs) localizadas em cada extremidade da fita (figura 4) (GALÁN-HUERTA et al., 2015; HYDE et al., 2015; POWERS, 2018; STRAUSS; STRAUSS, 1994).

As proteínas estruturais são responsáveis pelo arcabouço do vírus, são elas as proteínas do capsídeo (C), responsável pela formação do capsídeo icosaédrico; as do envelope (E1, E2 e E3), sendo o heterodímero E1 e E2 responsáveis pela fusão e ligação à célula hospedeira respectivamente, e E3 ainda com funções pouco compreendidas; a proteína TF, importante na montagem do capsídeo viral e liberação de novos vírions da célula hospedeira e o peptídeo 6K, responsável por interagir com domínios transmembranares de glicoproteínas e interromper a homeostase de cálcio intracelular (UNIPROT, 2018).

As proteínas não estruturais (nsPs) são encarregadas pela replicação do vírus dentro da célula através da atividade do complexo de replicação daquelas (SREEJITH et al., 2012), além de possuírem papéis importantes em relação à regulação da resposta imune do hospedeiro (FROS et al., 2010, 2013). Ao todo são quatro nsPs (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4) compondo uma das ORFs, que precisam ser processadas antes de executarem suas atividades (VASILJEVA et al., 2000).



Fonte: Galán-Huerta et al. (2015, tradução nossa)

Nota: O genoma abaixo é dividido em duas ORFs, onde a da esquerda representa o genoma viral (evidenciando as proteínas não-estruturais) e a da direita o subgenoma (evidenciando as proteínas estruturais)

Inicialmente, durante a desmontagem do nucleocapsídeo do vírus no início da infecção, o RNA genômico é traduzido em uma poliproteína nsP1234, que é clivada por meio de atividade protease da nsP2 em nsP123 e nsP4, tornando-se assim um complexo de replicase (ou polimerase) de RNA fita curta, realizando assim a síntese da fita complementar a este RNA (SHARMA et al., 2018; SCHWARTS; ALBERTS, 2010; VASILJEVA et al., 2000).

Após este processo a P123 é clivada em nsP1, nsP2 e nsP3 separadamente, que serão modificadas em uma polimerase tardia mais estável que executara o papel de replicase (sintetizando um RNA fita longa 42S a partir do fita curta 42S) e transcriptase (sintetizando um RNA 26S fita curta a partir do RNA 42S fita longa) (KAARIAINEN; AHOLA, 2002). Ainda, essas proteínas possuem funções específicas importantes para a replicação do vírus: nsP1 possui atividade replicase de RNA senso negativo além de realizar o capeamento da nova fita de RNA, garantindo assim proteção contra ribonucleases e fosfatases no interior da célula; nsP2 possui atividade helicase e de protease durante o processamento da poliproteína em proteínas não estruturais individuais (AKHRYMUK; KULEMZIN; FROLOVA, 2012); nsP3 também possui atividade RNA replicase e nsP4 funciona como uma subunidade catalítica da RNA polimerase dependente de RNA (figura 4) (GALÁN-HUERTA et al., 2015).

2.3 Ciclo de Replicação

O CHIKV é capaz de se replicar em um amplo espectro de células, se disseminando por células epiteliais e fibroblastos, hepatócitos, musculares e sinoviócitos, alcançando inclusive o tecido linfóide e o cérebro (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). O conhecimento à respeito de quais receptores medeiam a infecção por CHIKV ainda é limitado, mas sabe-se que os glicosaminoglicanos (GAGs), proibitinas (PHB) e fosfatidilserinas (PtdSer) (ACHARYA et al., 2015; MOLLER-TANK et al., 2013; WINTACHAI et al., 2012), presentes em vários tipos celulares, possuem um papel importante na aderência do vírus (SOURISSEAU et al., 2007; SALVADOR et al., 2009; GAY et al., 2012). De início, a entrada do CHIKV ocorre por meio da ligação da proteína E2 à célula hospedeira e posterior endocitose mediada por clatrina (VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015).

O baixo pH nos endossomos permite mudanças conformacionais nas glicoproteínas do envelope do vírus fazendo com que haja inserção da proteína E1 na membrana do endossomo da célula hospedeira proporcionando assim a fusão do envelope do vírus com a membrana do endossomo ocasionando na liberação do seu material genético no citoplasma (VAN DUIJL-RICHTER et al., 2015).

Ainda no citoplasma o RNA do vírus codifica uma poliproteína P1234 (e menos frequentemente em P123) (STRAUSS; STRAUSS, 1994) que posteriormente é clivada por uma protease do próprio vírus, a nsP2, em P123 e nsP4 que serão necessários para a replicação precoce gerando um RNA viral senso negativo (KUHN, 2013; STRAUSS;

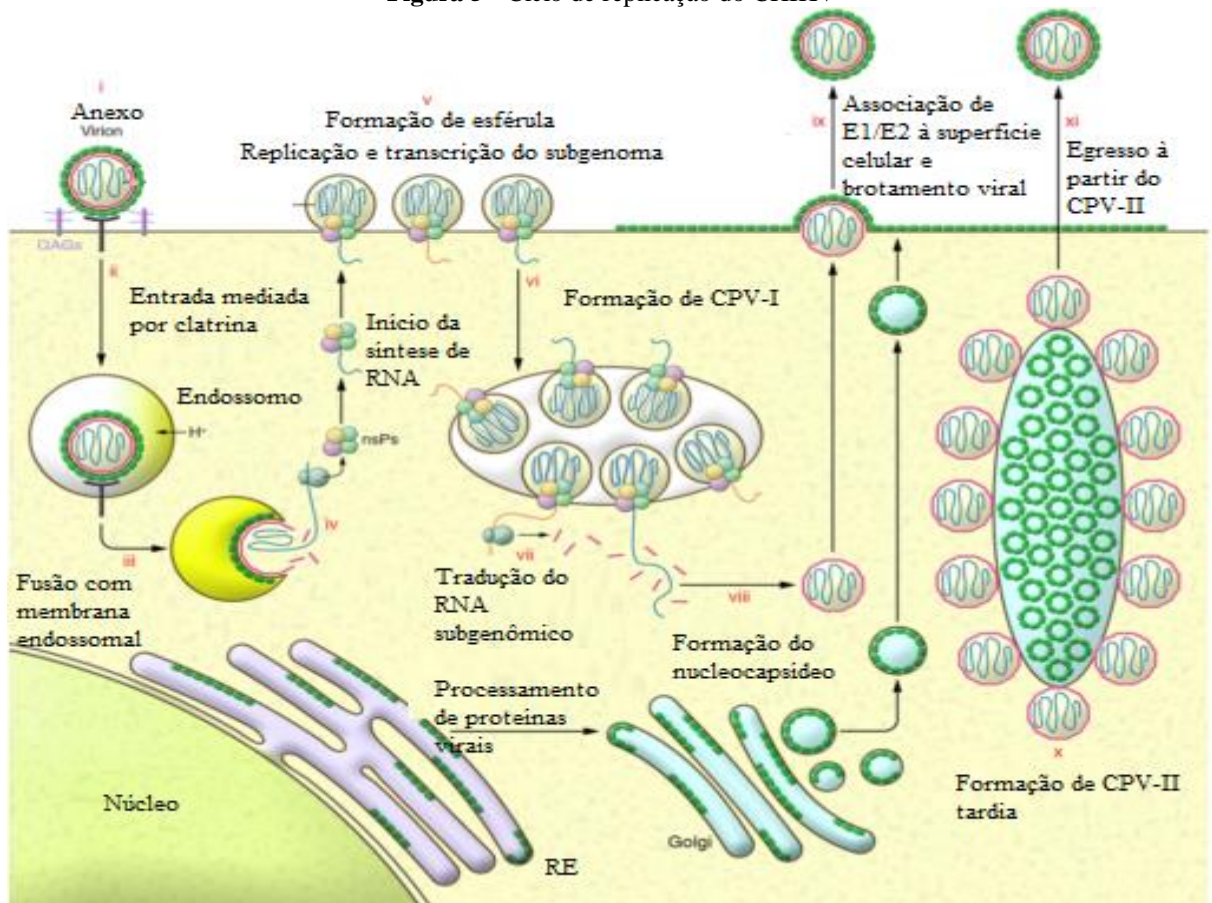
STRAUSS, 1994).

O RNA senso negativo será responsável pela formação de pequenos compartimentos na periferia do citoplasma denominados esférulas, esta servirá de local apropriado para a replicação do vírus (UTT et al., 2016). Todo o material genético viral é protegido pelas nsPs, que ficam localizadas no pescoço da esférula, do contato com os receptores de reconhecimento padrão (KUHN, 2013; UTT et al., 2016). Assim, a infecção prossegue e a medida que isso acontece, as esférulas vão sendo internalizadas para formar vacúolos citopáticos (CPV-I) (UTT et al., 2016).

A abundância de RNA senso negativo na esférula resulta em processamento deste para RNA senso positivo e sua posterior tradução em proteínas do subgenoma (C, E1, E2, E3, 6K e TF) (SNYDER et al., 2013). Após a tradução, as proteínas sofrem autoproteólise para que as proteínas sejam liberadas e iniciem o processo de oligomerização e processamento em complexo de Golgi para que possa ser dado o início da montagem do vírion (SILVA; DERMODY, 2017). Já na via secretora o heterodímero E3-E2 sofre modificações pós traducionais como palmitoilações e glicosilações para que por fim sofra ação da furina para que o E3 seja liberado para se inserirem na membrana plasmática que farão parte do envelope da nova partícula viral (SILVA; DERMODY, 2017). A fase de oligomerização e montagem do vírion conta com as atividades das proteínas TF e 6K, porém não se sabe o real papel delas nesse processo (FIRTH et al., 2008; SNYDER et al., 2013; TAYLOR et al., 2016). Assim, à medida que os nucleocapsídeos são formados eles são recrutados para o brotamento na membrana plasmática exatamente no local onde os picos estão posicionados (KUHN, 2013).

Ao fim da infecção um segundo vacúolo citoplasmático (CPV-II) é formado, contendo glicoproteínas em seu interior e vários nucleocapsídeos na sua porção citoplasmática (CHEN et al., 2013; SOONSAWAD et al., 2010). Ainda não se sabe se o CPV-II tem alguma influência na patogênese do vírus ou se é algo necessário para garantir uma infecção eficiente, entretanto sua proximidade à membrana plasmática sugere que ele seja participante dos processos de montagem do vírus (SOONSAWAD et al., 2010) (As diversas etapas do ciclo replicativo encontram-se ilustradas na figura 5).

Figura 5 - Ciclo de replicação do CHIKV



Fonte: Silva e Dermody (2017, tradução nossa).

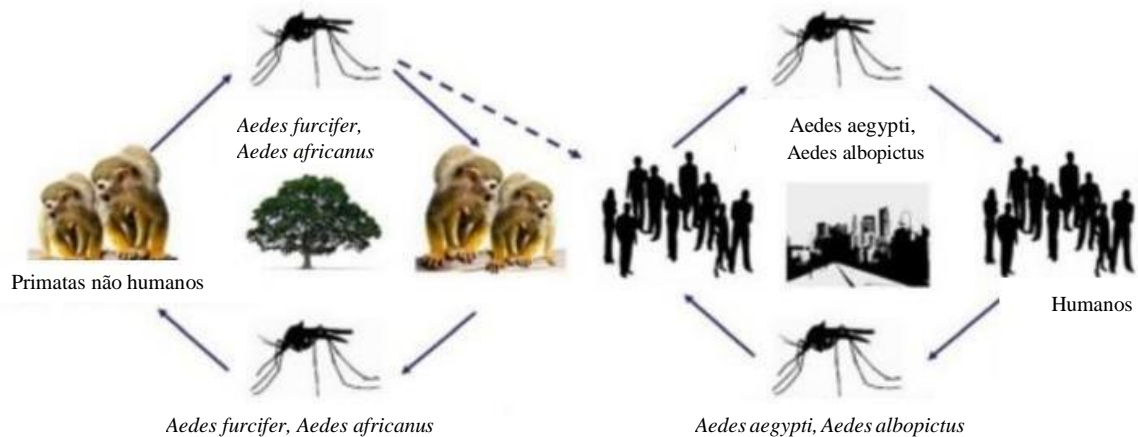
Nota: São ilustradas todas as etapas de replicação até a liberação do vírion em célula hospedeira

2.4 Transmissão

A transmissão ocorre basicamente por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (subgênero *Stegomyia*) infectados. Além disso, já tem sido descrita a transmissão vertical, gerando disfunções neurocognitivas e um grau de atraso no desenvolvimento geral de recém-nascidos (GÉRARDIN et al., 2008; GÉRARDIN et al., 2014)

Existem dois ciclos de transmissão, a enzoótica rural, a qual ocorre em florestas e savanas, e é dependente de mosquitos do gênero *Aedes* (principalmente os *Ae. furcifer* e *Ae. africanus*) e reservatórios animais, principalmente primatas não humanos (BROECKEL et al., 2015; DIALLO et al., 1999; DIALLO et al., 2012); e a urbana, que é bem estabelecida em cidades e tem como principais vetores o *Ae. aegypti* e o *Ae. albopictus*, que carregam o vírus entre reservatórios humanos (figura 6) (WEAVER, 2006).

Figura 6 - Ciclos de transmissão urbano e silvático do CHIKV.



Fonte: MADARIAGA; TICONA; RESURRECCION, (2015, tradução nossa)

Nota: No ciclo silvático a transmissão ocorre entre primatas não-humanos por meio do *Ae. furcifer* ou *Ae. africanus*, por outro lado, no ciclo urbano, a transmissão ocorre entre humanos por meio do *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus*.

O ciclo urbano já é bem estabelecido na Ásia, e estudos têm revelado que este ciclo se iniciou na África oriental, no século 18, a partir de veleiros que carregavam o vírus Chikungunya (linhagem ECSA) e mosquitos *Ae. aegypti* juntamente com humanos em seus navios, proporcionando uma livre circulação do vírus entre humanos. Além disso, os navios ofereciam um ambiente favorável para procriação dos mosquitos por acumular água parada (CAREY, 1971 apud WEAVER; LECUIT, 2015; SILVA; DERMODY, 2017). A introdução do ECSA na Ásia ocorreu pela primeira vez entre os anos 1879 e 1956 causando surtos na Índia e no Sudeste Asiático. Dados sobre sequenciamento do vírus são incompletos para se afirmar qual ano exato se deu a introdução desta cepa na Ásia (WEAVER; LECUIT, 2015).

2.5 Sinais e Sintomas Clínicos

Os sinais e sintomas da Chikungunya se assemelham aos de outras viroses, como dengue e zika, podendo ser apresentada em diferentes graus de intensidade a depender de vários fatores do hospedeiro e do vírus. Após um período de 1 a 12 dias de incubação o paciente experimenta a fase aguda da doença, apresentando febre abrupta (39°C-40°C) que pode durar uma semana (NG et al., 2009; PAIXÃO; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2017). Acompanhada a esta, a poliartralgia, muitas vezes debilitante, bem comum, atingindo os membros do paciente de forma bilateral, principalmente as articulações, frequentemente tornozelos, falanges e pulsos (SILVA; DERMODY, 2017). Ainda, muitos pacientes relatam outros sintomas comuns durante esta fase, como exantema maculopapular, conjuntivite, náuseas, diarreia,

fadiga, cefaleia e dores lombares (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017).

Em neonatos a doença se apresenta de maneira mais severa, pois além de febre e exantemas, pode ocorrer aparecimento de hemorragias, desenvolvimento de miocardiopatia hipertrófica, pericardite, síndrome algica, hiperpigmentação cutânea e comprometimentos neurológicos graves (TORRES et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017) (Tabela 1).

Na fase subaguda a febre desaparece, porém, é comum a manutenção ou aumento das dores articulares nas regiões atingidas na fase anterior, sendo ainda acrescida de tenossinovite hipertrófica subaguda, principalmente em punhos e tornozelos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017; SILVA; DERMODY, 2017). Além disso, pode surgir nesta prurido generalizado, lesões vasculares e bolhosas, doença vascular periférica e sintomas depressivos (PAKRAN et al., 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2017) (Tabela 1).

A fase crônica pode ser instalada após 3 meses de persistência dos sintomas da fase subaguda. Sua prevalência é de mais de 50% dos pacientes acometidos pela doença, incidindo principalmente aqueles que possuem idade mínima de 45 anos e que já tenham alguma complicação articular pré-existente. Os sintomas podem ser acrescidos de limitação do movimento articular, dores nas regiões sacroilíaca, lombossacra e cervical, podendo haver evolução para artropatia destrutiva (CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2017) (Tabela 1). Na literatura já foi descrita uma persistência da fase crônica por longos períodos (MARIMOUTOU et al., 2012; 2015).

