

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE

Tháise Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti

**Neuropatogênese da infecção pelos vírus Zika e Chikungunya em neuroesferas  
desenvolvidas por meio de cultura 3D**

Recife

2022

Tháise Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti

**Neuropatogênese da infecção pelos vírus Zika e Chikungunya em neuroesferas desenvolvidas por meio de cultura 3D**

Tese de doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Dr. Rafael Freitas de Oliveira França

Coorientadores: Dr. Rodrigo Antônio Peliciari-Garcia

Dr. Armando de Menezes Neto

Recife

2022

Título do trabalho em inglês: Neuropathogenesis of Zika and Chikungunya virus infection in neurospheres developed using 3D culture.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

C376n Cavalcanti, Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima.  
Neuropatogênese da infecção pelos vírus Zika e Chikungunya em neuroesferas desenvolvidas por meio de cultura 3D / Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti. -- 2022.  
143 p. : il.color, fotos, mapas.

Orientador: Rafael Freitas de Oliveira França.  
Coorientadores: Rodrigo Antônio Peliciari-Garcia e Armando de Menezes Neto.

Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2022.  
Bibliografia: f. 116-128.

1. Infecção por Zika vírus. 2. Febre de Chikungunya. 3. Técnicas de Cultura de Células. 4. genes homeobox. I. Título.

CDU 616.9

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239  
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Tháise Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti

**Neuropatogênese da infecção pelos vírus Zika e Chikungunya em neuroesferas desenvolvidas por meio de cultura 3D**

Tese de doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

**Área de Concentração:** Imunopatogênese de doenças crônicas e infecciosas.

Aprovada em: 05 de outubro de 2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Rafael Freitas de Oliveira França  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Profa. Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Prof. Dr. Christian Robson de Souza Reis  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Profa. Dra. Renata dos Santos Almeida  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

---

Prof. Dr. Jonilson Berlink Lima  
Universidade Federal do Oeste da Bahia

*Ao meu pai Abraão (in memoriam), à minha mãe Edlucia e à minha irmã Lígia.*

## **AGRADECIMENTOS**

À força celestial que me conduziu até aqui.

Às lembranças de quem fui um dia e aos momentos que precisei vivenciar para me reconstruir.

À todos os professores que passaram por minha vida, pois cada um, à sua maneira, me mostrou a importância da construção constante do conhecimento.

Ao meu orientador Rafael, que me acolheu em seu grupo e me incentivou a ter pensamentos críticos. Agradeço por sua confiança, compreensão, paciência, ensinamentos e oportunidades ofertadas. Meu respeito e gratidão.

Ao laboratório de Virologia e Terapia Experimental localizado no IAM, pela infraestrutura necessária para a realização da pesquisa.

Ao time que compôs o grupo de pesquisa, por todo conhecimento passado com muita dedicação e generosidade, em nome de: Leila, Elidiane, Renan, Armando, Pedro, Verônica, Thaís, Tâmis, Marília e Lucas. Em especial a Elisa, Morganna e Irassandra que me acompanharam durante todo o meu processo acadêmico no curso de doutorado, muito obrigada meninas pelo apoio de sempre, vocês foram fundamentais para este feito.

Antes de chegar até aqui algumas outras pessoas passaram em meu caminho. Estas pessoas me incentivaram, acreditaram em mim e compartilharam momentos muito felizes. Agradeço a vocês: Adriana Neuman, Wagner Tenório, Gustavo Lima, Arthur Leonel, Mayara Barbalho, Adriana Roberto, Camila Cavalcanti, Diego de Hollanda, Moezio de Vasconcellos, Lílian Amorim, Thallyta Monteiro e Adalúcia.

Agradeço à toda minha família. Por onde eu for, quem eu irei me tornar, todos os obstáculos que eu terei que enfrentar, todos os risos, todas as lágrimas, sei que tenho o privilégio de sempre ter abrigos para me amparar.

Meu agradecimento final é ao início de toda a minha trajetória até aqui, meu agradecimento final possui o som da voz dos meus pais, Abraão e Edlucia e da minha irmã Lígia, neste som escuto: você irá conseguir, você é forte, e também aos seus olhares lançados sobre mim, olhares de uma ternura imensurável e de um amor que reflete na serenidade que busco ter a cada dia. Mainha, agradeço a sua força, sua sabedoria e sua garra, que mulher incrível. Liginha, agradeço por nunca medir esforços para me ajudar e por confiar tanto em mim. Painho, meu querido, meu mestre, de onde estiveres, sua alma leve e seu espírito de proteção estarão sempre

me guiando e me dando diversos discernimentos e isso com certeza está me tornando uma pessoa mais forte e perseverante. É uma honra para mim compartilhar a vida com vocês.

*"Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre".*

Paulo Freire (1989)

## RESUMO

CAVALCANTI, Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima. Neuropatogênese da infecção pelos vírus Zika e Chikungunya em neuroesferas desenvolvidas por meio de cultura 3D. 2022. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Os vírus Zika (ZIKV) e o vírus Chikungunya (CHIKV) podem causar diversas manifestações neurológicas graves. O ZIKV é capaz de gerar meningite e encefalite e em mulheres grávidas, pode levar ao desenvolvimento de microcefalia, malformações congênitas e morte fetal. O CHIKV apesar de não ser classificado como um vírus preferencialmente neurotrópico causa encefalite, meningite e a síndrome de Guillain-Barré. Recentemente, o cultivo de células em sistemas 3D foi capaz de gerar estruturas que mimetizam *in vitro* um microambiente de organização celular que ocorre *in vivo*. Nesse contexto, as células humanas de neuroblastoma, SH-SY5Y, representam um modelo celular promissor para o cultivo em 3D. Não está totalmente esclarecido como o ZIKV e CHIKV atuam na neurogênese, na qual estão envolvidos genes reguladores do desenvolvimento, como os genes *HOX* (Homeobox), que participam na diferenciação de diversos tipos de células. Com isso, o objetivo geral do estudo foi desenvolver novos modelos de cultivo neuronal em 3D (neuroesferas) a partir de células SH-SY5Y e avaliar a modulação da expressão dos genes *HOX* nestes modelos em processo de diferenciação celular após a infecção com ZIKV e CHIKV. Para isso, foi realizado o cultivo tridimensional de células SH-SY5Y, utilizando a técnica de levitação magnética. As neuroesferas foram diferenciadas em neurônios maduros com ácido retinóico *all trans* e BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*) e infectadas com ZIKV e/ou CHIKV. Foi analisada por RT-qPCR a expressão dos genes *HOX* e por citometria de fluxo o perfil inflamatório das neuroesferas infectadas. Foi observado que as neuroesferas são capazes de se diferenciar em neurônios, são permissivas à infecção por ambos os vírus e geram resposta inflamatória com aumento dos níveis de IL-6 e IL-8 tanto para ZIKV quanto para CHIKV. A infecção por estes vírus altera de forma significativa a expressão dos genes *SIX2*, *SIX3*, *SIX4* e *SIX6* envolvidos com o processo de diferenciação celular. Outros genes *HOX*, como *ARX*, *HOXD1*, *DMBX1*, *POU5F1* tiveram sua expressão significativamente alterada a depender do vírus. Estes resultados sugerem que neuroesferas são modelos viáveis para o estudo da neuropatogênese viral e a alteração da expressão dos genes *HOX* revela aspectos importantes desses vírus no percurso da neurogênese.

**Palavras-chaves:** Infecção por zikv; infecção pelo vírus chikungunya; técnicas de cultivo celular; genes homeobox.

## ABSTRACT

CAVALCANTI, Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima. Neuropathogenesis of Zika and Chikungunya virus infection in neurospheres developed using 3D culture. 2022. Thesis (PhD in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Zika virus (ZIKV) and Chikungunya virus (CHIKV) can cause a variety of severe neurological manifestations. ZIKV is capable of generating meningitis and encephalitis and in pregnant women, it can lead to the development of microcephaly, congenital malformations and fetal death. CHIKV, despite not being classified as a preferentially neurotropic virus, causes encephalitis, meningitis and Guillain-Barré syndrome. Recently, the cultivation of cells in 3D systems was able to generate structures that mimic in vitro a microenvironment of cellular organization that occurs in vivo. In this context, human neuroblastoma cells, SH-SY5Y, represent a promising cell model for 3D cultivation. It is not fully understood how ZIKV and CHIKV act in neurogenesis, in which developmental regulatory genes are involved, such as the HOX genes (Homeobox), which participate in the differentiation of different types of cells. Thus, the general objective of the study was to develop new 3D neuronal culture models (neurospheres) from SH-SY5Y cells and to evaluate the modulation of HOX gene expression in these models in the process of cell differentiation after infection with ZIKV and CHIKV. For this, three-dimensional cultivation of SH-SY5Y cells was performed using the magnetic levitation technique. The neurospheres were differentiated into mature neurons with all trans retinoic acid and BDNF (Brain derived neurotrophic factor) and infected with ZIKV and/or CHIKV. The expression of the HOX genes was analyzed by RT-qPCR and by flow cytometry the inflammatory profile of the infected neurospheres. It was observed that the neurospheres are able to differentiate into neurons, are permissive to infection by both viruses and generate an inflammatory response with increased levels of IL-6 and IL-8 for both ZIKV and CHIKV. Infection with these viruses significantly alters the expression of genes SIX2, SIX3, SIX4 and SIX6 involved in the process of cell differentiation. Other HOX genes, such as ARX, HOXD1, DMBX1, POU5F1, had their expression significantly altered depending on the virus. These results suggest that neurospheres are viable models for the study of viral neuropathogenesis and the alteration of HOX gene expression reveals important aspects of these viruses in the course of neurogenesis.

**Key words:** zikv infection; chikungunya virus infection; cell culture techniques; homeobox genes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Estrutura dos Flavivírus.....	23
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura do Vírus Zika e seu genoma.....	24
<b>Figura 3 -</b>	Ciclo Replicativo dos Flavivirus.....	25
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura dos Alphavírus.....	26
<b>Figura 5 -</b>	Ciclo replicativo do CHIKV.....	28
<b>Figura 6 -</b>	Casos prováveis de CHIKV por semana epidemiológica.....	29
<b>Figura 7 -</b>	Casos prováveis de ZIKV por semana epidemiológica.....	30
<b>Figura 8 -</b>	Disseminação viral do CHIKV.....	35
<b>Figura 9 -</b>	Formação neuronal e de células da glia.....	37
<b>Figura 10-</b>	Organização dos genes HOX.....	39
<b>Figura 11-</b>	Formação da estrutura tridimensional (3D).....	46
<b>Figura 12-</b>	Esquematização da infecção de neuroesferas.....	53
<b>Figura 13-</b>	Esquematização do cultivo 3D.....	54
<b>Figura 14-</b>	Diferenciação de neuroesferas.....	55
<b>Figura 15-</b>	Esquema da infecção de neuroesferas.....	58
<b>Figura 16-</b>	Desenho da placa TaqMan® <i>Array Human HOX</i> .....	63
<b>Figura 17-</b>	Perfil da titulação por formação de placa (PFU) de CHIKV.....	66
<b>Figura 18-</b>	Perfil da titulação por formação de placa (PFU) de ZIKV.....	66
<b>Figura 19-</b>	Características morfológicas de células SH-SY5Y diferenciadas	68
<b>Figura 20-</b>	Morfologia do cultivo tridimensional.....	69
<b>Figura 21-</b>	Interação entre <i>beads</i> e células no cultivo 3D.....	71
<b>Figura 22-</b>	Diferenças morfológicas de neuroesferas com diferentes tratamentos.....	72
<b>Figura 23-</b>	Células apoptóticas e necróticas.....	76
<b>Figura 24-</b>	Marcação de Faloidina em neuroesferas.....	78
<b>Figura 25-</b>	Marcação de anti-CHIKV em neuroesferas infectadas.....	79
<b>Figura 26-</b>	Marcação de anti-CHIKV em neuroesferas.....	80
<b>Figura 27-</b>	Alteração morfológica de neuroesferas infectadas por CHIKV.....	84
<b>Figura 28-</b>	Interação entre <i>beads</i> e células em neuroesfera.....	85
<b>Figura 29-</b>	Análise da ultraestrutura de neuroesferas diferenciadas.....	86
<b>Figura 30-</b>	Análise da ultraestrutura de neuroesferas infectadas por CHIKV..	88

<b>Figura 31-</b>	Interação de partículas vírais de CHIKV com membranas das células hospedeiras.....	89
<b>Figura 32-</b>	Presença de clusters de glicogênio e lipídios em neuroesferas infectadas por CHIKV.....	90
<b>Figura 33-</b>	<i>Heat map</i> da expressão gênica relativa dos genes Hox.....	95

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> -	Expressão dos mRNAs para análise de diferenciação de neuroesferas.....	73
<b>Gráfico 2</b> -	Cópias de RNA viral.....	74
<b>Gráfico 3</b> -	Cópias de RNA viral ao longo do tempo de infecção.....	75
<b>Gráfico 4</b> -	Porcentagem de células apoptóticas em neuroesferas infectadas.....	77
<b>Gráfico 5</b> -	Níveis de citocinas inflamatórias em neuroesferas infectadas por CHIKV.....	92
<b>Gráfico 6</b> -	Níveis de citocinas inflamatórias em neuroesferas infectadas por ZIKV.....	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - <i>Primers</i> utilizados para análise da diferenciação neuronal.....	57
<b>Tabela 2</b> - Informações dos títulos virais de CHIKV e ZIKV.....	67
<b>Tabela 3</b> - Regulação da expressão gênica dos genes HOX em neuroesferas infectadas por ZIKV ou CHIKV.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	<i>All-trans retinoic acid</i>
ATPA2	<i>ATPase Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Transporting 2</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic fator</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
BHE	Barreira Hemato Encefálica
2D	Bidimensional
CBA	<i>Cytometric Beads Assay</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>complementary Desoxirribonucleic Acid</i>
CHKV	Vírus Chikungunya
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
MEM	<i>Modified Essential Medium</i>
DNA	<i>Desoxirribonucleic Acid</i>
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
F-12	<i>Nutrient Mixture F-12</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
Hpi	Horas pós-infecção
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LAVITE	Laboratório de Virologia e Terapia Experimental
MAPT	<i>Microtubule-associated protein tau</i>
MAP2	<i>Microtubule Associated Protein 2</i>
MOI	<i>Multiplicity Of Infection</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OsO <sub>4</sub>	Tetróxido de ósmio

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SBG	Síndrome Guillain-Barré
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SNAP-25	<i>Synaptosomal-associated protein 25</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
3D	Tridimensional
ZIKV	Vírus Zika

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	21
<b>2.1 Arboviroses</b> .....	21
<b>2.2 Gênero Flavivirus</b> .....	22
<b>2.3 Replicação do ZIKV</b> .....	24
<b>2.4 Gênero Alphavirus</b> .....	26
<b>2.5 Replicação do CHIKV</b> .....	27
<b>2.6 Epidemiologia do ZIKV e CHIKV</b> .....	29
<b>2.7 Sintomas neurológicos do ZIKV e CHIKV</b> .....	30
<b>2.8 Neurotropismo viral</b> .....	32
2.8.1 O neurotropismo do ZIKV.....	32
2.8.2 O neurotropismo do CHIKV.....	33
<b>2.9 Imunopatogênese do ZIKV e CHIKV</b> .....	34
<b>2.10 O processo de formação dos neurônios: a neurogênese</b> .....	36
<b>2.11 Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e o seu uso na neurobiologia</b> .....	38
<b>2.12 Indução da diferenciação neuronal por ATRA e BDNF</b> .....	40
<b>2.13 Os genes mestres do desenvolvimento: genes HOX</b> .....	41
<b>2.14 Cultura tridimensional (3D)</b> .....	45
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	48
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	49
<b>4.1 Objetivo Geral</b> .....	49
<b>4.2 Objetivos Específicos</b> .....	49
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
<b>5.1 Produção dos estoques virais</b> .....	50
5.1.1 Células VERO (ATCC® CCL81™).....	50
5.1.2 Infecção das células VERO.....	50
<b>5.2 Títulos dos estoques virais</b> .....	51
<b>5.3 Células SH-SY5Y</b> .....	52
5.3.1 Indução da diferenciação de células SH-SY5Y em monocamada.....	52
<b>5.4 Cultivo tridimensional de células SH-SY5Y</b> .....	53
<b>5.5 Diferenciação celular de neuroesferas com ATRA e BDNF</b> .....	55

5.6	Análise da integridade da estrutura de filamentos de actina de neuroesferas diferenciadas.....	56
5.7	Análise da diferenciação celular de neuroesferas por RT-qPCR.....	56
5.8	Infecção de neuroesferas.....	58
5.9	Extração do RNA viral .....	59
5.10	Cinética viral.....	59
5.11	Quantificação da carga viral.....	59
5.12	Detecção de partículas virais de CHIKV em neuroesferas infectadas.....	59
5.13	Processamento de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	60
5.14	Processamento de amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	60
5.15	Detecção de células apoptóticas em neuroesferas infectadas por CHIKV.....	61
5.16	<i>Cytometric Beads Assay (CBA)</i> .....	62
5.17	RTqPCR <i>array</i> - genes HOX.....	62
5.18	Aspectos éticos.....	64
6	RESULTADOS.....	65
6.1	Mensuração dos títulos virais obtidos.....	65
6.2	Caracterização morfológica da diferenciação neuronal induzida por ATRA+BDNF.....	67
6.3	Formação de estrutura tridimensional de células SH-SY5Y:neuroesferas.....	68
6.4	Estrutura tridimensional de células SH-SY5Y diferenciadas e infectadas com CHIKV.....	70
6.5	Expressão de marcadores da diferenciação neuronal.....	70
6.6	Quantificação das cópias de RNA viral em neuroesferas infectadas por CHIKV.....	72
6.7	Aumento da carga viral de CHIKV ao longo do tempo de infecção.....	73
6.8	Avaliação do perfil de morte celular em neuroesferas infectadas por CHIKV.....	74
6.9	Imunohistoquímica de neuroesferas marcadas com Faloidina.....	76