Quadro 1 - Manifestações típicas e atípicas da febre Chikungunya em pacientes

(continua)

Órgão/sistema	Típico	Atípico
Sistêmico	Febre, astenia	Linfadenopatia
Musculoesquelético	Artrite, artralgia, mialgia, edema articular, tenossinovite, dores lombares, poliartralgia persistente	Destruição articular, reumatismo inflamatório crônico
Dermatológico	Exantemas, eritemas	Dermatose bolhosa, hiperpigmentação, estomatite, xerose

Quadro 2 - Manifestações típicas e atípicas da febre Chikungunya em pacientes

(conclusão)

Órgão/sistema	Típico	Atípico
Neurológico	Cefaleia	Meningoencefalite, encefalopatia, síndrome de Guillain-Barré, convulsão, neuropatia, paralisia, anormalidades neurosensivas
Gastrointestinal		Náusea, vômito, dores abdominais, anorexia, diarreia
Hematológico	Linfopenia, trombocitopenia	Hemorragia
Ocular	Dores retro-orbitais, fotossensibilidade	Neurite óptica, retinite, uveíte
Cardiovascular		Miocardite, pericardite, cardiomiopatia, arritmia, insuficiência cardíaca
Hepático		Hepatite fulminante
Pulmonar		Insuficiência respiratória, pneumonia
Renal		Nefrite, insuficiência renal aguda

Fonte: Silva e Dermody (2017, tradução nossa)

2.5 Diagnóstico

O diagnóstico diferencial para febre Chikungunya normalmente é realizado com outras doenças febris associadas à complicações articulares. Portanto, na fase aguda da doença, o diagnóstico diferencial no contexto de epidemias atual é a dengue, devido às similaridades em relação aos seus aspectos clínicos e áreas endêmicas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014; MARDEKIAN; ROBERTS, 2015) (Tabela 2). Outras doenças também podem ser incluídas nesse diagnóstico, como malária, leptospirose, febre reumática e artrite

séptica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

Quadro 3 - Diagnóstico diferencial Chikungunya x Dengue

Manifestação clínica/laboratorial	Chikungunya	Dengue
Intensidade da febre	+++	++
Exantema	++ (D1-D4)	+(D5-D7)
Mialgia	+	++
Artralgia	+++	+/-
Plaquetopenia	+	+++
Leucopenia	++	+++
Linfopenia	+++	++
Neutropenia	+	+++
Choque	-	-/+
Discrasia sanguínea	-/+	++
Dor retrorbital	+	+++
Evolução após fase aguda	Artralgia crônica	Fadiga

Fonte: STAPLES et al (2009, tradução nossa)

Legenda: +++ = 70-100% dos pacientes, ++ = 40-69%, + = 10-39%, +/- = <10%, - = 0%.

Para elaboração de um diagnóstico preciso e de confiabilidade faz-se necessário o emprego de técnicas laboratoriais, como a Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), presença de IgM no soro e isolamento viral (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014). A escolha de cada uma dessas técnicas irá depender do estágio de viremia do paciente, cuja amostra foi coletada para estudo.

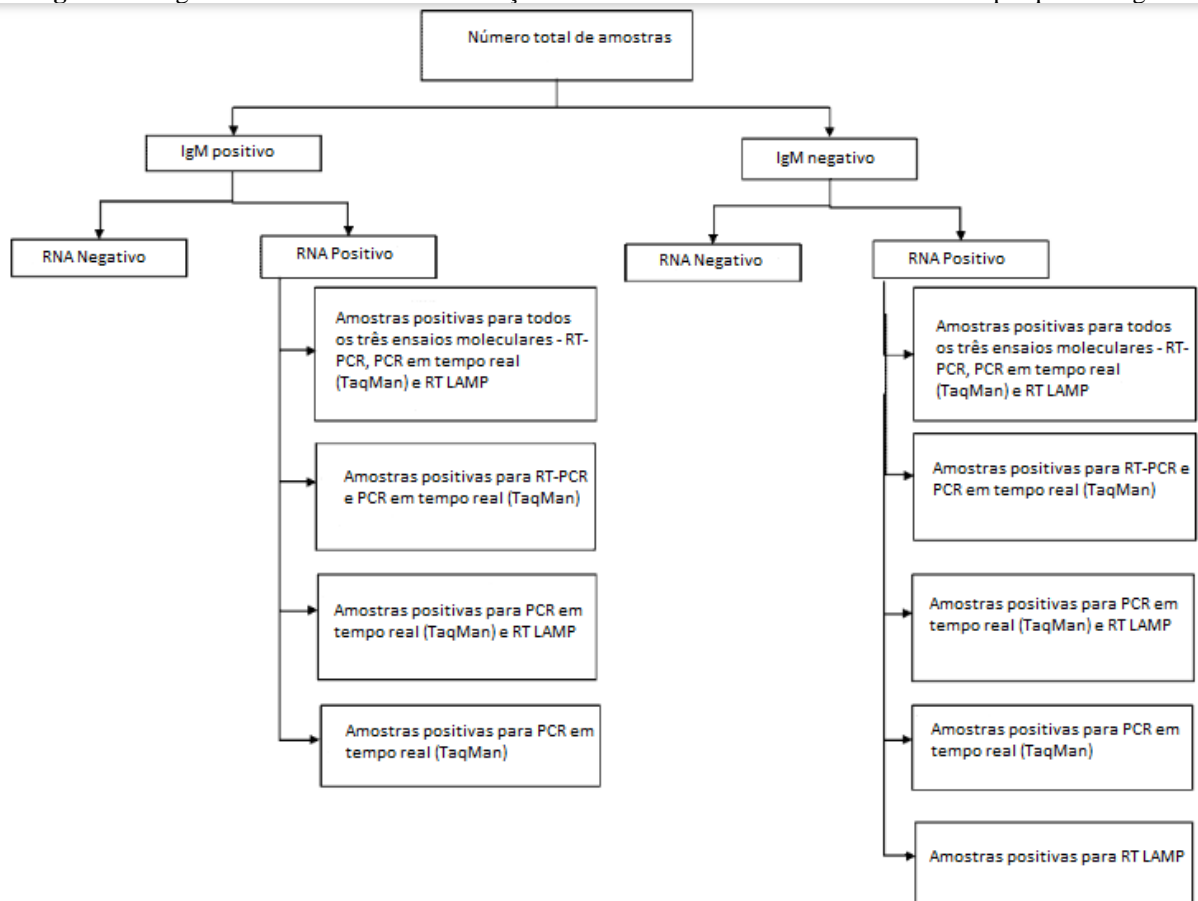
2.5.1 Reação em Cadeia da Polimerase - Transcriptase Reversa (RT-PCR)

A RT-PCR representa uma das técnicas mais sensíveis atualmente aplicadas, além de apresentar um tempo de resposta mais rápido. Sua utilização é necessária em espécimes os quais possuem RNA do vírus circulante, ou seja, são amostras oriundas de pacientes em viremia (MARDEKIAN; ROBERTS, 2015). A técnica convencional é aplicada aos vírus DENV e CHIKV a fim de se estabelecer um diagnóstico preciso, pois há semelhanças acerca dos sintomas clínicos entre essas doenças. Saha et al. (2013) sugeriram a aplicação de uma RT-PCR duplex altamente sensível e específica para se ter maior confiabilidade nos resultados. Ainda, Cecilia et al (2015) e Pongsiri et al (2012) descreveram uma RT-PCR multiplex que detecta e quantifica RNA para todos os sorotipos do DENV e CHIKV.

2.5.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

Atualmente não há teste baseado em antígeno para CHIKV e os que são apresentados na literatura até o momento são imprecisos (KASHYAP et al., 2010; SHUKLA et al., 2009). Para pesquisa de anticorpos IgM anti-CHIKV, recomenda-se a realização de uma combinação de testes, usando algoritmos em que o ELISA de captura de IgM é utilizado como uma abordagem inicial seguido do uso de ensaios moleculares rápidos em amostras negativas de IgM anti-CHIKV para facilitar o diagnóstico rápido durante os surtos (REDDY et al., 2012) (Figura 7).

Figura 7 - Algoritmo evidenciando a correlação entre os testes moleculares e baseado em pesquisa de IgM.



Fonte: REDDY et al (2012, tradução nossa)

Nota: Inicialmente é empregado o teste ELISA IgM para posteriormente executar os testes moleculares a fim de confirmar presença de material genético viral

2.5.3 Isolamento viral

O isolamento do CHIKV pode ser feito em cultura de células como Vero, BHK-21, LLC-MK2 e C6/36 que é a mais utilizada (DASHY; MOHANTY; PADHY, 2011). Pode-se

ainda fazer uso de mosquitos para tal atividade, porém esse método é impraticável de diagnóstico de rotina, sendo necessários requisitos especializados garantindo assim, um custo alto de manutenção.

Comparado ao método da detecção por RT-PCR, o isolamento viral é menos sensível (cerca de 40,5% quando isolado em cultura celular). O mais recente método de isolamento de CHIKV foi empregado por Patramool et al (2013), fazendo uso de *beads* de polímero aniônico, tornando o método menos custoso, com boa sensibilidade e rapidez, além de abranger um amplo número de amostras para análises simultâneas (PATRAMOOL et al., 2013).

2.5.4 Tratamento e vacinas

A febre Chikungunya caracteriza-se como uma doença crônica e debilitante, o que motiva muitos pesquisadores a investigarem melhores formas de tratamento a fim de amenizar os sintomas. Como não há vacinas, nem terapêuticas específicas disponíveis no mercado, indica-se o uso de analgésicos e antipiréticos como alternativas paliativas.

Existem muitos estudos cujo foco é o uso de fármacos contra viroses emergentes, principalmente a febre Chikungunya, cujo grau de morbidade é alto principalmente em idosos e recém-nascidos. Muitos rastreios de bibliotecas de fármacos são realizados visando identificar possíveis candidatos a antivirais contra o CHIKV (ASHBROOK et al., 2016; GIGANTE et al., 2014; KAUR et al., 2013), inclusive um deles, a ribavirina, foi o único fármaco testado em humanos que demonstrou resultados satisfatórios (RAVICHANDRAM; MANIAN, 2008).

Muitas abordagens terapêuticas visam etapas do ciclo de replicação, podendo ter como alvo o vírus da entrada na célula aos mecanismos enzimáticos durante a formação do novo vírion. Além disso, já foi relatado o uso de drogas que podem interagir com fatores importantes do próprio hospedeiro que poderão interferir na replicação do vírus (ABDELNABI et al., 2015).

Outras abordagens também são postas em estudo, como a imunoterapia, a qual faz uso de anticorpos monoclonais contra o CHIKV (CLAYTON, 2016). O uso desses anticorpos resultou em um tratamento satisfatório em camundongos primatas não humanos, inclusive quando tratados pós exposição (PAL et al., 2013; PAL et al., 2014; SELVARAJAH et al., 2013; SMITH et al., 2015). Isso sugere que a imunoterapia também pode ser uma abordagem promissora.

Apesar de muitos possíveis compostos encontrados, faz-se necessário a realização de

mais testes em animais e humanos a fim de obter resultados mais robustos que possam contribuir para o avanço dessas terapêuticas.

A vacinação continua sendo a estratégia mais promissora devido à garantia de uma imunidade duradoura, além de se impedir, por meio da imunidade de rebanho, a dispersão daquele agente. Com isso, várias estratégias vacinais têm sido pesquisadas, e atualmente há seguimento em fases clínicas e pré-clínicas (SCHWAMEIS et al., 2016). Uma estratégia é o uso de vírus atenuados, que possui um baixo custo de produção e dispõe da vantagem de mimetizar uma infecção natural, pois o vírus ainda é capaz e se replicar. Um exemplo de estudo vacinal de vírus atenuado contra CHIKV é o conduzido por Levitt et al., em que foi utilizada a cepa 181/25, obtida por passagem extensiva em cultura de células (LEVITT et al., 1986). Este modelo obteve sucesso de vacinação em primatas não humanos e camundongos (GORCHAKOV et al., 2012; GARDNER et al., 2014; LEVITT et al., 1986), no entanto houveram reações adversas na fase 1 do ensaio clínico (McCLAIN et al., 1998) e, apesar de imunogênico, houve desenvolvimento de febre e artralgia em 8% dos animais (EDELMAN et al., 2000). Em alguns ensaios em modelos de camundongo e até em testes em humanos, a cepa 181/25 atenuada demonstrou efeito inverso, indicando assim, instabilidade em sua atenuação (ASHBROOK et al., 2014; GORCHAKOV et al., 2012; HOKE et al., 2012). Isso trouxe preocupações a respeito da segurança desta vacina, conduzindo os pesquisadores a investigarem outras estratégias, como por exemplo, o uso do vírus atenuado através do uso da sequência IRES (*Internal ribosomal entry site*). Esta sequência é utilizada em substituição ao promotor do subgenoma, inibindo assim, a expressão de proteínas estruturais, resultando em um vírus incapaz de realizar sua própria montagem dentro de células de mosquitos e atenuado em células de mamíferos (PLANTE et al., 2011; ROY et al., 2014).

O CHIKV/IRES demonstrou ser altamente imunogênico, sendo eficiente em camundongos e primatas não humanos, porém necessitando de avaliações adicionais em estudos pré-clínicos (PLANTE et al., 2011; ROY et al., 2014). Há também outras estratégias em estudo como o uso de vírus atenuados por meio de deleções de alguns genes (HALLENGARD et al., 2014; PIPER et al., 2013); através de quimeras (WANG et al., 2008; WANG et al., 2011), visando a diminuição da reversão da virulência; e uso de VLPs (*Virus-Like Particles*), expressando apenas cassete estrutural (AKAHATA et al., 2010).

A VLP para CHIKV foi altamente imunogênico, segura, bem tolerada e com 100% de soroconversão, além de garantir proteção contra múltiplas cepas de CHIKV (CHANG et al., 2014; GOO et al., 2016). Atualmente a VLP encontra-se em estudo na fase 2, sendo o único

problema os custos enfrentados.

Outro modelo baseado em VLP se dá através do uso do vírus atenuado do sarampo (MV) como vetor (BRANDLER et al., 2013). Já testado em estudo pré-clínico em camundongos nocaute, tem gerado resposta imune robusta apresentando 100% soroconversão após reforço de imunização (adjuvantes) e os anticorpos têm sido gerados de maneira dose dependente (RAMSAUER et al., 2015). Atualmente encontra-se na fase 2 do estudo clínico.

Além desses modelos vacinais, tem-se utilizado abordagens em vírus inativado, subunidades e vacinas de DNA, além de outros recombinantes com vetores específicos (SCHWAMEIS et al., 2016).

Apesar dos avanços, ainda há muitas dificuldades, pois a doença atinge principalmente países em desenvolvimento, sendo necessário para isso uma elaboração vacinal com baixos custos e eficácia satisfatória.

2.6 Resposta Imune Frente à Infecção por Chikungunya

Uma das vias antivirais mais importantes, a via do interferon, (IFN) foi descoberta em 1957, cinco anos após a descoberta do CHIKV. Nesse momento, a Ásia e sul da Índia eram vítimas de uma grande epidemia do vírus, fazendo com que várias pesquisas se inclinassem para associação entre resposta via IFN tipo I e o CHIKV. Em 1963, os pesquisadores Gifford e Heller (1963) relataram produção de IFN do tipo I, 3 horas pós infecção pelo CHIKV em fibroblastos embrionados de pintos. Além desse importante estudo, outros estudos se seguiram a fim de investigar melhor sobre o funcionamento da via em questão (GLASGOW, 1970; LEVY; BUCKLER; BARON, 1966). A produção do IFN tipo I é desencadeada através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PAMPs são motivos moleculares conservados, podendo ser glicoproteínas de superfície, RNA cadeia simples (ssRNA), RNA cadeia dupla (dsRNA) ou DNA contendo CpG (GILLIET; CAO; LIU, 2008; O'NEILL; BOWIE, 2007) .

Os PRRs mais conhecidos são os do tipo Toll, presentes na membrana plasmática e em compartimentos endossômicos, e os RLRs que abrangem os receptores semelhantes a genes I (RIG-I) e a proteína associada à diferenciação de melanoma (MDA5) que estão presentes no citoplasma (PICHLMAIR; REIS E SOUSA, 2007; TAKEUCHI et al., 2006). Os TLRs são uma família de proteínas transmembranares envolvidas na resposta antiviral, são eles TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9 (AKIRA; TAKEDA, 2004). TLR2 e TLR4 são ativados

por glicoproteínas presentes em superfície de alguns vírus (COMPTON et al., 2003; RASSA; ROSS, 2003), TLR7 e TLR8 são ativados por RNA fita simples, como por exemplo, o RNA do vírus influenza (DIEBOLD et al., 2004), o TLR3 está envolvido com o reconhecimento de RNA fita dupla extracelular (ALEXOPOULOU et al., 2001) e TLR9 é ativado por DNA não metilado contendo CpG, como já foi relatado em infecção por herpes simplex (RASSA; ROSS, 2003) (Figura 7). Em TLR3, após sua ativação, ocorre ao estímulo da proteína adaptadora TRIF que interage com TRAF3 por meio de motivos TRAF (MEYLAN et al., 2004; OGANESGAN et al., 2006; SATO et al., 2003). Assim, TRAF3 induz secreção de IFN I que conduzirá o estado antiviral celular (HACKER et al., 2006). No caso dos TLRs 7, 8 e 9, ocorre ativação da proteína adaptadora MYD88 que se associa a TRAF6 ativando em seguida o fator NF- κ B que conduz a secreção de citocinas inflamatórias (SUZUKI; SUZUKI; YEH, 2002).