<b>6.10 Neuroesferas infectadas com CHIKV apresentam alterações morfológicas.....</b>	<b>80</b>
<b>6.11 Perfil de citocinas inflamatórias em neuroesferas.....</b>	<b>91</b>
<b>6.12 Análise da Expressão gênica dos genes HOX.....</b>	<b>94</b>
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>105</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>115</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>116</b>
<b>APÊNDICE A - A REVIEW ON CHIKUNGUNYA VIRUS EPIDEMIOLOGY, PATHOGENESIS AND CURRENT VACCINE DEVELOPMENT.....</b>	<b>129</b>
<b>APÊNDICE B- IDENTIFICATION OF A VIRULENT NEWCASTLE DISEASE VIRUS STRAIN ISOLATED FROM PIGEONS (COLUMBIA LIVIA) IN NORTHEASTERN BRAZIL USING NEXT-GENERATION GENOME SEQUENCING.....</b>	<b>143</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) causa diversas manifestações clínicas graves, como anomalias fetais e problemas neurológicos. A infecção por este vírus no período gestacional pode resultar em anormalidades cerebrais congênitas, como a microcefalia e degenerações neurológicas (ANTONIOU et al., 2020; MUNJAL et al., 2017). É evidente a capacidade de transferência do ZIKV para a placenta e a sua infecção em tecido neuronal de fetos em desenvolvimento (MLAKAR et al., 2016; MUSSO; KO; BAUD, 2019)

A infecção pelo ZIKV não acontece apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento, este fato é constatado, pois existe a ocorrência de disfunção cerebral em recém-nascidos de mães infectadas durante os estágios mais tardios da gravidez (VAN DEN POL et al., 2017; WALTER, 2016).

Os agravos provocados pelo ZIKV geraram no decorrer dos anos uma relevante preocupação em relação às desordens neurológicas provocadas por sua infecção. Desse modo, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para se ter uma melhor compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos com este vírus (MUNJAL et al., 2017; XU et al., 2019). Neste sentido, sabe-se que complicações neurológicas são associadas à presença de um perfil inflamatório predominante na infecção pelo ZIKV (ALMEIDA et al., 2021), que por sua vez induz a formação de citocinas IL-6, IL-8 e IL-9 e TNF- $\alpha$  (COLAVITA et al., 2018).

Estudos realizados em camundongos indicam que o ZIKV apresenta uma complexidade relevante na segmentação do SNC (Sistema Nervoso Central) e pode atingir diferentes células neuronais em diferentes fases do desenvolvimento do cérebro (VAN DEN POL et al., 2017). No entanto, várias pesquisas que buscam metodologias alternativas ao uso de animais empregam células neuronais a fim de compreender mecanismos moleculares em diversas patologias que acometem o cérebro, inclusive as decorrentes de infecções virais (LUPLERTLOP et al., 2017; SÁNCHEZ-SAN MARTÍN et al., 2018).

Neste contexto, e de acordo com os avanços dos estudos que associam o ZIKV e suas implicações no SNC, este vírus vem se tornando um modelo para o estudo de danos neurológicos. Mais recentemente, outros arbovírus vem sendo associados ao desenvolvimento de quadros neurológicos graves, tais como o vírus Chikungunya (CHIKV), que embora mais frequentemente associado às inflamações das

articulações, relatos de desordens neurológicas associadas ao CHIKV têm se tornado cada vez mais comuns e vem sendo alvo de algumas pesquisas. As manifestações neurológicas mais frequentes relatadas são encefalopatia, neuropatia periférica (incluindo a síndrome de Guillain-Barré-SBG) e mielite e as mais raras são neuropatias cranianas e déficits cognitivos (BRIZZI, 2017; DEEBA et al., 2016).

Pouco se sabe sobre a neuropatogênese do CHIKV, no entanto, estudos em camundongos mostraram que o CHIKV foi capaz de se disseminar para os astrócitos e neurônios (INGLIS et al., 2016). Especula-se que a lesão neurológica resultante da infecção pelo CHIKV seja por meio da ativação do sistema imune inato do hospedeiro e também pela apoptose (BRIZZI, 2017). A infecção pelo CHIKV induz a produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF em macrófagos humanos (GUERRERO-ARGUERO et al., 2020) e já foi visto que pacientes infectados com o CHIKV apresentam níveis aumentados IL-6 e IL-1 $\beta$  no soro o que pode levar às reações neuronais (ROCHA et al., 2017).

Mesmo diante dessas informações, existe uma carência de estudos que abordam a infecção do CHIKV, na etapa crucial da formação neuronal, ou seja, a neurogênese. Para o estudo de danos neuronais provocados pelos mais diversos agentes patológicos, as células de neuroblastoma SH-SY5Y humano são frequentemente utilizadas (JAHN et al., 2017). Essas células têm a capacidade de se diferenciar em neurônios maduros por meio de indutores como o ácido retinóico (MADEN, 2007), uma vez que pesquisas indicam que células SH-SY5Y tratadas com ácido retinóico expressam marcadores neuronais específicos, tornando esse modelo celular ideal para estudos moleculares sobre diferenciação neuronal e caracterização de desordens neurológicas (CHEUNG et al., 2009).

O estudo de diferenciação neuronal pode ser realizado por meio da análise da expressão de genes *HOX*, pois esses genes estão relacionados com a organização e comportamento das diferentes células durante a morfogênese. A regulação molecular desses genes é altamente complexa participando de importantes processos fisiológicos e morfológicos (MALLO; ALONSO, 2013), desempenhando um papel essencial na formação do SNC, como a identidade, crescimento e diferenciação celular de neurônios (DASEN, 2013).

A epidemia do ZIKV e CHIKV demonstrou que estes arbovírus representam uma ameaça constante, e mecanismos biológicos e moleculares da infecção precisam ser melhor esclarecidos, principalmente no que se diz respeito ao

neurodesenvolvimento. Com isto, a hipótese do presente trabalho é que os vírus Zika e Chikungunya alteram a expressão de genes *HOX* em neuroesferas em processo de diferenciação celular e essas estruturas são capazes de gerar uma resposta inflamatória frente à infecção viral. Atendendo a necessidade de compreender essa hipótese, o objetivo geral do estudo foi desenvolver novos modelos de cultivo neuronal em 3D (neuroesferas) a partir de células SH-SY5Y e avaliar a modulação da expressão dos genes *HOX* nestes modelos após a infecção com os vírus Zika e Chikungunya.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Arboviroses

As arboviroses são doenças resultantes da transmissão de diversos tipos de vírus por meio de um vetor artrópode, predominantemente mosquitos, como o *Aedes aegypti*, e carrapatos. Cerca de 500 arbovírus já foram identificados, destes aproximadamente 150 causam doenças nos seres humanos. Sendo estes responsáveis por uma alta taxa de mortalidade e morbidade em todo o mundo (YOUNG et al., 2014). Nos últimos 30 anos o surgimento e o ressurgimento de arbovírus representa uma significativa ameaça à saúde global, por meio de novos surtos e epidemias. (YOUNG, 2018).

A grande parte dos arbovírus que ocasiona doenças humanas pertence a quatro famílias principais, sendo elas: *Flaviviridae* (gênero Flavivirus), *Togaviridae* (gênero Alphavirus), *Peribunyaviridae* (gênero Orthobunyavirus) e *Phenuiviridae* (gênero Phlebovirus). Outras quatro famílias também são responsáveis pelas arboviroses: *Nairoviridae* (gênero Orthonairovirus), *Orthomyxoviridae* (gênero Thogotovirus), *Rhabdoviridae* (gênero Vesiculovirus) e *Reoviridae* (gênero Orbivirus). Os fatores responsáveis pela transmissão dos arbovírus são o tipo do vetor, o hospedeiro e condições ambientais apropriadas (YOUNG, 2018; WILDER-SMITH et al., 2019).

Em alguns países, a falta de saneamento básico, bem como fatores ecológicos como o desmatamento, as mudanças climáticas e o crescimento populacional são atributos que contribuem para o aumento do número de infecções virais (ALI et al., 2017), uma vez que resultam no aumento da população de mosquitos transmissores de arboviroses de grande importância para a Saúde Pública, como dengue, Zika e chikungunya (GUBLER, 2002; YOUNG, 2018).

A transmissão epidêmica de flavivírus durante as últimas décadas tem sido notável (BHATT et al., 2013). A introdução de novos vírus, como por exemplo, o vírus Zika no hemisfério Ocidental proporcionou uma rápida disseminação geográfica desse arbovírus, com um subsequente grande número de infecções humanas e uma considerável morbidade (PIERSON; DIAMOND, 2018; ROEHRIG, 2013). Esta preocupante e contínua situação, junto ao fato de reemergência dos flavivírus faz com que se tenha uma necessidade pela constante compreensão da biologia desses vírus,

bem como do papel das respostas imunológicas, geradas pela infecção (PIERSON; DIAMOND, 2020). Dentre os vários arbovírus identificados como os principais patógenos para os seres humanos, tem-se destaque o ZIKV e o CHIKV. Surtos provocados por ambos os vírus fornecem um alerta de como os arbovírus podem a qualquer momento gerar novos surtos, causando doenças devastadoras na população (BLITVICH, 2016).

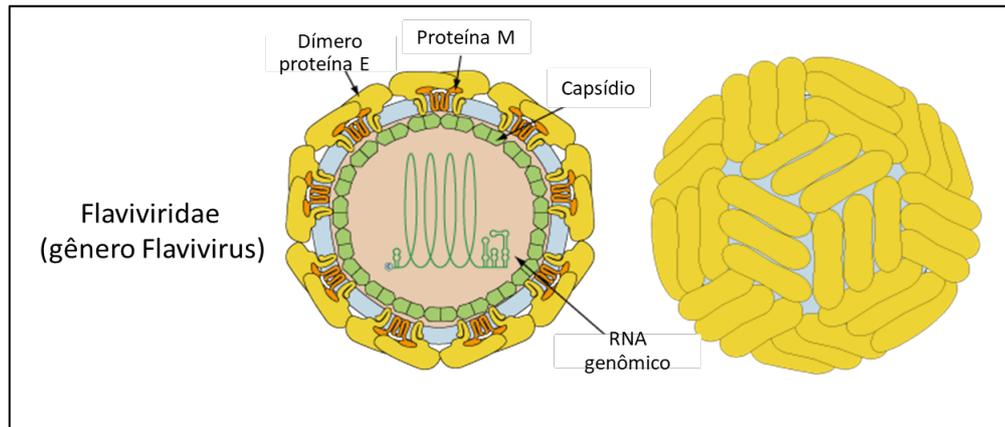
O ZIKV teve uma grande propagação na América do Sul, na América Central e no Caribe em 2015, e desde então despertou um interesse na saúde pública, principalmente devido a associação do vírus com o aumento de casos de microcefalia e outros distúrbios neurológicos no Brasil. Este cenário fez com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarasse a epidemia do vírus Zika na América do Sul como uma emergência de Saúde Pública, tornando uma preocupação internacional (OMS, 2016).

Por sua vez, o vírus Chikungunya (CHIKV) ressurgiu em 2005 como um importante causador de doença infecciosa, principalmente após a ocorrência de grandes epidemias de CHIKV nas ilhas do Oceano Índico e na Ásia (BURT et al., 2012; IDREES, 2017). Desde então, o vírus se expandiu rapidamente e tornou-se endêmico na América do Sul (IDREES, 2017). Serão abordados nos próximos tópicos características específicas dos vírus Zika e Chikungunya.

## **2.2 Gênero Flavivírus**

O gênero flavivírus pertence à família *Flaviviridae*. Os flavivirus apresentam uma estrutura esférica, de simetria icosaédrica e com projeções na superfície externa (Figura 1). Os vírions são caracteristicamente envelopados, envoltos por uma membrana glicoproteica e possuem a dimensão de aproximadamente 40 a 60 nm de diâmetro (SIMMONDS et al., 2017).

Figura 1- Estrutura dos Flavivírus

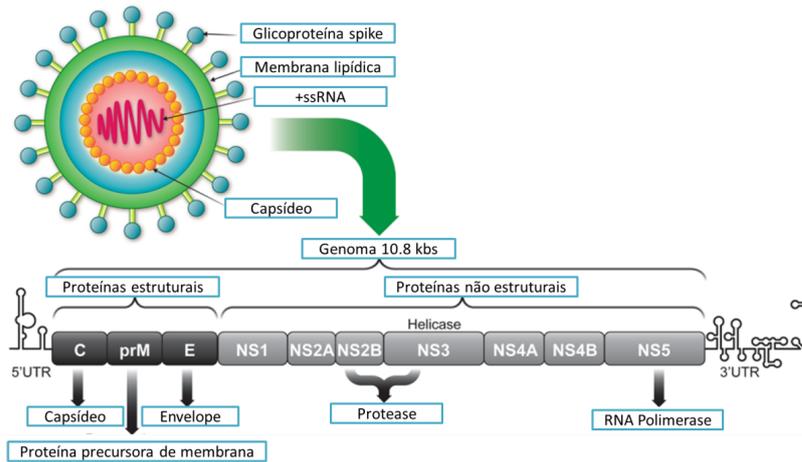


Fonte: adaptado de ViralZone, Instituto Suíço de Bioinformática, 2016. Disponível em <https://viralzone.expasy.org/6756>. Acesso em: 24 ago. 2021.

Legenda: imagens representativas da estrutura morfológica dos vírus pertencentes ao gênero Flavivirus.

O genoma viral (Figura 2) é constituído por RNA de fita simples de sentido positivo, possuindo aproximadamente entre 10.000 e 11.000 nucleotídeos (BLITVICH; FIRTH, 2017; LAURETI et al., 2018) e possui uma ORF (*Open Reading Frame*), região aberta de leitura, flanqueada por porções não codificantes, *structured untranslated regions*, UTR (5' UTR e 3' UTR) (DE BERNADI SCHNEIDER et al., 2020). A Extremidade 5' possui um *cap* e a porção 3' não possui a calda poli-A (KÜMMERER, 2013). Essas regiões não codificantes são altamente estruturadas, e possuem a função de regular a tradução e replicação viral (BRINTON, A. MARGO., BASU, 2015). A ORF codifica uma poliproteína que, posteriormente, é clivada por proteases virais e também do hospedeiro em dois segmentos distintos: as proteínas estruturais, capsídeo (C), a precursora de membrana (prM) e a do envelope (E) e as proteínas não estruturais, NS, do inglês *Nonstructural proteins*, sendo elas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, revisado por (BLITVICH; FIRTH, 2017; LAURETI et al., 2018).

Figura 2. Estrutura do ZIKV e seu genoma



Fonte: adaptado de (ROMBI et al., 2020).

Legenda: esquematização da estrutura morfológica e genômica do ZIKV.

### 2.3 Replicação do ZIKV

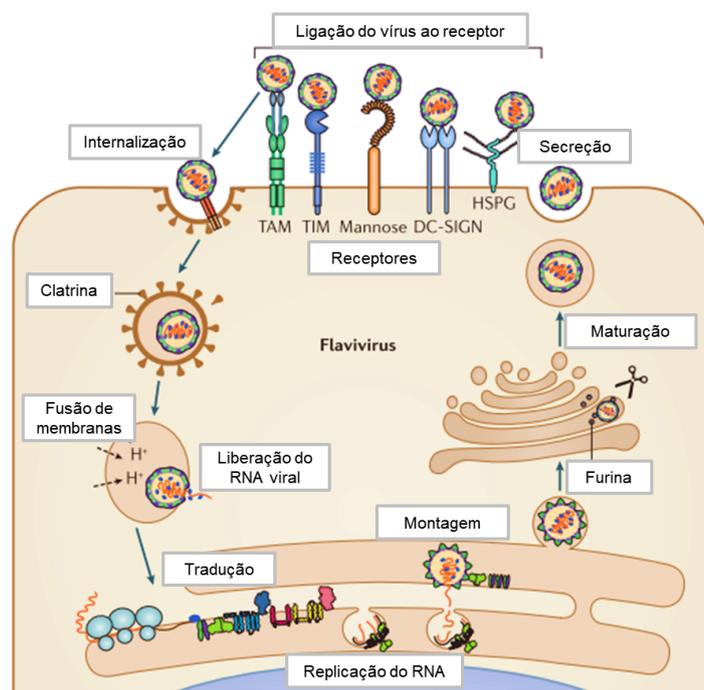
O início do processo de infecção viral ocorre quando o mosquito vetor infectado realiza o repasto sanguíneo na superfície da pele do hospedeiro. Tal como ocorre com os demais flavivírus, o ciclo replicativo do ZIKV (Figura 3) é iniciado por intermédio da interação entre a glicoproteína de superfície E do vírus, com receptores da superfície de células permissivas do hospedeiro à infecção viral, esse processo chama-se adsorção, revisado por (RODRIGUEZ et al., 2019). As células que podem ser infectadas pelos flavivirus incluem: monócitos, células dendríticas da pele, neurônios, macrófagos placentários, trofoblastos, células progenitoras neurais humanas, células testiculares, fibroblastos uterinos e tecidos associados aos olhos (NEUFELDT et al., 2018).