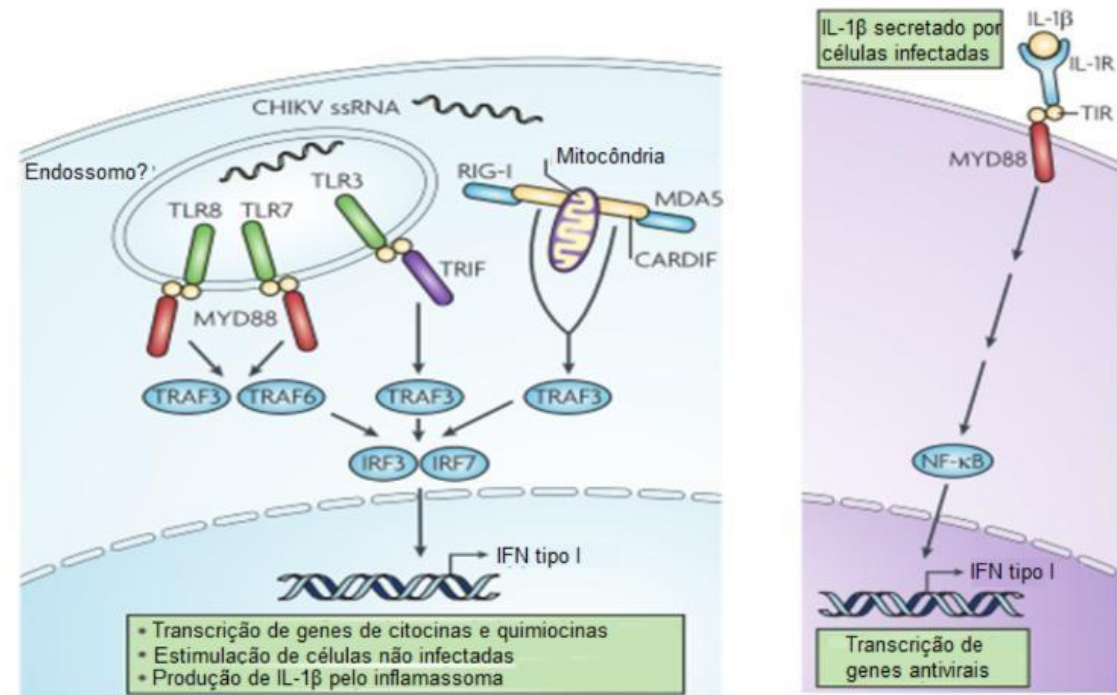
Já os RLRs se ligam a dsRNA ou ssRNA através de domínios helicase DExD/H para consequentemente ativar a cascata de expressão do IFN tipo I (KANG et al., 2002; KOVACSOVICS et al., 2002; SAITO et al., 2007; YONEYAMA et al., 2004). Inicialmente, os RLRs se diferem em relação ao tipo de produto o qual irá se ligar; o RIG-I se liga preferencialmente a ssRNA fosforilado no terminal 5' contendo também motivos homopoliuridina e homopoliriboadenina, assim como dsRNA curtos fosforilados (HORNUNG et al., 2006; KATO et al., 2008; PICHLMAIR et al., 2006; SAITO et al., 2008). O MDA5 reconhece dsDNA longo e não necessita de fosforilação nestes (GIULIN et al., 2006).

Por meio da interação entre domínios de recrutamento de caspase (CARD), os RLRs posteriormente realizam conexão com *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS), *virus-induced signaling adapter* (VISA) ou *CARD adapter-inducing IFN- β* (CARDIF), o qual se localiza na face externa da membrana mitocondrial (KAWAI et al., 2005; KUMAR et al., 2006; SETH et al., 2005; XU et al., 2005). Em seguida, receptores *TNF receptor-associated factor 3* (TRAF3) são ativados, que após isso ativam NF- κ B, que fosforila *IFN regulatory factor 3* (IRF3) e 7 (FITZGERALD et al., 2003; SHARMA et al., 2003). Os IRFs 3 e 7 ativados migram para o núcleo e se ligam aos *IFN-stimulated response elements* (ISREs) induzindo a expressão de IFN tipo I (HONDA et al., 2005).

Em fibroblastos e células estromais já foi descrita uma resposta além daquela por receptores do tipo Toll ao vírus, dependente de CARDIF (adaptador CARD, indutor de IFN β , também conhecido como MAVS) para reconhecimento do ssRNA e posterior indução da produção de IFN tipo I (SCHILTE et al., 2010). Por essa via, o adaptador MyD88 possui um

papel crucial na regulação da resposta tanto via receptores Toll e RLRs, como também para receptor de IL-1 β (Figura 8).

Figura 8 - Mecanismo de ativação dos sensores do tipo Toll e RLRs



Fonte: Schwartz e Albert, (2010, tradução nossa)

O IL-1 β é proveniente da via do inflamassoma, uma via também importante no contexto de controle viral. Também, é uma via pró-inflamatória de grande importância em termos de sinais de alarme comuns, por detectar indícios de injúria tecidual por estresse celular. Inicialmente essa via pode ser ativada por seis receptores citoplasmáticos distintos da família NLR (*Nucleotide binding and oligomerization domain (Nod) and leucine rich repeat containing*), que são os NLRP3, NLRP1b, NLRP6, NLRC4 e NAIPs 2 e 5. O receptor NLRP3 é o sensor mais bem estudado pela comunidade científica e este pode ser ativado por sinais de origens patogênicas, endógenas e ambientais (RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012). Vários patógenos têm sido relacionados à ativação de NLRP3, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, Zika, Influenza A e inclusive o Chikungunya (CHEN et al., 2017; HE et al., 2018; HISE et al., 2009; MEIXENBERGER et al., 2010; WANG et al., 2018), promovendo assim, quadros inflamatórios importantes. Além dos patógenos, sinais de alarme também estão envolvidos no mecanismo de ativação por indicar injúria tecidual local, como por exemplo presença de ATP extracelular em excesso, hialuronano, cristais de ácido úrico e fibrilas β -amiloides (GASSE et al., 2009; HALLE et al., 2008; MARIATHASAN et al., 2006; YAMASAKI et al., 2009).

Partículas do meio ambiente, como asbestos, alumínio e sílica estão ligados a desestabilização de membrana fagolisossômica, com isso, há liberação de proteases catépsina no citosol ocasionando na ativação via NLRP3 (RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012).

Não se sabe com clareza a respeito de como se dá o mecanismo de ativação via NLRP3, no entanto, sabe-se que durante infecção pelo CHIKV, ocorre alta expressão deste receptor, que quando tratado com inibidor específico, há redução dos sintomas relacionados a poliartralgia em modelos *in vivo* (CHEN et al., 2017).

Após a ativação dos receptores da família NLR, ocorre a sua oligomerização, facilitando o recrutamento de pró-caspase-1 pelo complexo multiproteico, através do domínio CARD. Muitas vezes, esta atividade se dá de forma dependente do domínio PYD, que irá ativar a proteína adaptadora ASC, que com seu domínio CARD irá executar este recrutamento (DE ALBA, 2009). A pró-caspase-1 é então clivada e processada formando subunidades importantes para montagem da caspase-1 madura, que irá promover o recrutamento e a maturação das citocinas pró-IL-1 β para ser então secretada na sua forma madura (KAYAGAKI et al., 2011) (Figura 8). Assim, esses mediadores pró- inflamatórios irão se ligar às células vizinhas por meio de receptores específicos induzindo a expressão de outros genes de citocinas e fatores importantes, como IL-6, IL-8 e MCP-1 (WEBER; WASILIEU; KRACHT, 2010). Há estudos confirmando a presença desses mediadores em cultura primária de sinoviócitos humanos infectados com o CHIKV (SUKKAEW et al., 2018), além da identificação de um perfil de fase aguda em amostras de soro (VENUGOPALAN; GHORPADE; CHOPRA, 2014).

Em suma, a via do inflamassoma possui grande importância no que diz respeito a reconhecimento de sinais de perigo a diferentes elementos. Está envolvido em várias doenças, configurando diferentes tipos de ativação pelo patógeno, caracterizando assim, diferentes quadros clínicos específicos para cada doença (CHEN et al., 2017; HE et al., 2018; YI, 2018). Assim, esta via tem sua relevância para pesquisa de potenciais alvos terapêuticos para doenças de base inflamatória.

Em relação à resposta imune adaptativa ao CHIKV, é de grande importância compreender como é gerada a resposta imune humoral à doença. Já há relato de anticorpos neutralizantes anti- CHIKV encontrados na fase convalescente da doença em humanos (COUDERC et al., 2009). Em camundongos IFN α/β administrados com anticorpos anti-CHIKV concomitantemente com o CHIKV houve proteção, sugerindo resposta inata capaz

de eliminar o vírus, no entanto, quando os anticorpos foram utilizados 24 hpi, o efeito antiviral não era mais capaz de suprimir a infecção (COUDERC et al., 2009). Desse modo, torna-se importante investigar melhor essa abordagem, principalmente no que diz respeito a uso em indivíduos mais suscetíveis à infecção grave, como os neonatos.

Pouco se compreende sobre a atividade dos linfócitos durante a infecção pelo CHIKV, mas sabe-se que um efeito característico importante da doença é a linfopenia aguda, que é a diminuição de células B e T circulantes. Em um estudo realizado por Borgherini et al. (2007), foi demonstrado que em uma coorte de 157 pacientes infectados, cerca de 80% deles apresentaram linfopenia característica da doença. O CHIKV não infecta linfócitos, logo, torna-se provável o efeito do IFN tipo I nessas células induzindo morte celular como ocorre em outras infecções (SCHWARTS; ALBERT, 2010) ou uma regulação positiva da quimiocina CXCL-10 induzindo a migração dessas células do sangue para os tecidos ocasionando na sua baixa frequência no sangue (KAMPHUIS et al., 2006). Em camundongos, já tem sido descritos que os linfócitos T citotóxicos (LTC) conseguem de fato reconhecer o vírus (epítipo localizado na proteína do capsídeo) e serem ativados, porém resta saber se em humanos eles são capazes de reconhecê-lo e eliminá-lo (THANAPATI; GANU; TRIPATHY, 2017).

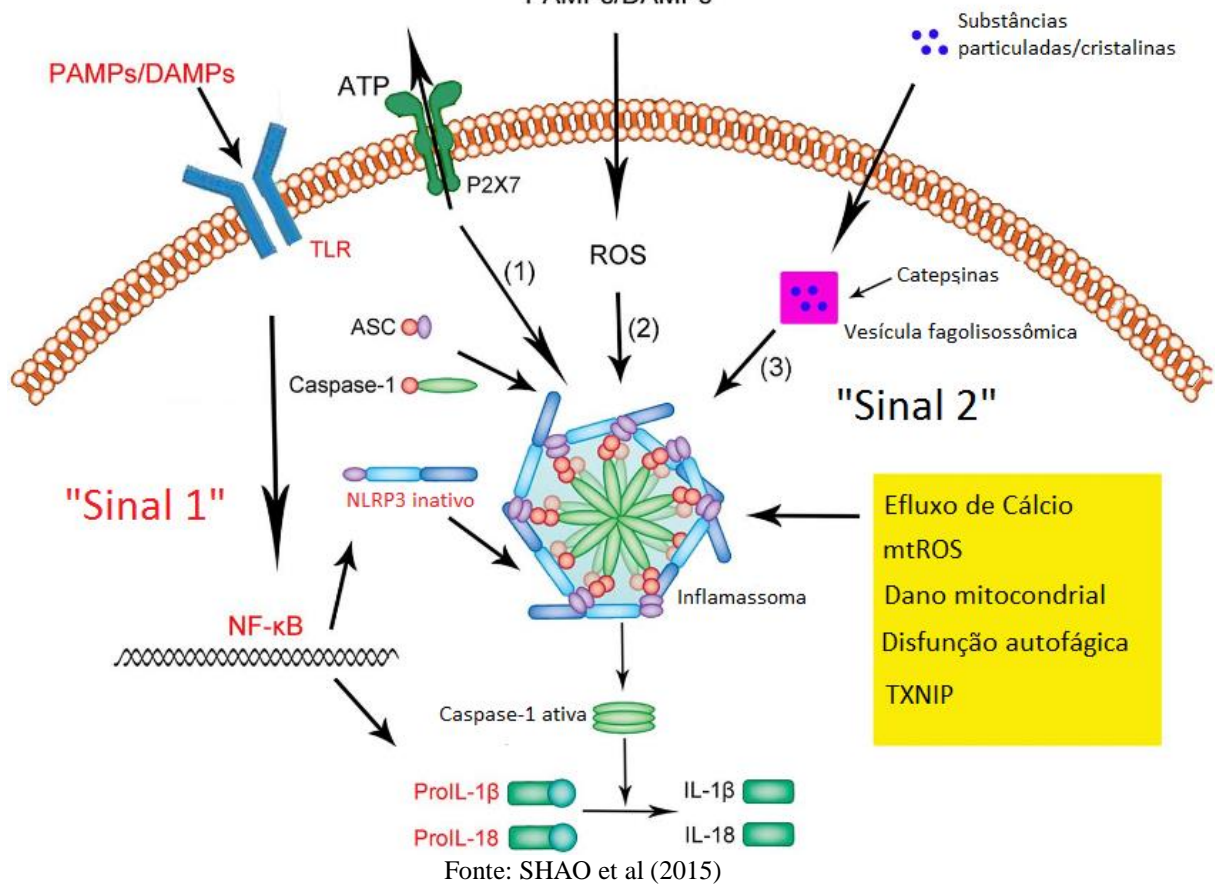
Acerca da poliartralgia de longo prazo, Gardner et al (2010) e Gasque et al (2015) têm mostrado que há participação de células NK, T e macrófagos nesse processo devido a persistência de material do vírus no tecido. Ainda não está claro se esse material é RNA replicante ou material não replicante (POO et al., 2014; WEAVER; LECUIT, 2015) e se os processos inflamatórios são os mesmos da fase aguda da doença. Além da presença dessas células, tem-se destacado também o papel da granzima A nesse processo (WILSON et al., 2017). Mediadores como IL-6 e proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) também influenciam na patogênese da doença (HOARAU et al., 2010; TENG et al., 2015; VENUGOPALAN; GHORPADE; CHOPRA, 2014; WILSON et al., 2017) sendo aquela inclusive associada à indução de erosão óssea por meio da indução de liberação de RANKL e inibição de sua ligação com osteoprotegerina (OPG) resultando em osteoclastogênese (CHEN et al., 2015; CHEN et al., 2017; NORET et al., 2012).

O conhecimento a respeito de marcadores pró-inflamatórios relacionados às complicações neurológicas durante infecção por CHIKV ainda é limitado, porém alguns estudos em linhagens celulares a fim de se verificar quais os prováveis mediadores envolvidos na patogênese do vírus vem sendo realizados. De acordo com Abraham et al (2013), a infecção de linhagem de astrócitos (U87-MG) por CHIKV resultou em resposta

pró-inflamatória apresentando IL-1 β , IL-6 e TNF- α como os principais transcritos mensurados em 18 hpi, o que pode-se inferir que pelo menos as vias do inflamassoma e da sinalização do interferon foram ativadas, além da ativação da via extrínseca da apoptose gerada pelo TNF- α . Em linhagem celular de neuroblastoma (SH- SY5Y) também notou-se maior expressão das três citocinas, porém em 48 hpi (DHANWANI et al., 2012).

Nota-se uma intensa prevalência da ativação da via do inflamassoma (Figura 9) durante infecção pelo CHIKV em culturas primárias de fibroblastos e PBMCs, levando-se a concluir que a mesma é uma importante via no contexto inflamatório em doenças infecciosas. Não só o vírus CHIK, mas outros vírus, e também bactérias, foram descritos como condutores da inflamação através dessa via, como os vírus Influenza, Hepatite C, Zika e bactérias como *Acinetobacter baumannii* e *Mycoplasma gallisepticum* (DIKSHIT et al., 2018; KURIAKOSE et al., 2018; MCDANIEL et al., 2017; NEGASH et al., 2013; TRICARICO et al., 2017).

Figura 9 - Diferentes mecanismos de ativação da via do inflamassoma levando à secreção final de IL-1 β
PAMPs/DAMPs



3 JUSTIFICATIVA

O CHIKV, juntamente a outras arboviroses, se tornou uma preocupação de cunho mundial devido ao seu alto grau de dispersão, por meio de vetores que estão amplamente distribuídos pelo globo, e seu potencial de infecção em humanos. A doença caracteriza-se pela poliartralgia debilitante; comprometendo assim, a qualidade de vida dos pacientes afetados; e pela sua cronicidade, havendo relatos de dores nas articulações que persistiram por até 3 anos.