Ao se ligar aos receptores da superfície celular os vírus são internalizados por meio de endocitose mediada por clatrina. O baixo pH dos endossomos faz com que a glicoproteína E dos flavivírus sofram rearranjos conformacionais que permitem a fusão das membranas viral com a membrana celular. Posteriormente há a liberação do RNA viral no citoplasma da célula que é então reconhecido por ribossomos e é traduzido em uma poliproteína única que após ser processada origina proteínas estruturais e proteínas não estruturais (LINDENBACH; RICE, 2007; PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008). As proteínas não estruturais são responsáveis pelo complexo replicativo transcrevendo o RNA genômico de polaridade positiva em um RNA de fita negativa

que é usada como molde para a produção de múltiplas cópias de RNAs de polaridade positiva (SAGER et al., 2018).

Posteriormente à replicação, a montagem do vírus é feita na superfície do retículo endoplasmático (RE) gerando um vírus imaturo, sem capacidade infectiva, que é então transportado por meio das redes de Golgi. O pH ácido presente na rede trans-Golgi resulta em um rearranjo das proteínas do envelope e clivagem proteolítica da prM pela protease furina presente em Golgi, resultando na sua forma madura M, necessária para a infectividade do vírion. Os vírions formados seguem pela via secretora até a liberação final no espaço extracelular (PIERSON; DIAMOND, 2020; RODENHUIS-ZYBERT; WILSCHUT; SMIT, 2010; RODRIGUEZ et al., 2019; SAGER et al., 2018).

Figura 3- Ciclo Replicativo dos Flavivirus



Fonte: Adaptado de (NEUFELDT et al., 2018).

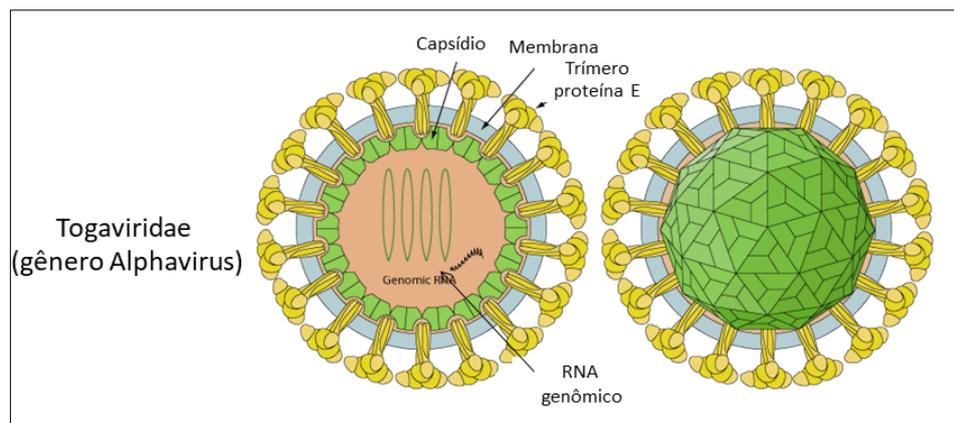
Legenda: desenho esquemático do ciclo replicativo dos flavivírus.

Primeiro ocorre a adsorção viral do vírus à superfície da célula hospedeira por meio de receptores específicos. Posteriormente tem-se a internalização endocítica do vírus. O pH baixo do endossomo permite rearranjos conformacionais das glicoproteínas do envelope e a fusão com a membrana endossomal. Ocorre então a liberação do RNA viral no citoplasma. Em seguida ocorre o processo de replicação do material genético do vírus e tem início a tradução da poliproteína viral, que é então clivada em proteínas individuais responsáveis tanto pela replicação quanto pela montagem de novos vírus que ocorre no retículo endoplasmático rugoso. A partícula viral é direcionada para o complexo de golgi para a sua completa maturação e posterior liberação.

## 2.4 Gênero Alphavirus

Os alphavírus são vírus pequenos, esféricos, envelopados e de RNA de sentido positivo (Figura 4). O gênero possui mais de 40 membros conhecidos, contando com vírus causadores de doenças humanas de importância médica, como o CHIKV (JOSE; KUHN, 2009)

Figura 4- Estrutura dos Alphavirus



Fonte: adaptado de ViralZone, (Instituto Suíço de Bioinformática, 2017. Disponível em <<https://viralzone.expasy.org/625>> Acesso em: 24 ago. 2021.

Legenda: imagens representativas da estrutura morfológica dos vírus pertencentes ao gênero Alphavirus.

O CHIKV, pertence ao gênero Alphavirus e a família Togaviridae, o CHIKV é um patógeno transmitido pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). A primeira identificação do CHIKV ocorreu quando o mesmo foi isolado em um paciente infectado na Tanzânia em 1952 (ROSS, 1956). O nome Chikungunya é derivado do idioma Makonde presente na Tanzânia, e significa curvado ou aquele que se dobra, pois, pessoas infectadas por esse vírus sofrem com fortes dores nas articulações e muitas ficam fisicamente incapacitadas por anos (KONDEKAR; GOGTAY, 2006).

O genoma do CHIKV é constituído por uma única fita de RNA, sentido positivo de aproximadamente 11,8 kb que codifica uma poliproteína não estrutural que dá origem às proteínas (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) responsáveis pela maquinaria de replicação viral e uma poliproteína estrutural que dá origem a cinco proteínas estruturais: proteína do capsídeo e as glicoproteínas E1, E2, E3 e 6K (BURT et al.,

2017; VU; JUNGKIND; LABEAUD, 2017). Estruturalmente, o CHIKV é um vírus pequeno, com aproximadamente 70 nm de diâmetro, formado por um envelope de bicamada lipídica associado com um nucleocapsídeo icosaédrico que envolve seu RNA genômico (SILVA; DERMODY, 2017).

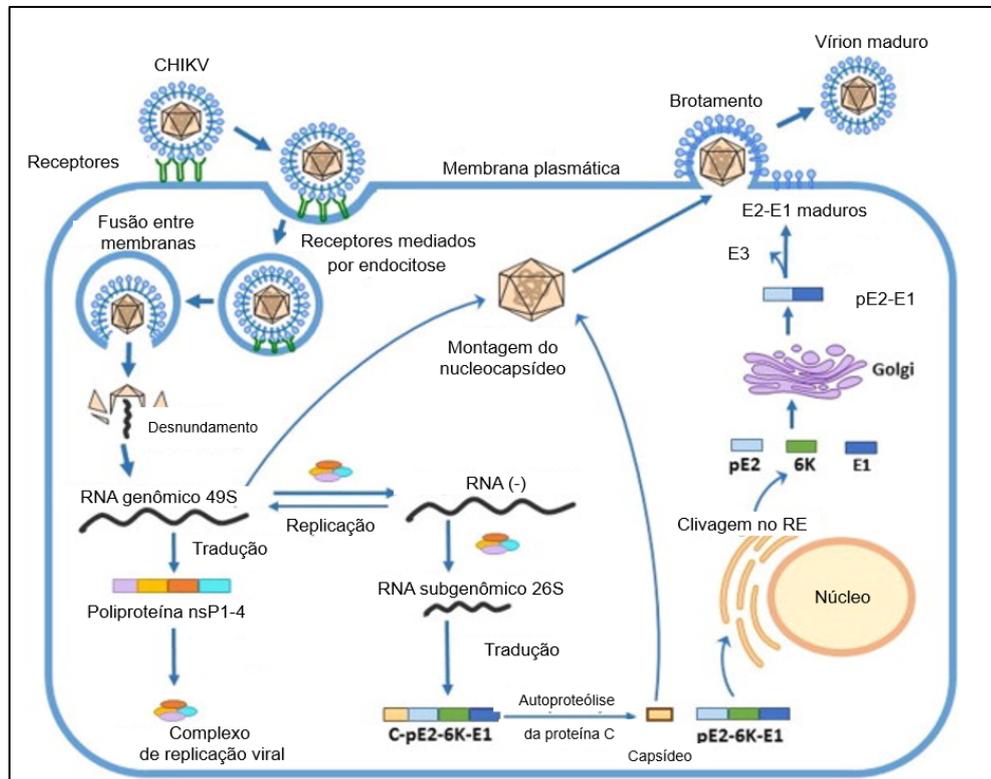
A infecção pelo CHIKV já atingiu milhares de pessoas, principalmente na África, Sudeste Asiático e Índia, no entanto, houve uma maior atenção mundial para esse vírus em meados dos anos 2005 e 2006 quando ocorreu um surto na ilha francesa de Réunion, no qual 40% da população foi infectada e resultou em centenas de mortes (GOH; MOK; CHU, 2020). Os sintomas mais comuns associados à infecção pelo CHIKV incluem febre, erupção cutânea maculopapular, e artralgia grave persistente (MINER et al., 2016; SCHWARTZ; ALBERT, 2010).