Além das dores articulares, a febre Chikungunya tem sido associada a sintomas atípicos severos, dentre eles, as complicações neurológicas, como meningoencefalite, mielite e síndrome de Guillain-Barré (SGB). Algumas destas disfunções neurocognitivas também foram relatadas em recém-nascidos devido à transmissão materno-fetal, resultando em infantes com deficiências na postura, movimentação dos membros e socialização.

Este alto grau de morbidade gera um alto impacto socioeconômico por se tornar necessário um acompanhamento adequado desses pacientes, durante toda a sua vida, através de uma equipe multidisciplinar especializada para que eles possam ter uma melhor qualidade de vida, evolução na recuperação, e conseqüentemente possam se tornar mais independentes.

É imprescindível, no contexto de complicações neurológicas, atentar-se aos mecanismos patogênicos do vírus ao ativar vias pró-inflamatórias importantes durante a infecção, pois elas possuem papéis cruciais para eliminação do vírus do organismo. Além disso, estas vias muitas vezes podem estar envolvidas ao dano tecidual local, através da liberação de fatores e citocinas pró-inflamatórias, gerando complicações da doença.

Sendo assim, torna-se importante investigar se a caspase-1 possui papel relevante no contexto da infecção experimental pelo CHIKV em células de linhagem neuronal (SH-SY5Y), a fim de encontrar futuros potenciais alvos terapêuticos, visto que não há vacinas nem tratamentos específicos disponíveis.

4 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da caspase-1 na infecção experimental pelo vírus Chikungunya.

4.1 Objetivos Específicos

- a) Investigar a suscetibilidade das células SH-SY5Y à infecção pelo vírus Chikungunya;
- b) Avaliar taxa de morte celular quando infectadas pelo vírus;
- c) Avaliar os níveis de caspase-1;
- d) Dosar os níveis de IL-1 β induzidos pela infecção do vírus.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE) o qual possui infraestrutura adequada para o desenvolvimento de todas atividades do presente trabalho, contendo laboratórios de pesquisa e inovação com equipamentos modernos, dispostos no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT). O Laboratório oferece setores apropriados para realização de cultura celular, manipulação de vírus de Nível de Biossegurança 2 (NB2) e análises por microscopia de imunofluorescência, além de conter equipamentos requeridos para laboratórios NB2 seguindo a Lei 11.105/2005 da CTNBio. Todos os procedimentos são padronizados e cumprem com os regulamentos de biossegurança descritos no Plano Quadrienal da FIOCRUZ 2005/2008 e ISSO 17025.

5.1 Produção e titulação do estoque de vírus

O vírus foi obtido a partir de uma amostra de soro nº 302 de João Pessoa/PB infectada (PB302). O CHIKV foi inoculado em células VERO (ATCC) e em seguida incubada em estufa a 37°C, 5% CO₂ durante 2 dias, tempo necessário para observação de efeito citopático em todo o tapete celular. Após isso, a garrafa de cultura foi congelada em deep freezer -80°C, descongelada e transferida para um tubo falcon para ser centrifugada a 400g/10 minutos a uma temperatura de 4°C. A centrifugação resultou em um *pellet* de restos celulares e um sobrenadante de partículas virais, que foi alíquotado em criotubos em um volume de 1 mL.

A titulação foi realizada por meio de ensaio de placa. Inicialmente, células VERO (1,5 x 10⁵ células/mL) foram transferidas para cada poço em placas de 24 poços. Após 24h foram infectadas com diluições seriadas dos estoques de vírus Chikungunya. Essas células foram incubadas em estufa a 37°C, 5% CO₂ durante 1 hora para que houvesse adsorção do vírus. Após isso, o inóculo foi substituído pelo meio semi-sólido, contendo 1% de metilcelulose, configurando um volume final de 2 mL por poço. Após 48h de infecção, as placas foram fixadas com formaldeído 4% e depois foram submetidas ao corante cristal violeta 3% e subsequente lavagem em água para realização de contagem olho nu do número de placas formadas. O resultado da contagem foi expresso em unidades formadoras de placas/mL.

5.2 Infecção de células SH-SY5Y

Inicialmente, células SH-SY5Y foram cultivadas em garrafas para culturas de células, em meio DMEM, suplementado com 10% soro bovino fetal (SFB), 1% penicilina/estreptomicina, 1% aminoácidos não essenciais e 1% de piruvato, visando sua expansão para posterior transferência para placas de 24 poços ($1,5 \times 10^5$ células/poço). Após isso, a placa foi incubada em uma estufa a 37°C , 5% CO_2 para a realização da etapa de inserção do inóculo.

Após 24 horas do plaqueamento, o ensaio foi realizado em triplicata, utilizando MOI de 0,5 do vírus. Concomitantemente, as células também foram submetidas ao tratamento com LPS, para indução da via (controle positivo), a uma concentração de $20 \mu\text{g/mL}$, a fim de estabelecer comparações a respeito da ativação da via para as diferentes análises.

Após esse tempo o inóculo foi removido para subsequente adição de $500 \mu\text{L}$ de meio DMEM para em seguida a placa ser mantida por 2 dias em estufa.

5.3 Microscopia de imunofluorescência

Foi realizada com o intuito de verificar se o vírus é capaz de infectar as células SH-SY5Y em cultura. Dessa forma, foi realizada uma imunomarcagem do vírus com anticorpo monoclonal específico ([B1413M] abcam) obtido a partir de lisado celular. Inicialmente as células foram semeadas em placas de 24 poços ($1,5 \times 10^5$ células/poço) com lamínulas de vidro de 13 mm de espessura. Após isso, foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C , 5% CO_2 para que pudessem aderir às lamínulas no fundo da placa.

No dia seguinte foram infectadas com CHIKV (MOI 0,5) deixando também células não infectadas como controles negativo (MOCK). Desse modo, as células foram fixadas com cetona nos diferentes intervalos de tempo de infecção (12, 24, 36 e 48 horas) e marcadas por FITC, além de corada com DAPI para evidenciar o núcleo. Posterior análise em microscopia de fluorescência foi realizada (Microscópio Nikon).

5.4 Cinética de replicação viral

Esta etapa foi realizada por meio de ensaio de placa, em que o sobrenadante de cultura dos diferentes intervalos de tempo foram inoculados em células VERO (ATCC CCL-81) para posterior contagem de placas após 48 horas de incubação a 37°C , 5% CO_2 .

5.5 Viabilidade celular

Para realização desta análise, inicialmente, as células foram tripsinizadas da placa e incubadas a 37°C durante 5 minutos. Após isso, estas foram ressuspensas em 50 µL de SFB, para que a tripsina seja inativada, e em seguida transferidas para uma placa de 96 poços (fundo U) para centrifugação a 130g durante 10 minutos a 4°C. Depois estas células foram ressuspensas em 100 µL de 1x Binding Buffer e posteriormente foram adicionados 5 µL do marcador de fosfatidilserina Anexina-V conjugado ao FITC e 5 µL do intercalador de DNA 7-AAD conjugado ao PE. Dessa forma, a placa foi incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. Antes da leitura no citômetro foram adicionados 400 µL de 1x Binding Buffer. O citômetro utilizado foi o FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), plataforma equipada, com 2 lasers e com capacidade para analisar até 4 cores. Os dados gerados foram obtidos no software FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e analisados no FlowJo V10 e no GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA).

5.6 Marcação de caspase-1

As células SH-SY5Y foram semeadas em placas de 24 poços ($1,5 \times 10^5$ células/poço) para serem infectadas com o CHIKV (MOI 0,5). Após 2 dias da infecção foi realizada a lavagem dessas células e subsequente coleta. Então, essas foram marcadas utilizando o kit FAM FLICA Assay (Bio-Rad Antibodies) com o objetivo de realizar a marcação de caspases-1 ativadas, seguindo as recomendações do fabricante. A análise foi realizada no FACSaria III (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os dados foram gerados através do software FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e analisados no FlowJo e GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA).

5.7 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA)

As concentrações de IL-1 β foram obtidas em sobrenadantes de cultura de SH-SY5Y através do kit Duoset ELISA Anti-IL1 β de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems).

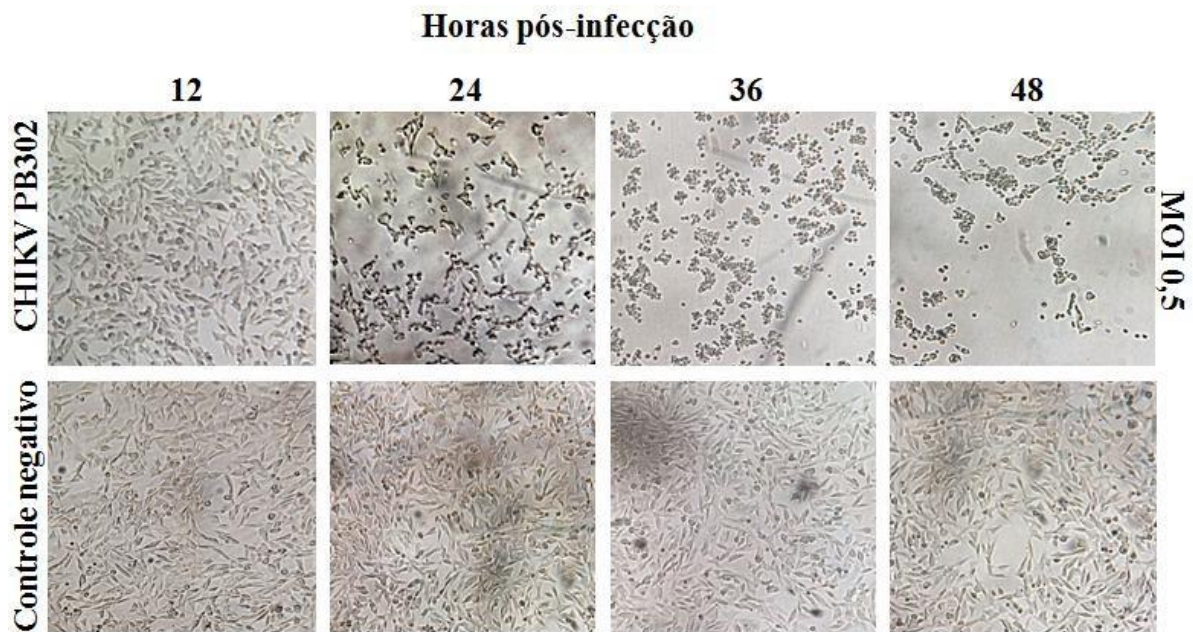
5.8 Análise Estatística

De acordo com as variáveis, teste *two-way* ANOVA foi realizado, fazendo uso do programa GraphPad Prism 7.0. Considerou-se significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Células de linhagem neuronal SH-SY5Y foram infectadas utilizando um MOI de 0,5 do CHIKV. A partir de então foram realizadas observações acerca dos efeitos citopáticos provocados pelo vírus nos diferentes intervalos de tempo (Figura 10).

Figura 10 - Aspectos morfológicos das células SH-SY5Y em cada intervalo de tempo de infecção (MOI 0,5)



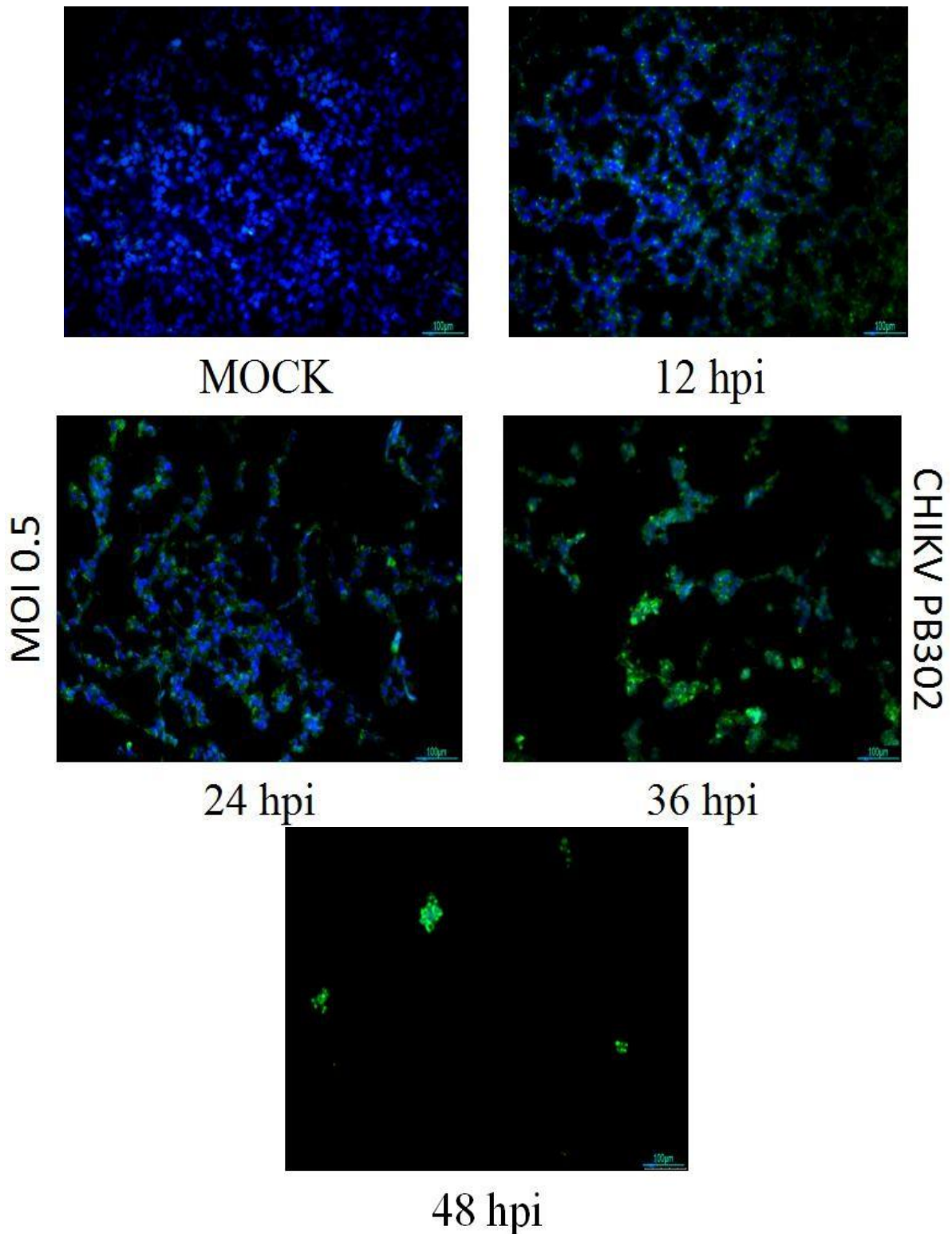
Fonte: o autor, 2018.

O CHIKV induz efeitos citopáticos característicos que já foram descritos anteriormente, como arredondamento celular, desprendimento do tapete de células e formação de aglomerados celulares (DHANWANI et al., 2011). É possível observar todas essas características no presente ensaio. No início da infecção (12 hpi) as células continuam íntegras conservando uma morfologia natural epitelial, sendo perceptíveis os primeiros efeitos citopáticos às 24 hpi, como uma desorganização do tapete celular e um discreto arredondamento da forma da célula. Às 36 hpi pode ser constatado um arredondamento notório dessas células, um desprendimento de uma significativa parcela delas, além da formação de alguns aglomerados. No último intervalo de tempo (48 hpi) é possível perceber que todo o tapete celular se encontra solto e o número de aglomerados é consideravelmente maior (Figura 10).

6.1 Microscopia de imunofluorescência

Foram realizadas análises nos diferentes intervalos de tempo, utilizando FITC como marcador de anticorpo secundário, visando marcação do vírus no interior das células, e o corante DAPI com o objetivo de evidenciar o núcleo (Figura 11).

Figura 11 - Microscopia de imunofluorescência evidenciando antígeno do CHIKV (poliproteína estrutural) em células SH-SY5Y em um aumento de 10X



Fonte: o autor, 2019

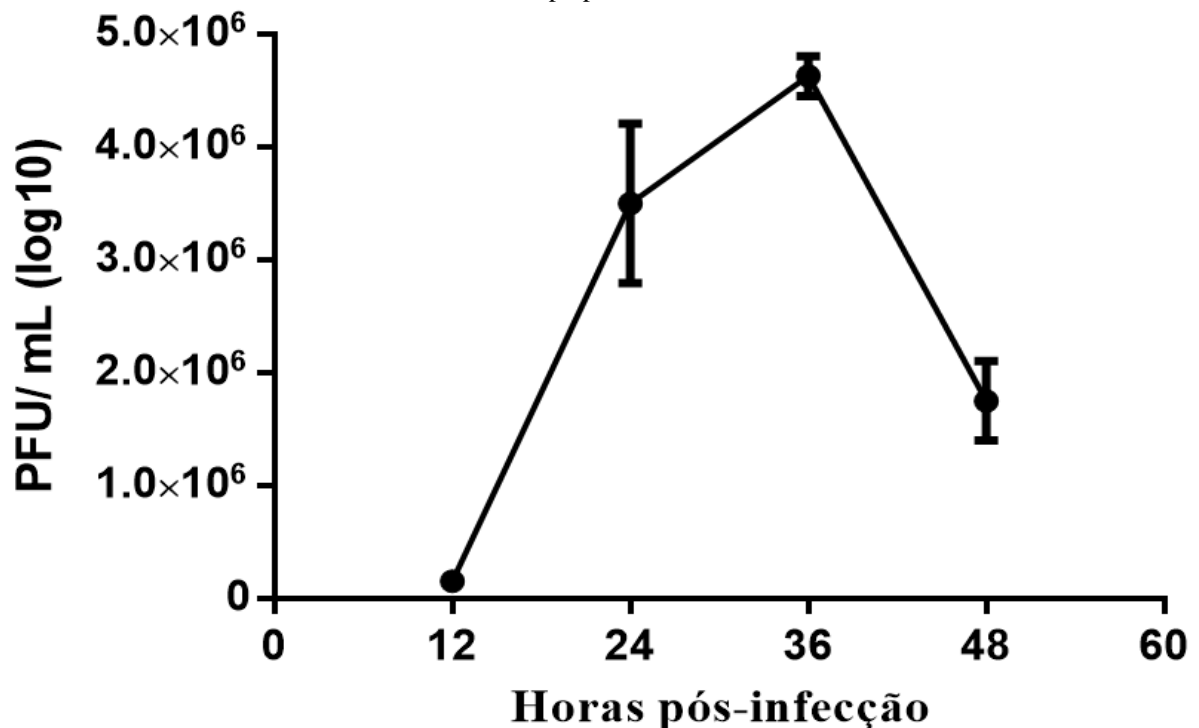
Nota: Nesse ensaio foi utilizado um MOI de 0,5 em $1,5 \times 10^5$ células. A marcação foi realizada utilizando anticorpo obtido a partir de lisado viral e anticorpo secundário conjugado ao FITC. Para corar núcleo celular foi utilizado o corante DAPI

É notável, com o decorrer do tempo, uma significativa diminuição da quantidade de células viáveis. Em 24 hpi nota-se uma inicial desorganização do tapete celular. Em 36 hpi podem ser destacados a formação de sincícios multinucleados e uma evidente desorganização do tapete celular. Já em 48 hpi pode-se perceber uma significativa diminuição no número de células viáveis, sendo observados poucos sincícios (Figura 11).

6.2 Cinética de replicação viral

A cinética de replicação foi realizada por meio de ensaio de placa, utilizando placas de 24 poços, em quadruplicata, utilizando células VERO. A curva de crescimento apontou um pico da replicação no intervalo de tempo de 36 hpi com subsequente declínio até às 48 hpi devido a alta quantidade de células mortas presentes na cultura (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico de cinética de replicação viral apresentando a curva de replicação em todos os intervalos de tempo previstos

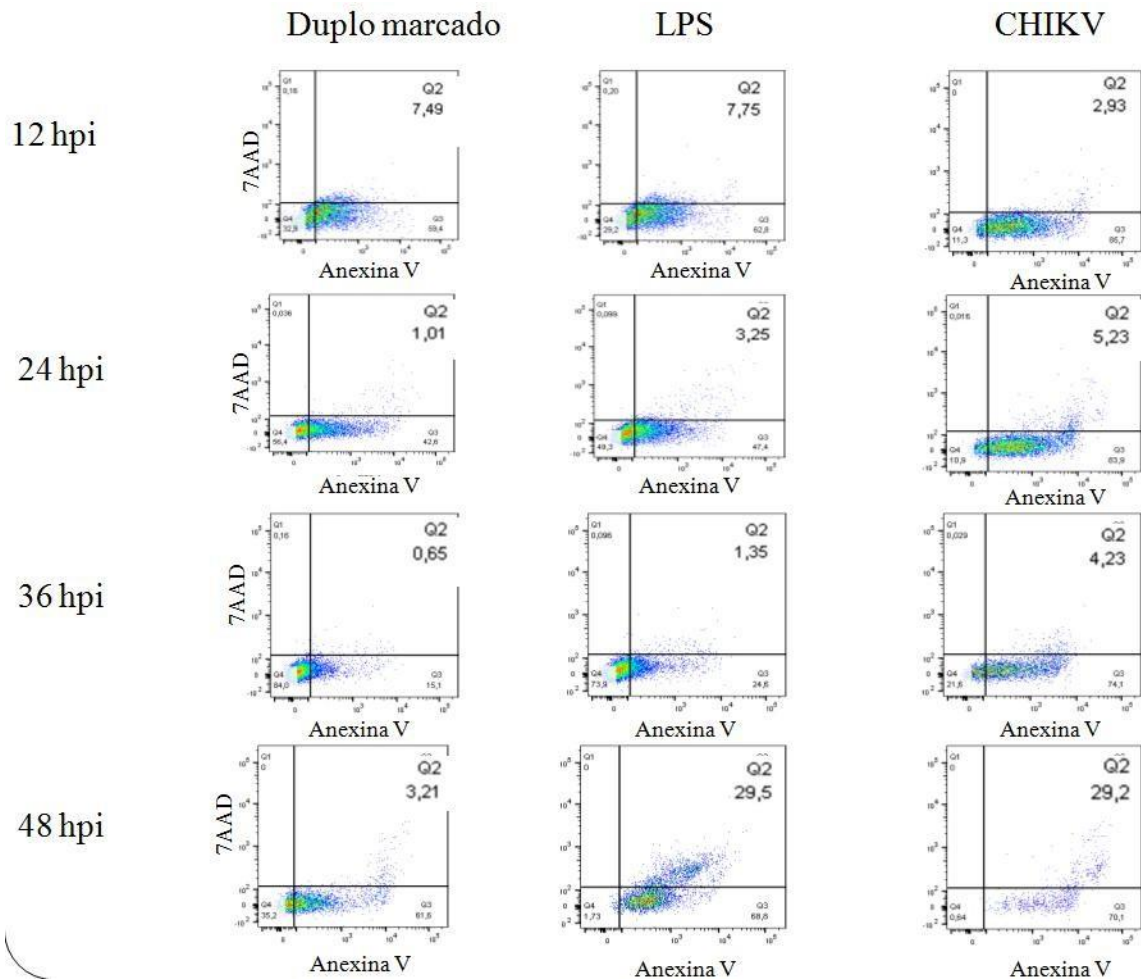


Fonte: o autor, 2018

6.3 Viabilidade celular

O ensaio foi dividido em três grupos. Células não infectadas (controle negativo), células administradas com LPS (indutor da via do inflamassoma), que funcionou como um controle positivo e células infectadas pelo CHIKV nos quatro diferentes tempos pós- infecção. Nota-se que o infectado possui diferença significativa em 48 hpi em relação ao controle e LPS, porém, nota-se inconsistências em relação à progressão dos tempos a partir das 12 hpi nas três análises (Figura 13).

Figura 13 - Análise realizada no FACS Aria III para identificação da população em apoptose na cultura de células SH-SY5Y

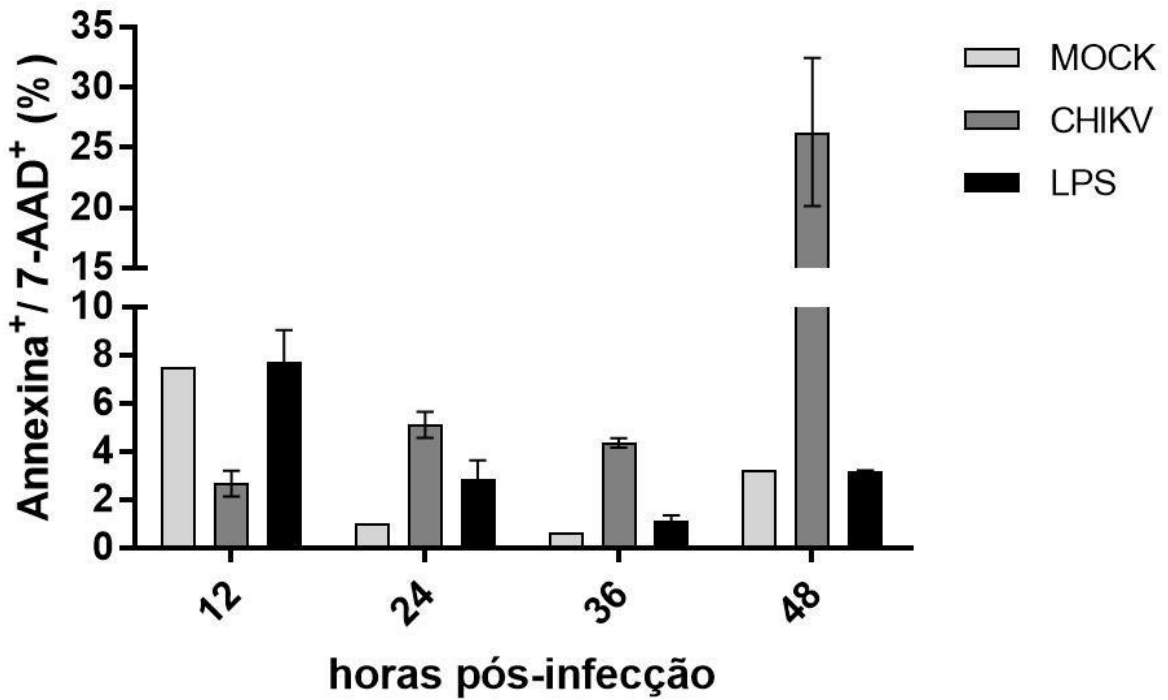


Fonte: o autor, 2018

Nota: Duplo marcado sem o vírus, LPS (indutor da ativação da via do inflamassoma) e células infectadas pelo CHIKV nos diferentes tempos pós-infecção.

Os marcadores utilizados foram Anexina V e 7AAD, submetidos ao FACS Aria III, posteriormente analisados no software FlowJo e verificados quanto à significância estatística no GraphPad Prism 5.0 (Figura 14).

Figura 14 - Análise de viabilidade celular nos diferentes tempos pós-infecção para células submetidas a LPS e ao vírus, além do controle (não-infectado)

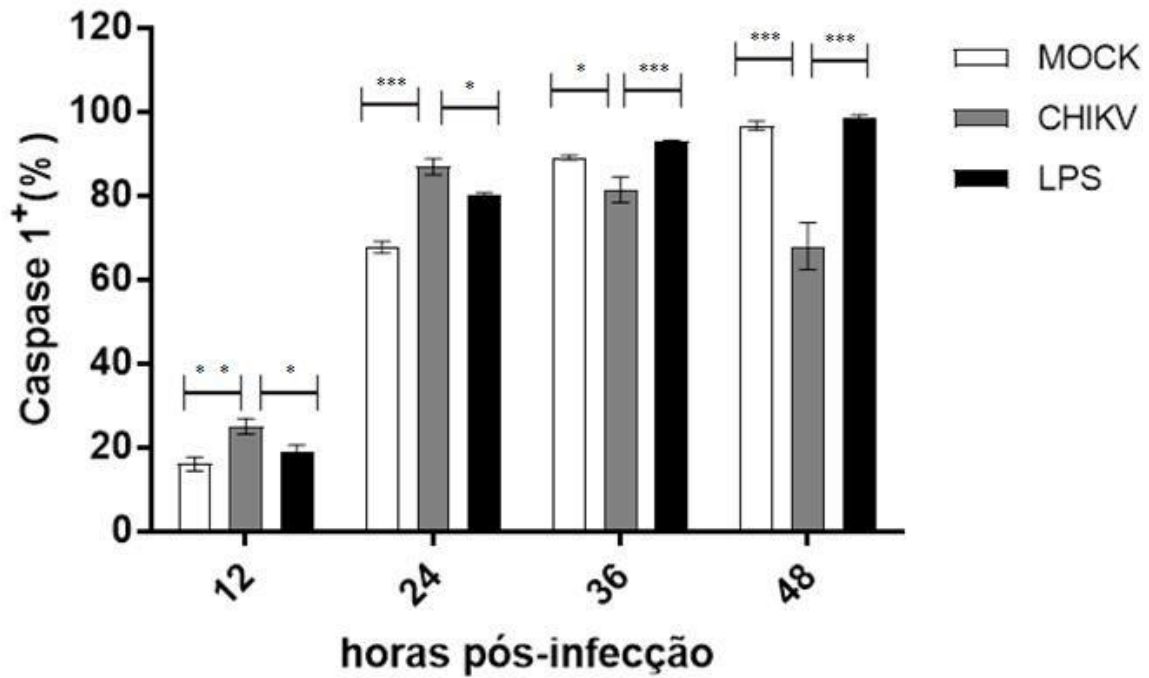


Fonte: o autor, 2018.

6.4 Marcação caspase-1

Um dos componentes da via é a caspase-1 que foi também utilizada como um dos requisitos para a identificação da ativação da via em estudo. O gráfico abaixo (Figura 15) demonstra como se dá a cinética da produção de caspase-1 nos diferentes tempos pós-infecção, e nota-se que os níveis dessa enzima crescem substancialmente com a progressão dos tempos nas células estimuladas com LPS, já nas infectadas nota-se uma leve diminuição nos níveis, o que se justifica pelo número decrescente de células viáveis devido à infecção.

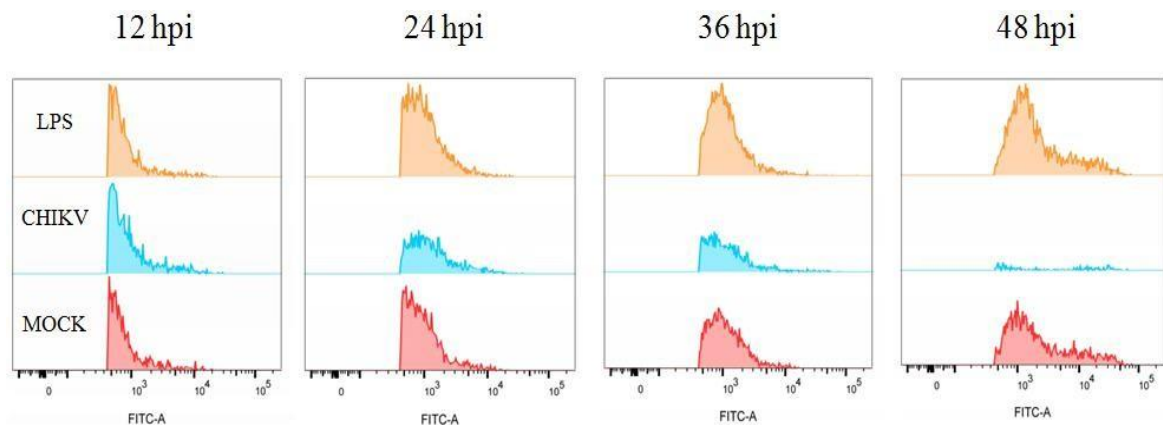
Figura 15 - Marcação de caspase-1, nos diferentes tempos pós-infecção/indução



Fonte: o autor, 2018.

É possível perceber essa dinâmica por um ângulo diferente, por meio dos histogramas (Figura 16).

Figura 16 - Análise por histograma dos níveis de caspase-1 marcados ao longo do ensaio. Análises realizadas para LPS (indutor da ativação da via), células infectadas e controle (não-infectados)

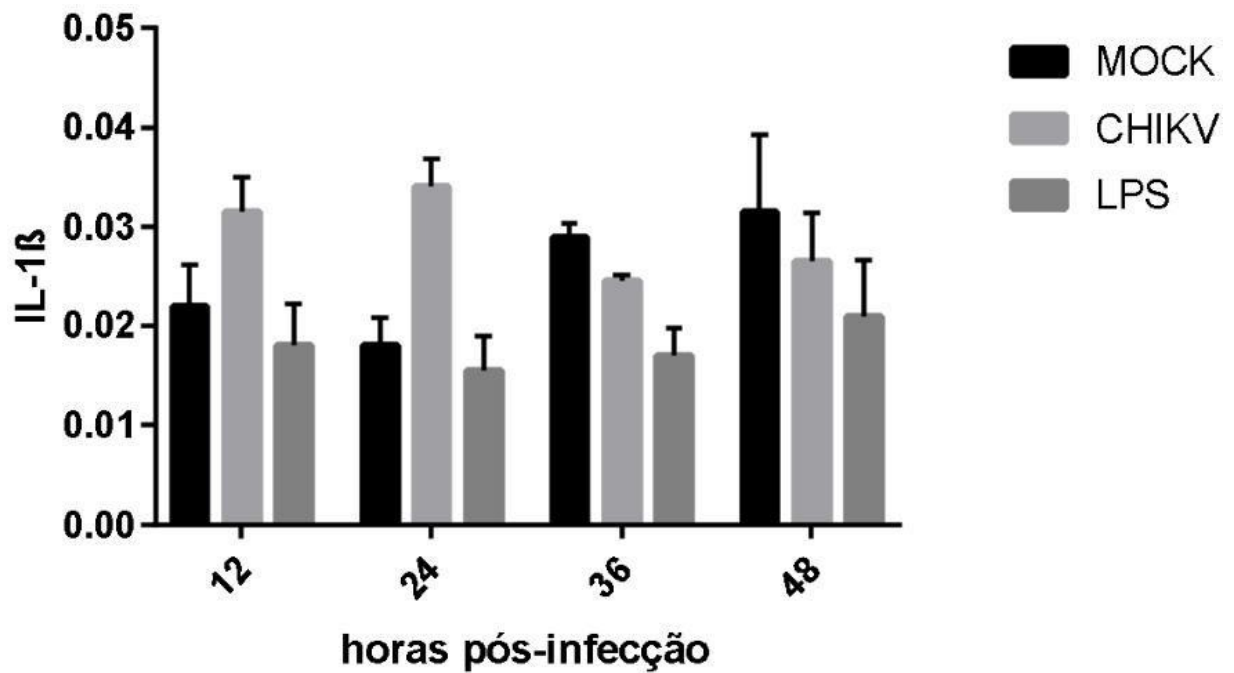


Fonte: o autor, 2018.