## **2.5 Replicação do CHIKV**

A entrada do CHIKV na célula hospedeira ocorre por meio da interação da glicoproteína E2 com receptores específicos na superfície das células-alvo. O vírus é internalizado por endocitose mediada por clatrina (SILVA; DERMODY, 2017). Neste processo o endossomo que possui pH baixo provoca alterações conformacionais nas glicoproteínas do envelope viral, essas alterações promovem a fusão entre a glicoproteína E1 com a membrana do endossomo. Com isso, o nucleocapsídeo é liberado no citoplasma e desmontada, com isso ocorre a liberação do RNA viral. O genoma viral passa pelo processo de tradução no maquinário de células do hospedeiro para a formação de uma poliproteína não estrutural, esta por sua vez é clivada e então é produzido o precursor nsP123 e a proteína nsP4 que interagem entre si e com proteínas das células hospedeiras. Essa interação resulta no complexo inicial de replicação que sintetiza mais cópias de RNA (SOLIGNAT et al., 2009), que é usado para a síntese de RNA genômico e subgenômico 26S. O RNA subgenômico sintetiza o polipeptídeo que contém as proteínas virais estruturais C-pE2-6K-E1. A proteína do capsídeo (C) é liberada deste polipeptídeo por sua atividade de autoprotease, enquanto o polipeptídeo pE2-6K-E1 restante é processado no retículo endoplasmático que migra em direção à membrana celular por meio do complexo de Golgi. O pE2 é clivado para formar E2 e E3 maduros. Ao final, o complexo nucleocapsídeo se organiza no citoplasma e se incorpora na membrana celular, adquirindo o envelope de bicamada lipídica que contém as proteínas do envelope, E1-E2. Este processo se

chama brotamento, no qual o vírion maduro é liberado (GOULD et al., 2010). O ciclo replicativo do CHIKV está esquematizado na figura 5.

Figura 5 – Ciclo replicativo do CHIKV



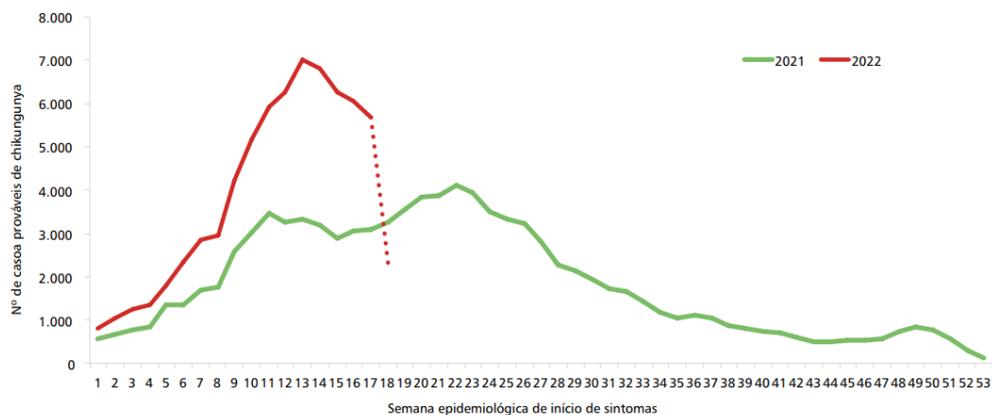
Fonte: adaptado de Abdelnabi et al., 2015.

Legenda: representação esquemática do ciclo de replicação do vírus chikungunya. A etapa de adsorção viral se refere ao contato da proteína do envelope viral com os receptores da célula hospedeira. A entrada do vírus na célula acontece pelo mecanismo de endocitose mediada por clatrina. O endossomo por possuir pH baixo resulta em uma mudança conformacional da proteína do envelope viral o que resulta na sua fusão com a membrana do endossomo, este processo faz com que o nucleocapsídeo seja liberado no citoplasma, que é então desmontado para a liberação do genoma viral, este é traduzido em proteínas não estruturais. Ao serem processadas irão sintetizar moldes de RNA que posteriormente será traduzido em uma poliproteína estrutural que é clivada para produzir proteínas individuais que serão responsáveis pela montagem dos componentes virais. Ao ser formada, a partícula viral é liberada por brotamento da membrana plasmática, neste momento o vírus adquire a proteína glicoproteínas do envelope e a membrana lipídica da célula hospedeira.

## 2.6 Epidemiologia do ZIKV e CHIKV

O conhecimento da epidemiologia dos vírus é importante para compreender a propagação atual e a evolução dos casos ao longo do tempo. Nesse âmbito, dados do boletim epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde no presente ano, 2022, mostram que foram notificados 70.092 casos prováveis de Chikungunya (Figura 6). Estes números correspondem a um aumento de 74,6% dos casos em relação ao ano anterior (Boletim Epidemiológico, MS, 2022).

Figura 6 - Casos prováveis de Chikungunya, por semana epidemiológica

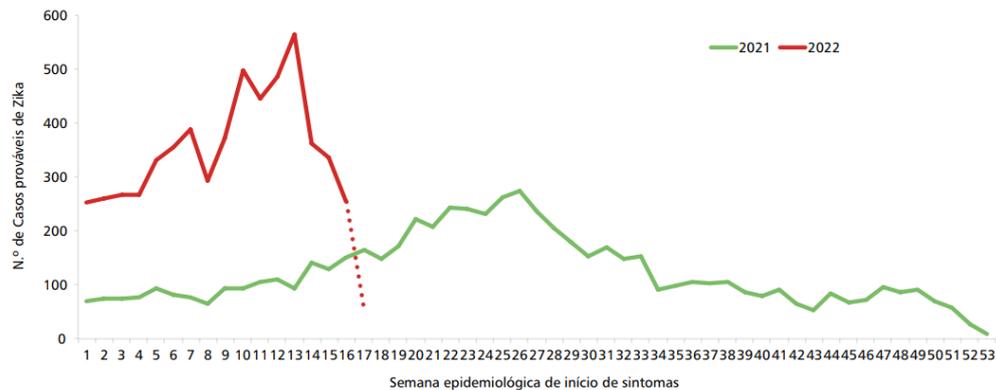


Nota: Número de casos prováveis da infecção pelo CHIKV no Brasil nos anos de 2021 e primeiras semanas de 2022.

Fonte: BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2022.

Em relação aos dados de infecção pelo ZIKV (Figura 7), foram notificados 5.787 casos prováveis no país. Os dados representam um aumento de 214,5% no número de casos quando comparados com o ano de 2021.

Figura 7 - Casos prováveis de Zika, por semana epidemiológica



Nota: Número de casos prováveis da infecção pelo ZIKV no Brasil nos anos de 2021 e primeiras semanas de 2022.

Fonte: BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2022.

Tanto para os casos de CHIKV quanto para os casos de ZIKV, a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência, sendo 97,6 casos/ 100 mil habitantes e 5,6 casos/ 100 mil habitantes, respectivamente (Boletim Epidemiológico, MS, 2022).

Uma das características mais marcantes do surto do ZIKV ao longo dos anos foi a sua associação com problemas neurológicos. Em alguns países quando a incidência da doença por ZIKV aumentou, os casos de SBG também aumentaram. E em contrapartida, os países que apresentaram redução na incidência pelo ZIKV, a incidência de SBG reduziu, levando a associação epidemiológica entre o ZIKV e este problema neurológico (SALVADOR, 2019). Em relação ao CHIKV também há uma relação da disseminação geográfica do vírus com o aumento de relatos de neurovirulência, no entanto muito sobre a neuropatogênese do CHIKV permanece sob investigação (BRIZZI, 2017).

## 2.7 Sintomas neurológicos do ZIKV e CHIKV

A sintomatologia das infecções pelos flavivírus em humanos varia podendo ser leve, muitas vezes assintomática ou com episódios febris. A forma grave inclui febre hemorrágica, síndrome de choque, hepatite, insuficiência hepática, defeitos congênitos, paralisia, encefalite e outros sintomas neurológicos. Estas características variam de acordo com cada tipo de vírus, do tropismo celular e tecidual, da imunidade do hospedeiro e das respostas imunológicas geradas (ENDY et al., 2002; MOSTASHARI et al., 2001; ZAMBRANA et al., 2018).