6.5 Quantificação de IL-1 β em sobrenadante

A pesquisa da citocina pró-inflamatória IL-1 β , produto final da via em estudo, foi realizada por meio do ensaio ELISA direto para as amostras controle, para as submetidas ao LPS (controle de indução) e às amostras submetidas à infecção pelo CHIKV (Figura 17).

Figura 17 - Ensaio ELISA direto para pesquisa da citocina pró-inflamatória IL-1 β



Fonte: o autor, 2018.

7 DISCUSSÃO

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos que regem a imunopatogênese do CHIKV no SNC, para isso é importante que sejam realizados estudos com linhagens de células apropriadas para se certificar acerca da resposta daquelas ao vírus. Sabe-se que citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas com a inflamação no SNC e que isso facilita também à entrada do vírus por meio da barreira hematoencefálica por mecanismos ainda desconhecidos, além da entrada de leucócitos no curso da infecção (CARINE; BERGMANN, 2008; MCGAVEN; KANG, 2011). A resposta inflamatória se dá a partir do reconhecimento do vírus por meio de sensores que podem ser do tipo Toll (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9) além dos RLRs (RIG-I e MDA5). No contexto da via em estudo, a ativação se dá por meio de sensores NOD-like (NLRP1b, NLRP3, NLRP6 e NLRC4) em que o NLRP3 é o mais estudado no contexto das doenças virais (NEGASH et al., 2019; RODRIGUEZ et al., 2019; WANG et al., 2018).

Neste estudo foi utilizada a linhagem neuroblastoma (SH-SY5Y) a fim de verificar a sua resposta mediante infecção pelo CHIKV. Nos resultados acima, é possível verificar que os efeitos citopáticos do CHIKV em células SH-SY5Y são notáveis a partir de 24 hpi e se intensificam com o decorrer dos tempos. Pode-se incluir como principais efeitos visíveis, a desorganização do tapete celular, o encolhimento celular, descolamento da placa e a formação de agregados. Com isso também se seguem a posterior lise celular liberando novos vírions resultando em morte celular e conseqüente decréscimo na viabilidade da cultura. Outro estudo, realizado por Dhanwani et al (2012), onde foi realizada uma caracterização da infecção pelo CHIKV nessa mesma linhagem celular, mostra a geração dos mesmos efeitos. Assim como em CHIKV, outro arbovírus atualmente bem estudado, o ZIKV, tem sido caracterizado diante dessa linhagem de células, sendo identificados efeitos próximos como encolhimento celular e descolamento de superfície (ALPUCHE- LAZCANO et al., 2018; LUPLERTLOP et al., 2017).

Utilizando anticorpos específicos anti-CHIKV (não reagente com outros alfavírus) com o intuito de avaliar se as células SH-SY5Y são de fato suscetíveis e permissivas ao vírus, foi verificado que o vírus é capaz de infectar e se replicar nessa linhagem (Figura 11). Em um MOI de 0.5 o vírus foi capaz de destruir todo o tapete de células em 48 hpi, sendo este o último tempo de avaliação da resposta celular. O mesmo experimento também foi realizado por Dhanwani et al (2012) e também foi observada a suscetibilidade dessa linhagem ao vírus além de ter evidenciado fragmentação do núcleo dessas células durante a infecção. Em estudo

prévio tem sido verificada suscetibilidade e permissividade em cultura de células neuronais, tanto para uma outra linhagem neuroblastoma (IMR-32) como em modelos primários (DAS et al., 2015; HOARAU et al., 2010). Da mesma forma, foi demonstrado que a linhagem U-87MG (glioblastoma) foi suscetível à infecção por CHIKV (cepa RGCB355/KL08) apresentando efeitos citopáticos de maneira tempo e dose dependentes a partir de 48 hpi (ABRAHAM et al., 2013). Já em modelo animal foi constatado o mesmo resultado, além da preferência de infecção do CHIKV por células neuronais do cerebelo (PRIYA; PATRO; PARIDA, et al., 2014). Durante a infecção, a cinética de replicação se mostrou crescente entre 12 hpi e 36 hpi, sendo neste último ponto o seu pico, e um comportamento decrescente entre 36 hpi e 48 hpi devido ao pequeno número de células em cultura, tornando insuficiente a liberação de mais partículas virais para o sobrenadante (Figura 12). O mesmo ensaio também realizado por Dhanwani et al (2012), verificou-se um pico da cinética de replicação em 48 hpi em um MOI de 0.1. Já Abraham et al (2013) observou um pico na cinética de replicação em 24 hpi em MOIs de 0.1, 1 e 10 em linhagem U-87 MG . É importante ressaltar que o CHIKV, assim como outros alfavírus, possuem um alto *fitness* replicativo (SCHUFFENECKER et al., 2006; TSETSARKIN et al., 2007), induzindo morte e estresse celular cada vez mais rapidamente à medida que se aumenta o MOI, com isso torna-se importante escolher uma concentração ideal de partículas virais para o experimento. Em um MOI abaixo de 1 é possível compreender que haverá um determinado número de células espectadoras que estarão respondendo ao estresse de células que já foram infectadas, sendo portanto, possível captar todos os eventos imunológicos (JOUBERT et al., 2012a; JOUBERT et al., 2012b).

É notável que a partir de 36 hpi a viabilidade celular cai de maneira acentuada, confirmando assim, o experimento da cinética de replicação do vírus onde em 36 hpi é constatado seu pico de replicação. No estudo de Dhanwani et al (2012) também foi realizado o ensaio de viabilidade, porém utilizando o MOI de 1, resultando assim, em aumento na taxa de morte celular a partir de 24 hpi.

As caspases são uma família de proteases de número limitado de substratos muito importantes no contexto da morte celular e inflamação, nesta, a caspase-1 possui papel substancial na via do inflamassoma na maturação da IL-1 β (NICHOLSON, 1999). No presente estudo foram avaliados níveis de caspase-1 nos diferentes tempos pós-infecção e também níveis de IL-1 β . Observa-se que os níveis de caspase-1 aumentam gradativamente durante a infecção, o que sinaliza a ativação dessa enzima para clivagem de pró-IL-1 β e posterior liberação da IL-1 β madura para o meio extracelular (DINARELLO, 1996;

RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012). Não só a caspase-1 é necessária no contexto da maturação da IL-1 β , mas outras caspases, também da família das caspases inflamatórias, têm sido reportadas nessa função, como as caspases-4 e 5 (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; VEERDONK et al., 2011). Entre 36 hpi e 48 hpi é possível perceber um decréscimo nos níveis de caspase-1, provavelmente devido ao reduzido número de células viáveis na cultura, o que evidentemente não ocorre com as amostras submetidas ao LPS. Em astrócitos de camundongos foi constatado um pico de expressão de caspase-1 em 24 hpi, configurando assim, uma demanda pela enzima para resposta inflamatória (DAS et al., 2015). Em soro de pacientes infectados com CHIKV foi observado que há alta expressão dessa enzima na fase aguda da doença, além de ser diretamente proporcional à carga viral (CHEN et al., 2017). Já em modelo *in vivo* é possível constatar que os níveis de expressão da enzima aumentam do primeiro dia pós- infecção (dpi) até o 7º, sendo detectados baixos níveis no 15º dpi, o qual é discutido sobre respostas anti-inflamatórias que podem estar atuando nessa fase da doença (CHEN et al., 2017).

A IL-1 β é uma citocina amplamente expressa em monócitos e neutrófilos principalmente quando diz respeito à resposta imune contra vírus (CHEN et al., 2014; HER et al., 2010; KARMAKAR et al., 2015; NAHRENDORF; PITTET; SWIRSKI, 2010), e de considerável relevância no que diz respeito ao metabolismo imunológico, pois está envolvida como vasodilatador, indutor de prostaglandinas, fator ativador de linfócitos, além de ativar proliferação de timócitos (GERY; WAKSMAN, 1972; SCHETT; DAYER; MANGER, 2015), ativação completa de neutrófilos (SUMMERS et al., 2010). No presente trabalho, em relação aos níveis da citocina pró-inflamatória IL-1 β , não houve diferenças estatísticas significativas nos diferentes tempos, tanto para amostras de células infectadas como para de células submetidas ao LPS (Figura 17). Alguns estudos prévios mostram que não houve identificação desta citocina em soro de pacientes na fase aguda da doença (CHIRANTHAWORN et al., 2013; HOARAU et al., 2010), além de não ter sido identificada também durante infecção em cultura primária de monócitos primários humanos (HER et al., 2010), entretanto, o estudo conduzido por VENUGOPALAN; GHORPADE; CHOPRA, (2013) mostra que houve altos níveis de IL-1 β detectados em soro de uma coorte infectada oriunda da Índia. Em cultura primária de fibroblastos também foi possível observar alta expressão de IL-1 β durante infecção por CHIKV a partir de 24 hpi, no entanto sem dados à respeito do sobrenadante de cultura (EKCHARIYAWAT et al., 2015). Em PBMCs coletados de pacientes na fase aguda da doença tem sido visto que IL- 1 β estava superexpresso, e que utilizando um inibidor de NLRP3 (MCC950) essa superexpressão não era mais observada.

Dados da citocina em soro de 14 pacientes foram avaliados por meio do ELISA, sendo observados altos níveis na fase aguda (CHEN et al., 2017). À respeito de células de linhagem neuronal, há o estudo realizado por Dhanwani et al (2012), onde durante infecção pelo CHIKV foi verificado que há uma alta expressão de IL-1 β nos tempos de 36 e 48 hpi, porém não se tem informações sobre níveis em sobrenadante de cultura. Das et al (2015) também consegue verificar altos níveis de expressão de IL-1 β em cultura de astrócitos, oligodendrócitos e neurônios embriônicos (cultura primária) a partir de 24 hpi em um MOI de 1. Em culturas de células U-87MG (linhagem oriunda de astrócitos) foi observada uma superexpressão de IL-1 β a partir de 24 hpi, bem como outras citocinas e quimiocina importantes como IL-6, TNF- α e CXCL9 (ABRAHAM et al., 2013). Em modelo animal, também foi possível verificar o alto nível de expressão da mesma citocina, bem como outras citocinas relacionadas à imunopatogênese da doença, como IL-6, OAS e IFN- γ , porém sem evidências de complicações neurológicas associadas (DHANWANI et al., 2011).

8 CONCLUSÕES

O CHIKV PB302 é capaz de infectar e se replicar em células de linhagem neuroblastoma (SH- SY5Y), ativando assim, a via do inflamassoma estimulando a ativação de mais caspase-1 à medida que o tempo de infecção aumenta. Porém, são necessários mais estudos a cerca dos mecanismos que estão por trás dessa resposta, especificamente em relação à ativação da caspase-1 em linhagens do SNC.

REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against chikungunya virus. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 121, p. 59–68, 2015.
- ABRAHAM, R. et al. Induction of Cytopathogenicity in Human Glioblastoma Cells by Chikungunya Virus. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, p. 1–14, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0075854&type=printable>> Acesso em: 25 jan. 2018
- ACHARYA, D. et al. Loss of Glycosaminoglycan Receptor Binding after Mosquito Cell Passage Reduces Chikungunya Virus Infectivity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, 2015. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0004139&type=printable>> Acesso em: 26 jan. 2018.
- AGARWAL, A. et al. Guillain-Barre syndrome complicating chikungunya virus infection. **Journal of NeuroVirology**, Houndmills, v. 23, n. 3, p. 504–507, 2017.
- AKAHATA, W. et al. A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. **Nature Medicine**, New York, v. 16, p. 334– 338, 2010.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Functions of toll-like receptors: Lessons from KO mice. **Comptes Rendus - Biologies**, Paris, v. 327, p. 581–589, 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069104000812?via%3Dihub>> Acesso em: 30 maio 2018.
- ALEXOPOULOU, L. et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- kappa B by Toll-like receptor 3. **Nature**, London, v. 413, p. 732–738, 2001.
- ALLEN, I. C. The NLRP3 Inflammasome Mediates In Vivo Innate Immunity to Influenza A Virus Through Recognition of Viral RNA. **Immunity**, Cambridge, v.30, p.556-565, 2009. Disponível em: <<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1074-7613%2809%2900139-3>> Acesso em: 12 abr. 2018.
- ALPUCHE-LAZCANO, S. P. et al. Higher Cytopathic Effects of a Zika Virus Brazilian Isolate from Bahia Compared to Canadian-Imported Thai Strain. **Viruses**, Basel, v.10, p.1-15, 2018. Disponível em: <[file:///C:/Users/Cantalice/Downloads/viruses-10-00053-v2%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Cantalice/Downloads/viruses-10-00053-v2%20(1).pdf)> Acesso em: 11 abr. 2018.
- ALTHOUSE, B. M. et al. Impact of climate and mosquito vector abundance on sylvatic arbovirus circulation dynamics in senegal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 92, p. 88–97, 2015.
- ANGELINNI, R. et al. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. **Europe's journal on infectious disease surveillance, epidemiology, prevention and control**, Stockholm, v.12, 2007. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/esw.12.36.03260-en>> Acesso em: 25 jan 2018.

- AKHRYMUK, I.; KULEMZIN, S. V.; FROLOVA, E. I. Evasion of the Innate Immune Response: the Old World Alphavirus nsP2 Protein Induces Rapid Degradation of Rpb1, a Catalytic Subunit of RNA Polymerase II. **Journal of Virology**, Washington, v. 86, p. 7180–7191, 2012.
- ARANKALLE, V. A. et al. Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963- 2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. **Journal of General Virology**, London, v. 88, p. 1967–1976, 2007.
- ASHBROOK, A. W. et al. Antagonism of the Sodium-Potassium ATPase Impairs Chikungunya. **mBio**, Washington, v. 7, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<https://mbio.asm.org/content/mbio/7/3/e00693-16.full.pdf>> Acesso em: 14 maio 2018.
- ASHBROOK, A. W. et al. Residue 82 of the Chikungunya Virus E2 Attachment Protein Modulates Viral Dissemination and Arthritis in Mice. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, p. 12180–12192, 2014.
- BORGHERINI, G. et al. Outbreak of Chikungunya on Reunion Island: Early Clinical and Laboratory Features in 157 Adult Patients. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 44, p. 1401–1407, 2007.
- BRANDLER, S. et al. A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus- like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. **Vaccine**, Kidlington, v. 31, p. 3718–3725, 2013.
- BROECKEL, R. et al. Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model). **Pathogens**, Basel, v. 4, p. 662–681, 2015.
- CASSADOU, S. et al. Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 19, p. 1–4, 2014. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/docserver/fulltext/eurosurveillance/19/13/art20752en.pdf?expires=1558537104&id=id&acname=guest&checksum=D068CEE0FD3FAC114B5E7715A4F404B9>> Acesso em: 16 jun 2018.
- CECILIA, D. et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses. **Archives of Virology**, Wien, v. 160, p. 323–327, 2015.
- CHANG, L. J. et al. Safety and tolerability of chikungunya virus-like particle vaccine in healthy adults: A phase 1 dose-escalation trial. **The Lancet**, London, v. 384, p. 2046– 2052, 2014. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(14\)61185-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(14)61185-5/fulltext)> Acesso em: 12 fev. 2018.
- CHEN, K. C. et al. Comparative analysis of the genome sequences and replication profiles of chikungunya virus isolates within the East, Central and South African (ECSA) lineage. **Virology journal**, London, v. 10, p. 169, 2013.
- CHEN, K. W. et al. The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 β Maturation without Pyroptosis during Acute *Salmonella* Challenge. **Cell Reports**, Cambridge, v.8, p.570-582, 2014. Disponível em:

<<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2211-1247%2814%2900497-5>> Acesso em: 23 jun. 2018.

CHEN, W. et al. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by Chikungunya Virus Infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 89, p. 581–593, 2015.

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

CHIRANTHAWORN, C. et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Mumbai, v.6, p.631-634, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S199576451360108X?via%3Dihub>> Acesso em: 21 abr. 2018.

CHRETIEN, J. et al. Drought- associated chikungunya emergence along coastal East Africa. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.76, p.405- 407, 2007.

CLAYTON, A. M. Monoclonal antibodies as prophylactic and therapeutic agents against chikungunya virus. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 214, p. S506–S509, 2016.

COMPTON, T. et al. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, p. 4588–4596, 2003.

COUDERC, T.; LECUIT, M. Focus on Chikungunya pathophysiology in human and animal models. **Microbes and Infection**, Paris, v. 11, p. 1197–1205, 2009.

CUNHA, R. V. DA; TRINTA, K. S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, p. 523–531, 2017.

DANDAWATE, C. N.; et al. Serological survey in Madras city with special reference to chikungunya. **The Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v.53, p.707-714. Ago. 1965.

DHANWANI, R. et al. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus Research**, Amsterdam, v. 163, p. 563–572, 2012.

DAS T. et al. Multifaceted innate immune response engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. **Journal of General Virology**, London, v.96, 2015.

DASHY, M.; MOHANTY, I.; PADHI, S. Review article laboratory diagnosis of chikungunya virus : do we really need it ? **Indian Journal of Medical Sciences**, Bombay, v. 65, p. 83–92, 2011.

DE ALBA, E. Structure and interdomain dynamics of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, p. 32932–

32941, 2009.

DE BRITO, C. A. A. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 50, p. 585– 589, 2017.

DE BRITO, C. A. A.; TEIXEIRA, M. G. Increased number of deaths during a chikungunya epidemic in Pernambuco, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 112, p. 650–651, 2017.

DE LAMBALLERIE, X. et al. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: A sign of things to come? **Virology Journal**, London, v. 5, p. 1–4, 2008.

DELISLE, E. et al. Chikungunya outbreak Montpellier , France, October 2014.

Surveillance and Outbreak Reports, Stockholm, p. 2014, 2014. Disponível em:

<<https://www.eurosurveillance.org/docserver/fulltext/eurosurveillance/20/17/art21108-en.pdf?expires=1558558984&id=id&accname=guest&checksum=2BB0D5916C99681272514E0C459BF4AA>> Acesso em: 20 ago. 2018.

DIALLO, D. et al. Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern senegal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, p. 1– 14, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0001649&type=printable>> Acesso em: 16 set. 2018.

DIALLO, M. et al. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: Current data and transmission cycles. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 60, p. 281– 286, 1999.

DIEBOLD, S. S. et al. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. **Science**, New York, v. 303, p. 1529–1531, 2004.

DIKSHIT, N. et al. NLRP3 inflammasome pathway has a critical role in the host immunity against clinically relevant *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection. **Mucosal Immunology**, New York, v.11, p.257-272, 2017.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, New York, v.87, p.2095- 2147, 1996.

EDELMAN, R. et al. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 62, p. 681–685, 2000.

EKCHARIYAWAT, P. et al. Inflammasome signaling pathways exert antiviral effect against Chikungunya virus in human dermal fibroblasts. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 32, p. 401–408, 2015.

FELDSTEIN, L. R. et al. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus outbreak, US Virgin Islands, december 2014–february 2016. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 23, p. 673–676, 2017.

FIRTH, A. E. et al. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. **Virology Journal**, London, v. 5, p. 1–19, 2008.

FITZGERALD, K. A. et al. IKK ϵ and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling

pathway. **Nature Immunology**, New York, v.4, p.491-496, 2003.

FROLOVA, E. I. et al. Roles of Nonstructural Protein nsP2 and Alpha / Beta Interferons in Determining the Outcome of Sindbis Virus Infection Roles of Nonstructural Protein nsP2 and Alpha / Beta Interferons in Determining the Outcome of Sindbis Virus Infection. **Journal of virology**, Washington, v. 76, p. 11254–11264, 2002.

FROS, J. J. et al. Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, p. 10877–10887, 2010.

FROS, J. J. et al. Chikungunya Virus nsP3 Blocks Stress Granule Assembly by Recruitment of G3BP into Cytoplasmic Foci. **Journal of Virology**, Washington, v. 86, p. 10873–10879, 2012.

FROS, J. J. et al. The C-Terminal Domain of Chikungunya Virus nsP2 Independently Governs Viral RNA Replication, Cytopathicity, and Inhibition of Interferon Signaling. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, p. 10394–10400, 2013.

GALÁN-HUERTA, K. A. et al. Chikungunya virus: A general overview. **Medicina Universitaria**, Monterrey, v. 17, p. 175–183, 2015. Disponível em: <<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1665579615000587?token=BC5BC721AFF516D9491FD08FA78EEB99E0BBD2137BC2E13C811B12717C034B9D3F82052D0BE7CF2F3DD8183FBB8A1C91>> Acesso em: 13 ago. 2018.

GARDNER, C. L. et al. Deliberate Attenuation of Chikungunya Virus by Adaptation to Heparan Sulfate-Dependent Infectivity: A Model for Rational Arboviral Vaccine Design. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 2, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002719&type=printable>> Acesso em: 19 dez 2018.

GARDNER, J. et al. Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, p. 8021–8032, 2010.

GARMASHOVA, N. et al. The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 2472–2484, 2007.

GASQUE, P. et al. Chikungunya Virus Pathogenesis and Immunity. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, New York, v. 15, p. 241–249, 2015. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2014.1710?rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&journalCode=vbz> Acesso em: 20 mai 2018.

GASSE, P. et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 179, p. 903–913, 2009.

GAY, B. et al. PH-dependent entry of chikungunya virus into *Aedes albopictus* cells. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdam, v. 12, p. 1275–1281, 2012.

GAY, N. et al. Seroprevalence of asian lineage chikungunya virus infection on saint martin Island, 7 months after the 2013 emergence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 94, p. 393–396, 2016.

GÉRARDIN, P. et al. Chikungunya virus – associated encephalitis: A cohort study on La Réunion Island, 2005-2009. **Neurology**, New York, v.86, p.94-102, 2015.

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

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 5, p. 0413–0423, 2008. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosmedicine/article/file?id=10.1371/journal.pmed.0050060&type=printable>> Acesso em: 13 ago 2018.

GÉRARDIN, P. et al. Neurocognitive Outcome of Children Exposed to Perinatal Mother-to-Child Chikungunya Virus Infection: The CHIMERE Cohort Study on Reunion Island. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002996&type=printable>> Acesso em: 4 abr 2018.

GERY, I.; GERSHON, R. K.; WAKSMAN, B. H. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.136, n.1, p.128-142, 1972.

GIFFORD, G. E.; HELLER, E. Effect of actinomycin D on interferon production by ‘active’ and ‘inactive’ chikungunya virus in chick cells. **Nature**, London, v.200, p.50-1, 1963.

GIGANTE, A. et al. Identification of [1,2,3]Triazolo[4,5-d]pyrimidin-7(6H)-ones as Novel Inhibitors of Chikungunya Virus Replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 7, 2013.

GILLIET, M.; CAO, W.; LIU, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, p. 594–606, 2008.

GITLIN, L. et al. Essential role of MDA-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic: polybocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.103, p.8459-8464, 2006.

GLASGOW, L. A. Transfer of interferon-producing macrophages: new approach to viral chemotherapy. **Science**, New York, v.170, p.854-856, 1970.

GOO, L. et al. A Virus-Like Particle Vaccine Elicits Broad Neutralizing Antibody Responses in Humans to All Chikungunya Virus Genotypes. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 214, p. 1487–1491, 2016.

GORCHAKOV, R. et al. Attenuation of Chikungunya Virus Vaccine Strain 181/Clone 25 Is Determined by Two Amino Acid Substitutions in the E2 Envelope Glycoprotein. **Journal of**

Virology, Washington, v. 86, p. 6084–6096, 2012.

GRANDADAM, M. et al. Chikungunya virus, Southeastern France. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, p. 910–913, 2011.

GRATZ, N. G. Clinical review of the vector status of *Aedes albopictus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v.18, p.215-227, 2004.

GUDO, E. S.; BLACK, J. F. P.; CLIFF, J. L. Chikungunya in Mozambique: A Forgotten History. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, p. 5–9, 2016.

HACKER, H. et al. Specificity in Toll-like receptor signaling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. **Nature**, London, v.439, p.204-207, 2006.

HALLE, A.; et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . **Nature Immunology**, New York, v.9, p.857-865, 2008.

HALLENGARD, D. et al. Novel Attenuated Chikungunya Vaccine Candidates Elicit Protective Immunity in C57BL/6 mice. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, p. 2858–2866, 2014.

HALSTEAD, S. B.; et al. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.10, p. 997-1021, 1969.

HE, Z.; et al. The NLRP3 inflammasome activation mediates Zika virus associated inflammation. **The Journal of Infectious Diseases**, v.217, p.1942-1951, Atlanta, 2018.

HER, Z. et al. Active Infection of Human Blood Monocytes by Chikungunya Virus Triggers an Innate Immune Response. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.184, p.5903-5913, 2010.

HISE, A. G. et al. An Essential Role for the NLRP3 Inflammasome in Host Defense against the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 5, p. 487–497, 2009.

HOARAU, J. J. et al. Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 184, p. 5914–5927, 2010.

HOKE, C. H. et al. US Military contributions to the global response to pandemic Chikungunya. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, p. 6713–6720, 2012.

HONDA, K. et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, London, v.434, p.772-777, 2005.

HORNUNG, V. et al. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. **Science**, New York, v.314, p.994-997. 2006.

HYDE, J. L. et al. The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs - Non-coding is not non-

functional. **Virus Research**, Amsterdam, v. 206, p. 99–107, 2015.

JACOBS, S. C. et al. Mutation of a conserved nuclear export sequence in chikungunya virus capsid protein disrupts host cell nuclear import. **Viruses**, Basel, v. 9, 2017. Disponível em: < <https://www.mdpi.com/1999-4915/9/10/306>> Acesso em: 19 fev. 2018.

JOUBERT, P. E. et al. Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.209, p.1029-1047, 2012. Disponível em: < <http://jem.rupress.org/content/jem/209/5/1029.full.pdf>> Acesso em: 20 out. 2018.

JOUBERT, P. E. Chikungunya virus-induced cell death is limited by ER and oxidative stress-induced autophagy. **Autophagy**, Georgetown, v.8, p.1261-263, 2013.

KÄÄRIÄINEN, L.; AHOLA, T. Functions of alphavirus nonstructural proteins in RNA replication. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, New York, v. 71, p. 187–222, 2002.

KAMPHUIS, E. et al. Type I interferons directly regulate lymphocyte recirculation and cause transient blood lymphopenia. **Blood**, New York, v. 108, p. 3253–3261, 2006.

KANG, D. et al. MDA5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.99, p.637-642, 2002.

KARMAKAR, M. et al. Neutrophil IL-1 β Processing Induced by Pneumolysin Is Mediated by the NLRP3/ASC Inflammasome and Caspase-1 Activation and Is Dependent on K⁺ Efflux. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.194, p.1763-1775, 2015.

KASHYAP, R. S. et al. Diagnosis of chikungunya fever in an Indian population by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay protocol based on an antigen detection assay: A Prospective cohort study. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 17, p. 291–297, 2010.

KATO, H. et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.205, p.1601-1610, 2008.

KAUR, P. et al. Inhibition of Chikungunya virus replication by harringtonine, a novel antiviral that suppresses viral protein expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 57, p. 155–167, 2013.

KAWAI, T. et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and MDA5-mediated type I interferon induction. **Nature Immunology**, New York, v.6, p.981-988, 2005.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, London, v. 479, p. 117–121, 2011.

KOVACSOVICS, M. et al. Overexpression of Helicard, a CARD-Containing Helicase Cleaved during Apoptosis, Accelerates DNA Degradation. **Current Biology**, London, v.12,

p.838-843, 2002.

KUHN, R. J. et al. Togaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; **Eds Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 629-650.

KUMAR, H. et al. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. **Journal of Experimental Medicine**, New York v.203, p.1795-1803, jun. 2006.

KUMAR, N. P. et al. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. **Journal of General Virology**, London, v. 89, p. 1945–1948, 2008.

KURIAKOSE, T. et al. IRF1 Is a Transcriptional Regulator of ZBP1 Promoting NLRP3 Inflammasome Activation and Cell Death during Influenza Virus Infection. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.200, p. 1489-1495, 2018.

LANCIOTTI, R. S.; VALADERE, A. M. Transcontinental movement of Asian Genotype Chikungunya virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, p. 1400– 1402, 2014.

LANDIS, H. et al. Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. **Journal of virology**, Washington, v. 72, p. 1516–1522, 1998.

LEPARC-GOFFART, I. et al. Chikungunya in the Americas. **The Lancet**, London, v. 383, n. 9916, p. 514, 2014.

LEVITT, N. H. et al. Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. **Vaccine**, Kidlington, v. 4, p. 157–162, 1986.

LEVY, H. B.; BUCKLER, C. E.; BARON, S. Effect of Interferon on Early Interferon Production. **Science**, New York, v. 152, p. 5–7, 1966.

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. High risk for chikungunya virus to initiate an enzootic sylvatic cycle in the tropical Americas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0005698&type=printable>> Acesso em: 20 nov 2018.

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

LUMSDEN, W. H. R. An Epidemic of virus disease in southern province, Tanganyika territory, in 1952-53. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 49, p. 33–58, 1955.

LUPLERTLOP, N. et al. The impact of Zika Virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. **Journal of Vector Borne Diseases**, New Delhi, v.54, p.207-214, 2017.

MADARIAGA, M.; TICONA, E.; RESURRECCION, C. Chikungunya: Bending over the Americas and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 20, p. 91–98, 2016.

- MARDEKIAN, S. K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, 2015.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, London, v. 440, p. 228–232, 2006.
- MARIMOUTOU, C. et al. Chikungunya infection: Self-reported rheumatic morbidity and impaired quality of life persist 6 years later. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 21, p. 688–693, 2015.
- MARIMOUTOU, C. et al. Morbidity and Impaired Quality of Life 30 Months After Chikungunya Infection: Comparative Cohort of Infected and Uninfected French Military Policemen in Reunion Island. **Medicine**, Baltimore, v.91, p.212-219, 2012.
- MARTINON, F. Signaling by ROS drives inflammasome activation. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.40, p.595-653, 2010.
- MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-1 β . **Molecular Cell**, Cambridge, v.10, p.417-426, 2002.
- NAHRENDORF, M.; PITTET, M. J.; SWIRSKI, F. K. Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. **Circulation**, Dallas, v.121, p.2437-2445, 2010.
- MAVALANKAR, D. et al. Chikungunya epidemic in India- A major public-health disaster. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 1, p. 63–73, 2010.
- MAVALANKAR, D. et al. Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, p. 412–415, 2008.
- MCCLAIN, D. J. et al. Immunologic interference from sequential administration of live attenuated alphavirus vaccines. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.177, p.634-641. 1998.
- MCDANIEL, D. et al. *Mycoplasma gallisepticum* requires ATP to activate the canonical inflammasome *in vitro*. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.198, 2017. Disponível em: < http://www.jimmunol.org/content/198/1_Supplement/226.11 > Acesso em: 30 abr. 2018.
- MCGAVEN, D. B.; KANG, S. S. Illuminating viral infections in the nervous system. **Nature Reviews Immunology**, London, v.11, p.318-329, 2011.
- MEIXENBERGER, K. et al. Listeria monocytogenes-Infected Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Produce IL-1 , Depending on Listeriolysin O and NLRP3. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 184, p. 922–930, 2010.
- MEYLAN, E. et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. **Nature Immunology**, London, v. 5, p.503-507, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Chikungunya**: manejo clínico. Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/25/chikungunya-novo-protocolo.pdf>>, Acesso em: 4 fev. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Febre de Chikungunya**: manejo clínico. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/19/febre-dechikungunya-manejo-clinico.pdf>> Acesso em: 30 jan. 2018.

MOLLER-TANK, S. et al. Role of the Phosphatidylserine Receptor TIM-1 in Enveloped-Virus Entry. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, p. 8327–8341, 2013.

MURILLO-ZAMORA, E. et al. Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. **Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health**, Washington, v. 41, p. e72, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28614481> > Acesso em: 09 jun. 2018.

NAIR, S. et al. Interferon regulated gene (IRG) expression-signature in a mouse model of chikungunya virus neurovirulence. **Journal of Neurovirology**, Houndmills, v.23, p.886- 902, 2017.

NEGASH, A. A. et al. IL-1 β Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, p. 1–13, 2013. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1003330&type=printable>> Acesso em: 16 maio 2018.

NEGASH, A. A. et al. Modulation of calcium signaling pathway by hepatitis C virus core protein stimulates NLRP3 inflammasome activation. **Plos Pathogens**, San Francisco, v.15, 2019. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1007593&type=printable>> Acesso em: 26 set. 2018.

NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death & Differentiation**, Oxford, v.6, p.1028-1042, 1999.

NORET, M. et al. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 206, p. 455–457, 2012.

NUNES, M. R. T. et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, London, v. 13, 2015. Disponível em:<<https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-015-0348-x>> Acesso em: 05 ago. 2018.

OGANESYAN, G. et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and – independent antiviral response. **Nature**, London, v.439, p.208-211, 2006.

O’NEILL, L. A. J.; BOWIE, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 7, p. 353–364, 2007.