A grande parte das infecções pelo ZIKV é assintomática (LESSLER et al., 2016). Estudos mostram que o ZIKV infecta diversos tipos celulares, como placenta, trofoblastos, células do trato reprodutivo masculino e feminino e tecidos oculares. Por ter um amplo tropismo, o ZIKV é detectado em vários fluidos corporais, como fluido conjuntival ou lágrimas, saliva, sêmen, muco cervical e urina (MINER; DIAMOND, 2017). No entanto, assim como alguns flavivírus o ZIKV é neurotrópico, e possui a capacidade de infectar e causar lesões em neurônios e em células progenitoras neurais por meio de mecanismos diretos, ou seja, induzidos pela infecção do vírus e indiretos que são mediados pelas respostas imunológicas (CAIN et al., 2019; MAXIMOVA; PLETNEV, 2018). Estes mecanismos causam sequelas neurológicas graves, incluindo meningite e encefalite que podem resultar em morte ou incapacidade prolongada nos sobreviventes. A infecção pelo ZIKV em mulheres grávidas pode causar lesões placentárias e o vírus pode ser transmitido ao feto em desenvolvimento, resultando em microcefalia, malformações congênitas e morte fetal (PIERSON; DIAMOND, 2020). Independentemente do período da gravidez, mulheres infectadas pelo ZIKV podem gerar respostas adversas para o feto. No entanto, o primeiro trimestre representa a fase mais crítica e de maiores danos ao feto (BRASIL et al., 2016).

O ZIKV apresenta neurotropismo evidente e bastante investigado, com capacidade de infectar células progenitoras neurais mesmo diante de multiplicidade baixa de infecção. A homeostase neuronal ao ser prejudicada pela infecção causa a morte das células progenitoras em estágio inicial da diferenciação celular (DEVHARE et al., 2017; TANG et al., 2016)). Células neuronais em estágios avançados do desenvolvimento também são prejudicadas pela infecção pelo ZIKV, gerando disfunção celular e distúrbios neurológicos (ROTHAN et al., 2019). Como apresentado, o ZIKV e sua associação com distúrbios neurológicos já é bastante elucidado e muito do conhecimento sobre este vírus, serve de base para o estudo de outros vírus também tidos como neurotrópicos, como o CHIKV.

A infecção pelo CHIKV é considerada uma causa importante de distúrbios neurológicos que acomete principalmente as crianças. Apesar do seu forte tropismo por articulações a infecção pelo CHIKV está associada com manifestações neurológicas graves (RAJAPAKSE; RODRIGO; RAJAPAKSE, 2010). Dentre as várias manifestações clínicas, destaca-se a SGB, mielopatia, mielite, encefalopatia,

encefalite e doença neuro-ocular. Os mecanismos pelos quais o CHIKV resulta na infecção do SNC ainda não foram completamente elucidados (MEHTA et al., 2018).

## **2.8 Neurotropismo viral**

O conceito de neurotropismo viral foi criado há mais de um século com estudos realizados para compreender os mecanismos do vírus da raiva e sua afinidade por estruturas neurais (GOSZTONYI; KOPROWSKI, 2001). Atualmente o termo neurotropismo viral é abrangentemente definido como a capacidade dos vírus de acometer o SNC e infectar células residentes, como os neurônios. A infecciosidade viral é estabelecida pelas propriedades dos vírus que facilitam a entrada no SNC, com replicação extensiva dos vírus no citoplasma de células neuronais. Algumas propriedades desse mecanismo de infecção favorecem a disseminação transneuronal e sináptica da progênie viral (MAXIMOVA; PLETNEV, 2018).

Patógenos neurotrópicos podem ter acesso ao cérebro por meio de várias vias, como pelo transporte axonal ao longo dos neurônios motores e olfatórios, pela disseminação hematogênica mediante a barreira hematoencefálica (BBB) ou barreira sangue-líquido cefalorraquidiano, bem como por via de infecção direta de células endoteliais ou por meio da disseminação de leucócitos infectados através da BBB para o parênquima cerebral (LUDLOW et al., 2016).

Muitos arbovírus podem acessar o SNC e infectar uma variedade de tipos de células. As infecções virais do SNC podem ocorrer com uma ampla gama de arbovírus, incluindo ZIKV, CHIKV e vírus da encefalite japonesa (JEV), e causar doenças como meningite, encefalite, meningoencefalite, mielite e paralisia aguda (CLÉ et al., 2020).

### **2.8.1 O neurotropismo do ZIKV**

A neuropatogênese dos flavivírus envolve alguns fatores, como a viremia, a neuroinvasividade, que é a capacidade do vírus entrar no SNC e a neurovirulência que é a propriedade do vírus fazer a replicação, se disseminar e induzir a neuropatologia no SNC (THOMAS J. CHAMBERS, 2003).

Normalmente os flavivírus atingem o SNC por meio da Barreira hematoencefálica (BHE) que é composta por células endoteliais responsáveis por controlar o fluxo de solutos, de células sanguíneas e patógenos presentes no sangue que podem atingir o SNC. Posteriormente à infecção sistêmica, alguns flavivírus como o ZIKV, chegam até a BHE e podem cruzar a barreira endotelial podendo resultar em quebra da BHE e invasão do vírus no SNC. Sendo assim, células como astrócitos e micróglia ficam suscetíveis à infecção por alguns flavivírus, e os neurônios, mais especificamente, pelo ZIKV (MUSTAFÁ et al., 2019).

A infecção pelo ZIKV está associada a vários danos às células neuronais. O vírus é capaz de atravessar a placenta e infectar o líquido amniótico, como também os vários tecidos cerebrais do feto causando um importante dano ao desenvolvimento cerebral (MLAKAR et al., 2016). Está bem elucidado que o ZIKV infecta tanto as células progenitoras neurais, quanto os neurônios maduros e tem tropismo pelos astrócitos (MINER; DIAMOND, 2017). A capacidade desse vírus de infectar várias linhagens de neurônios em vários estágios do neurodesenvolvimento do feto, faz com que ocorra uma importante interferência na função do SNC, levando à inibição da proliferação celular, apoptose e também a inibição da neurogênese (LIANG et al., 2016; VAN DEN POL et al., 2017). Esse fato foi evidenciado, pois a inoculação intraventricular direta do ZIKV em cérebros de fetos de camundongos em fase de desenvolvimento resultou em infecção cortical, inibição da diferenciação de células neuroprogenitoras e microcefalia. O estudo ainda sugere que a infecção por ZIKV induz a morte celular em vários tipos de células cerebrais, principalmente em neurônios imaturos e neurônios maduros (LI et al., 2016).

O ZIKV infecta células neuronais maduras, e as alterações provocadas pela infecção no metabolismo celular, tendem a levar ao desenvolvimento de doenças neurológicas, como a SBG (ROTHAN et al., 2019).

### 2.8.2 O neurotropismo do CHIKV

O CHIKV não é classificado como um vírus preferencialmente neurotrópico, no entanto várias evidências revelam a sua associação com complicações neurológicas graves. Estudos revelam a infecção do CHIKV em células gliais, como os astrócitos e um menor tropismo de infecção em neurônios (MATUSALI et al., 2019).

O CHIKV parece ter como alvo células progenitoras, o que pode implicar na neurogênese e migração neuronal, sendo uma possível hipótese para a neuropatogênese da encefalomielite relacionada ao CHIKV (PINHEIRO et al., 2016). O CHIKV já foi detectado no líquido cefalorraquidiano (LCR) em neonatos indicando o tropismo viral em direção ao sistema nervoso central (SNC) em fases iniciais do desenvolvimento humano (DI MAIO FERREIRA et al., 2019).

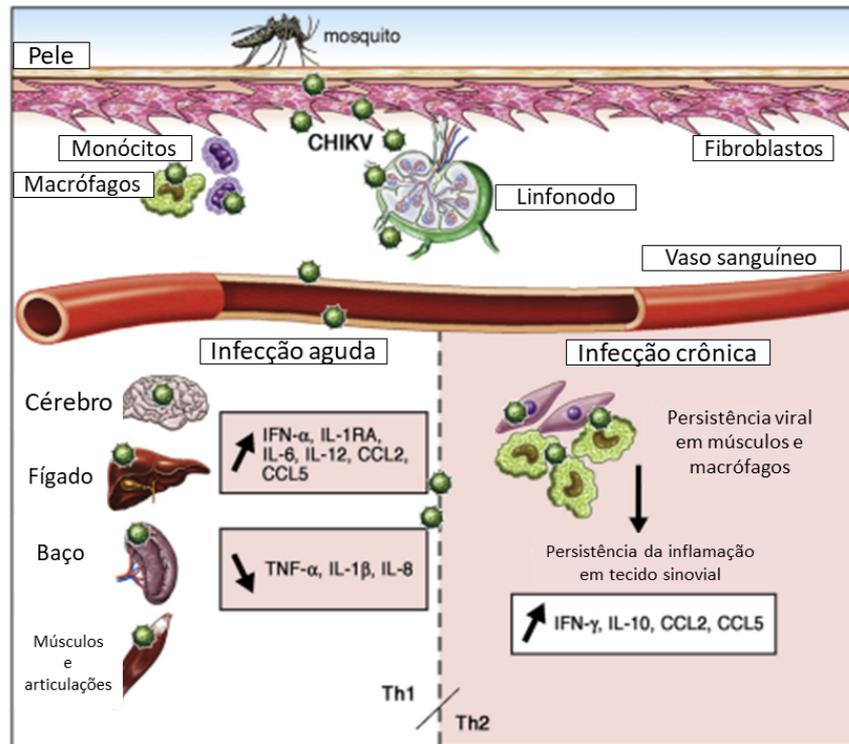
O vírus Sindbis, também da família *Togaviridae*, e semelhante ao CHIKV é associado à poliartrite sendo capaz de levar à encefalomielite em camundongos jovens, induzindo apoptose de neurônios imaturos. Ao passo que os neurônios amadurecem, eles se tornam mais resistentes a apoptose (GRIFFIN, 2005). Estudos com CHIKV também fazendo uso de camundongos revelam que a disseminação do vírus no SNC e a gravidade de danos neurológicos associados com a infecção aumentam de forma significativa durante o período neonatal (ARPINO; CURATOLO; REZZA, 2009).