PAIXÃO, E. S.; TEIXEIRA, M. G.; RODRIGUES, L. C. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. **BMJ Global Health**, London, v. 2, p. e000530, 2017. Disponível em: <https://gh.bmj.com/content/bmjgh/3/Suppl_1/e000530.full.pdf> Acesso em: 30 jun. 2018.

PAKRAN, J. et al. Purpuric macules with vesiculobullous lesions: A novel manifestation of Chikungunya. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 50, p. 61–69, 2011.

PAL, P. et al. Chikungunya Viruses That Escape Monoclonal Antibody Therapy Are Clinically Attenuated, Stable, and Not Purified in Mosquitoes. **Journal of Virology**, Washington, v. 88, p. 8213–8226, 2014.

PAL, P. et al. Development of a Highly Protective Combination Monoclonal Antibody Therapy against Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 4, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1003312&type=printable>> Acesso em: 17 jan. 2019.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE. **Chikungunya Outbreaks**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/images/stories/AD/HSD/IR/Viral_Diseases/Chikungunya/CIKV-Data-Caribbean-2017-EW-51.jpg> Acesso em: 25 jan, 2018.

PAROLA, P. et al. Novel Chikungunya Virus Variant in Travelers Returning from Indian Ocean Islands. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, 2006.

PATRAMOOL, S. et al. Isolation of infectious chikungunya virus and dengue virus using anionic polymer-coated magnetic beads. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 193, p. 55–61, 2013.

PETERSEN, L. R.; POWERS, A. M. Chikungunya: epidemiology. **F1000Research**, London, v. 5, p. 1–8, 2016.

PICHLMAIR, A. et al. RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. **Science**, New York, v.314, p.997-1001, 2006.

PICHLMAIR, A.; REIS, C. Innate Recognition of Viruses. **Immunity**, Cambridge, v. 1, p.370-383, 2007.

PINHEIRO, T. J. et al. Manifestações neurológicas das infecções pelos vírus zika e chikungunya. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, p. 937–943, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-282X2016001100937&script=sci_abstract&tlng=pt> Acesso em: 15 nov 2018.

PIPER, A. et al. Chikungunya Virus Host Range E2 Transmembrane Deletion Mutants Induce Protective Immunity against Challenge in C57BL/6J Mice. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, p. 6748–6757, 2013.

PLANTE, K. et al. Novel chikungunya vaccine candidate with an ires-based attenuation and host range alteration mechanism. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 7, 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1002142&type=printable>> Acesso em: 19 out 2018.

PONGSIRI, P. et al. Multiplex real-time RT-PCR for detecting chikungunya virus and dengue virus. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Mumbai, v. 5, n. 5, p. 342–346, 2012.

POO, Y. S. et al. Multiple Immune Factors Are Involved in Controlling Acute and Chronic Chikungunya Virus Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 12, 2014. Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0003354&type=printable>> Acesso em: 18 jul 2018.

POWERS, A. M. et al. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, London, v. 81, p. 471–479, 2000.

POWERS, A. M. et al. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 31, p. 1–29, 2018.

PUENTE-PABLO, N. Et al. Exantema, fiebre y artralgia uma embarazada. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**, Barcelona, v. 35, p. 384–385, 2017.

RAMSAUER, K. et al. Immunogenicity, safety, and tolerability of a recombinant measles-virus-based chikungunya vaccine: A randomised, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, first-in-man trial. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 15, p. 519–527, 2015.

RASSA, J. C.; ROSS, S. R. Viruses and Toll-like receptors. **Microbes and Infection**, Paris, v.11, p.961-968, 2003.

RATHINAM, V. A. K.; VANAJA, S. K.; FITZGERALD, K. A. Regulation of inflammasome signaling. **Nature Immunology**, New York, v. 13, p. 333–342, 2012.

RAVICHANDRAM, R.; MANIAN, M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v.2, p.140-142, 2008.

REDDY, V. et al. Utility of IgM ELISA, TaqMan Real-Time PCR, Reverse Transcription PCR, and RT-LAMP Assay for the Diagnosis of Chikungunya Fever. **Journal of Medical Virology**, New York, v.84, p.1771-1778, 2012.

RENAULT, P. et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005-2006. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 77, p. 727–731, 2007.

REYNAUD, J. M. et al. IFIT1 Differentially Interferes with Translation and Replication of Alphavirus Genomes and Promotes Induction of Type I Interferon. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 11, p. 1–31, 2015. Disponível em:<<https://journals.plos.org/Plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1004863&type=printable>> Acesso: 12 jun. 2018.

REZZA, G. et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. **Lancet**, London, v. 370, n. 9602, p. 1840–1846, 2007.

RIANTHAVORN, P. et al. An outbreak of chikungunya in Southern Thailand from 2008 to 2009 caused by African strains with A226V mutation. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, p. e161–e165, 2010.

ROBINSON, M. C. et al. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 49, p. 28–32, 1955.

RODRIGUEZ, A. E. et al. Enhanced IL-1 β production is mediated by a TLR2-MYD88-NLRP3 signaling axis during coinfection with influenza A virus and *Streptococcus pneumoniae*. **Plos One**, San Francisco, v.14, 2019. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0212236&type=printable>> Acesso em: 14 ago. 2018.

ROSS, R. W. et al. The Newala Epidemic. III. The Virus: Isolation, Pathogenic Properties and Relationship to the Epidemic. **Cambridge University Press**, Cambridge, v.54, p.177-191, 1956.

ROSSINI, G.; LANDINI, M. P.; SAMBRI, V. Evolution and Epidemiology of Chikungunya Virus. **Methods in Molecular Biology**, Totowa v. 1426, p.3-10, 2016.

ROY, C. J. et al. Chikungunya vaccine candidate is highly attenuated and protects nonhuman primates against telemetrically monitored disease following a single dose. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 209, p. 1891–1899, 2014.

SABIN, A. B. et al. The dengue group of viruses and its family relationships. **Bacteriological Reviews**, Washington, v.14, p.225-232.

SAHA, K. et al. Development of rapid, sensitive one-tube duplex RT-PCR assay for specific and differential diagnosis of Chikungunya and dengue. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 193, p. 521–524, 2013.

SAITO, T. et al. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. **Nature**, London, v.454, p.523-527, 2008.

SAITO, T. et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.104, p.582-587, 2007.

SALVADOR, B. et al. Characterization of Chikungunya pseudotyped viruses: Identification of refractory cell lines and demonstration of cellular tropism differences mediated by mutations in E1 glycoprotein. **Virology**, New York, v. 393, p. 33– 41, 2009.

SASAKI, Y. et al. Chikungunya virus infection presenting with persistent arthralgia without fever. **Journal of General and Family Medicine**, v. 16, p. 204–207, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.14442/jgfm.16.3_204> Acesso em: 21 abr 2018.

SATO, S. et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IF-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.171, p.4304-4310, out. 2003.

SAVARIN, C.; BERGMANN, C. C. Neuroimmunology of central nervous system viral infections: the cells, molecules and mechanisms involved. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v.8, p.472-479, 2008.

SCHETT, G.; DAYER, J. M.; MANGER, B. Interleukin-1 function and role in rheumatic

disease. **Nature Reviews Rheumatology**, London, v.12, p.14-24, 2015.

SCHILTE, C. et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.215, p.1-14. 2010.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya Virus-associated Long-term Arthralgia: A 36-month Prospective Longitudinal Study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, 2013. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002137&type=printable>> Acesso em: 10 abr. 2018.

SCHUFFENECKER, I. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 3, p. 1058–1070, 2006. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plosmedicine/article/file?id=10.1371/journal.pmed.0030263&type=printable>> Acesso em: 3 jan. 2019.

SCHWAMEIS, M. et al. Chikungunya vaccines in development. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, Austin, v. 12, p. 716–731, 2016.

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

SELVARAJAH, S. et al. A Neutralizing Monoclonal Antibody Targeting the Acid- Sensitive Region in Chikungunya Virus E2 Protects from Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, 2013. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0002423&type=printable>> Acesso em: 16 nov 2018.

SERGON, K. et al. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 78, p. 333–337, 2008.

SETH, R. B. et al. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. **Cell**, Cambridge, v.122, p.669- 682, 2005.
SHAO, B. Z. et al. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v.6, p.1-9, 2015.

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

SHARMA, S. et al. Triggering the Interferon Antiviral Response Through an IKK- Related Pathway. **Science**, New York, v.300, p.1148-1151, 2003.

SHUKLA, J. et al. Development and evaluation of antigen capture ELISA for early clinical diagnosis of chikungunya. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 65, p. 142–149, 2009.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus : epidemiology , replication , disease mechanisms , and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 127, p. 737–749, 2017.

SIMMONS, J. D. et al. Venezuelan equine encephalitis virus disrupts STAT1 signaling by distinct mechanisms independent of host shutoff. **Journal of Virology**, Washington, v. 83, p. 10571–81, 2009.

SMITH, S. A. et al. Isolation and characterization of broad and ultrapotent human monoclonal antibodies with therapeutic activity against chikungunya vírus. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v.18, p.86-95.

SNYDER, J. E. et al. Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, p. 8511–8523, 2013.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, Washington, v.29, p. 1883-1889, 2009.

SOONSAWAD, P. et al. Structural Evidence of Glycoprotein Assembly in Cellular Membrane Compartments prior to Alphavirus Budding. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, p. 11145–11151, 2010.

SOURISSEAU, M. et al. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, p. 0804–0817, 2007. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.0030089&type=printable>> Acesso em: 10 mai 2018.

SREEJITH, R. et al. Mapping interactions of Chikungunya virus nonstructural proteins. **Virus Research**, Amsterdam, v. 169, p. 231–236, 2012.

STAPLES, J. E.; BREIMAN, R. F.; POWERS, A. M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re Emerging Infectious Disease. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, p. 942–948, 2009.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, Washington, v. 58, p. 491–562, 1994.

SUKKAEW, A. et al. Heterogeneity of clinical isolates of chikungunya virus and its impact on the responses of primary human fibroblast-like synoviocytes. **Journal of General Virology**, London, p. 1–11, 2018.

SUMMERS, C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, Oxford, v.31, p.318-324, 2010.

SUZUKI, N.; SUZUKI, S.; YEH, W. C. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. **Trends in immunology**, Oxford, v.23, p.503-506, out. 2002.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Recognition of viruses by innate immunity. **Immunological reviews**, Copenhagen, v.220, p.214-224, 2007.

TAYLOR, A. et al. Effects of an In-Frame Deletion of the 6k Gene Locus from the Genome of Ross River Virus. **Journal of Virology**, Washington, v. 90, p. 4150–9, 2016.

TEIXEIRA, M. G. et al. East/central/South African genotype chikungunya virus, Brazil,

2014. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, p. 906–908, 2015.

TENG, T. S. et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 211, p. 1925–1935, 2015.

TENG, T. S. et al. Viperin restricts chikungunya virus replication and pathology. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 122, p. 4447–4460, 2012.

TORRES, J. R. et al. Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 51, p. 85–88, 2016.

THANAPATI, S.; GANU, M. A.; TRIPATHY, A. S. Differential inhibitory and activating NK cell receptor levels and NK/NKT-like cell functionality in chronic and recovered stages of chikungunya. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 12, p. 7–11, 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0188342&type=printable>> Acesso em: 12 mai 2018.

THOKA, B. et al. The synergistic effect of nsP2-L618, nsP3-R117, and E2-K187 on the large plaque phenotype of chikungunya virus. **Virus Genes**, Boston, v. 54, p. 1–9, 2017.

TRICARICO, P. M. et al. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.492, p.597-602, 2017.

TRICOU, V. et al. Complete genome sequences of two chikungunya viruses isolated in the Central African Republic in the 1970s and 1980s. **Genome Announcements**, Washington, v. 5, p. 2–3, 2017.

TSETSARKIN, K. A. et al. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. **Plos Pathogens**, San Francisco, v.3, p.1895-1906, 2007. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.0030201&type=printable>> Acesso em: 3 jan. 2018.

UNIVERSAL PROTEIN RESOURCE. **6K Protein**, Disponível em:<<http://www.uniprot.org/uniprot/F2YI15>>. Acesso em: 3 fev. 2018.

UTT, A. et al. Versatile trans-replication systems for chikungunya virus allow functional analysis and tagging of every replicase protein. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, p. 1–27, 2016. Disponível em:<<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0151616&type=printable>> Acesso em: 30 jul. 2018.

VAN DUIJL-RICHTER, M. K. S. et al. Early Events in Chikungunya Virus Infection— From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. **Viruses**, Basel, v.7, p.3647-3674, 2015.

VASILJEVA, L. et al. Identification of a novel function of the Alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, p. 17281–17287, 2000.

- VAZEILLE, M. et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, 2007. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0001168&type=printable>> Acesso em: 16 out. 2018.
- VAN DE VEERDONK, F. L. et al. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. **Trends in Immunology**, Oxford, v.32, p.110-16, 2011.
- VENUGOPALAN, A.; GHORPADE, R. P.; CHOPRA, A. Cytokines in acute chikungunya. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0111305&type=printable>> Acesso em: 12 fev. 2018.
- VOLK, S. M. et al. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. **Journal of Virology**, Washington, v. 84, p. 6497–6504, 2010.
- WANG, E. et al. Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. **Vaccine**, Kidlington, v.26, p. 5030–5039, 2008.
- WANG, E. et al. Chimeric Chikungunya Viruses Are Nonpathogenic in Highly Sensitive Mouse Models but Efficiently Induce a Protective Immune Response. **Journal of Virology**, Washington, n. 17, p. 9249–9252, 2011.
- WANG, W. et al. Zika virus infection induces host inflammatory responses by facilitating NLRP3 inflammasome assembly and interleukin-1 β secretion. **Nature Communications**, London, v.9, p.1-16, 2018.
- WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 299, p. 285–314, 2006.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 372, p. 1231– 1239, 2015.
- WEBER, A.; WASILIEU, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. **Science**, Washington,, v.3, 2010.
- WILSON, J. A. C. et al. RNA-Seq analysis of chikungunya virus infection and identification of granzyme A as a major promoter of arthritic inflammation. **Plos Pathogens**, San Francisco, v.13, p.1-32. 16 fev. 2017. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1006155&type=printable>> Acesso em: 30 nov 2018.
- WINTACHAI; P. et al. Identification of Prohibitin as a Chikungunya Virus Receptor Protein. **Journal of Medical Virology**, New York, v.84, p.1757-1770. nov. 2012.
- XU, L. G. et al. VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN- β Signaling. **Molecular Cell**, Cambridge, v.19, p.727-740, 2005.
- YAMASAKI, K. et al. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. **Journal**

of **Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, p. 12762–12771, 2009.

YI, Y.-S. Role of inflammasomes in inflammatory autoimmune rheumatic diseases. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, Seoul, v. 22, p. 1–15, 2018.

YONEYAMA, M. et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. **Nature Immunology**, London, p.730-737, 2004.

ZAID, A. et al. Chikungunya Virus Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Patient Management. **Arthritis & Rheumatology**, Hoboken, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO PARA SUBMISSÃO NA REVISTA VIROLOGY**Chikungunya virus infection induces caspase-1 activation in neuroblastoma lineage cells (SH-SY5Y)**

Pablo Farias^a.; Elisa Azevedo^a.; Morganna Lima^a.; Conceição Aníbal^a.; José Júnior^b.; Rafael França^a.

^a Aggeu Magalhães Institute, IAM – FIOCRUZ (PE), Brazil.

^b Santa Maria Federal University, UFSM, Brazil.

ABSTRACT

Chikungunya (CHIKV) is an arbovirus of the family *Togaviridae*, genus *Alphavirus*, transmitted by vectors of the genus *Aedes*. The main symptoms of Chikungunya fever include fever, severe arthralgia, myalgia, headache and exanthemas, and cases involving neurological complications such as Guillain-Barré syndrome, meningoencephalitis, myelitis and other central nervous system (CNS) pathologies may also be detected. Thus, this work aims to identify the role of caspase-1 during Chikungunya virus infection seeking to elucidate ways of preventing complications, since there are still no specific treatments against the virus. Initially, the infection was performed on neuronal lineage cells (SH-SY5Y) using a MOI of 0.5. For confirmation of infection, immunofluorescence was performed using specific anti-CHIKV antibodies at times of 12, 24, 36 and 48 hours post infection (hpi). Under the same conditions the kinetics of virus replication was evaluated by plaque assay, where a replication peak was observed at 36 hpi. Still under the cellular context was carried out the cell death assay, using annexin V / 7AAD, for which a growing death rate was observed from 36 hpi. One of the elements of the pathway under study, caspase-1, was marked at different times by detecting increased activation. In addition, IL-1 β levels were measured in the supernatant, with a decrease in these levels by 36 and 48 hpi. Previous studies have shown that in fact CHIKV is capable of infecting and replicating in SH-SY5Y, however, no data are available on activated caspase-1 levels in cell culture. Regarding IL-1 β levels, it becomes important to evaluate anti-inflammatory mechanisms that may be involved. CHIKV is able to activate caspase-1, but further studies are needed to elucidate immunological mechanisms at 36 and 48 hpi.

Key words: Chikungunya Virus. Caspase-1. Inflammassomes