O cérebro possui vários mecanismos para combater a infecção pelo CHIKV. Estudos com camundongos mostraram que astrócitos e oligodendrócitos são particularmente suscetíveis à infecção, enquanto as células da microglia são mais resistentes. Foi visto em astrócitos que o CHIKV é capaz de induzir a apoptose e em resposta à infecção, as células da microglia produzem citocinas e moléculas pró-apoptóticas, como por exemplo, a IL-12 (Interleucina-12), IFN- $\alpha$  (Interferon alfa) e TNF- $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral alfa) (GANESAN; DUAN; REID, 2017).

## 2.9 Imunopatogênese do CHIKV e ZIKV

A compreensão acerca do que concerne a infecção do CHIKV ainda é limitada, contudo sabe-se que posteriormente à inoculação do vírus, esse penetra nos capilares subcutâneos e sua replicação começa em células da pele, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Em seguida os vírus migram para linfonodos atingindo o sistema circulatório, podendo atingir músculos, articulações, fígado e cérebro (Figura 8). Macrófagos e monócitos atuam na disseminação do vírus, podendo explicar a persistência da doença, mesmo diante de uma curta duração da viremia. Falhas dos mecanismos imunológicos resultam na persistência da inflamação no tecido sinovial, por exemplo, resultando em artralgia ou artrite crônica (HORCADA; DÍAZ-CALDERÓN; GARRIDO, 2015).

Figura 8- Disseminação viral do CHIKV



Fonte: adaptado de (PETITDEMANGE; WAUQUIER; VIEILLARD, 2015).

Legenda: esquema da disseminação viral. O CHIKV infecta células suscetíveis da derme e se replica rapidamente. Partículas virais são transportadas por meio do sistema circulatório para órgãos linfoides secundários e são disseminadas para vários órgãos como cérebro, baço, fígado, articulações e músculos. A fase aguda da infecção está associada a uma alta liberação de Interferons do tipo 1, seguida do aumento ou diminuição de determinadas citocinas, quimiocinas e mediadores pró-inflamatórios.

Como resposta à infecção os níveis da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina IL-6 (Interleucina-6), tornam-se elevados em pacientes infectados durante a fase aguda da infecção pelo CHIKV. Os níveis de IL-6 podem permanecer elevado também na fase crônica da doença, principalmente em associação com artralgia persistente (CHOW et al., 2011). Durante a fase aguda da infecção a imunidade inata age para combater a replicação e disseminação viral, isso pode ser constatado, pois estudos mostram uma elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, e IL-15, bem como também o aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas na fase aguda da infecção (TENG et al., 2015).

Pacientes infectados pelo ZIKV, apresentam na fase aguda da infecção níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-17A, IL-18 e IL-22 em comparação com pacientes saudáveis (LUM et al., 2018). Células progenitoras neurais infectadas com ZIKV apresentam níveis

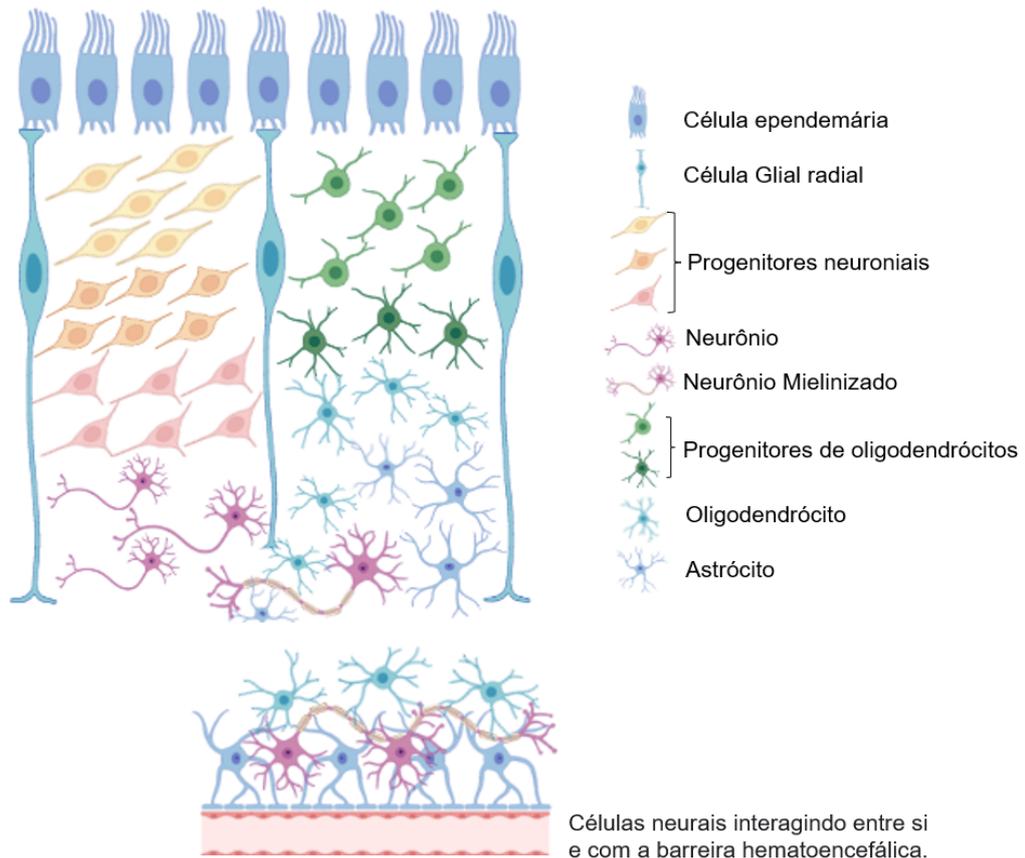
aumentados da expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , indicando que o ZIKV induz uma resposta imune nesses tipos de células (SHAO et al., 2016). Ao se analisar o perfil de citocinas e fatores inflamatórios em amostras de tecido cerebral em casos fatais de microcefalia foi visto o aumento da expressão de IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-6, IL-12A, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  IL-4, IL-10, IL-33, IL-37 e TGF- $\beta$ 1, IL-9, IL-17, IL-23 e IL-22 (AZEVEDO et al., 2018). Esses achados apontam a interferência da infecção viral em células progenitoras neurais que são cruciais para o processo da neurogênese.

## **2.10 O processo de formação dos neurônios: a neurogênese**

A complexidade do cérebro está relacionada com as várias estruturas que o compõe e por processos complexos que são responsáveis pela formação de células neurais, como os neurônios. A neurogênese é responsável pela formação dos neurônios e é uma etapa rigorosamente controlada que ocorre em diversas etapas da formação do SNC (KEMPERMANN; SONG; GAGE, 2015).

No cérebro fetal, a neurogênese é organizada em diferentes camadas, são elas: a zona ventricular, a zona subventricular, a zona intermediária e a zona marginal. Nestas camadas existem diversos tipos de células responsáveis pelas etapas de diferenciação celular. Células progenitoras neurais se dividem em progenitores intermediários mitoticamente ativos até a formação de neurônios maduros pós-mitóticos e em outras células como astrócitos e oligodentrócitos (Figura 9). As células gliais radiais apical e basal geram neurônios por meio de mecanismos diretos ou indiretos, provenientes de células progenitoras intermediárias (NOCTOR, 2004). Sendo assim, o progresso da neurogênese está relacionado com a transição entre proliferação celular e diferenciação neuronal (HOLLYDAY, 2001).

Figura 9 – Formação neuronal e de células da glia



Fonte: criado pela autora pelo *Biorender*.

Legenda: a figura resume de forma esquemática a organização polarizada de células do tipo neuroepitelial, células gliais radiais e progenitoras neurais. A migração celular ocorre no eixo apical-basal. Os neurônios são formados por meio de células gliais radiais e células progenitoras que constituem a zona ventricular. Na fase inicial da neurogênese as células progenitoras se dividem assimetricamente e geram células progenitoras intermediárias, que se dividem para gerar neurônios pós mitóticos.

Embora seja um tema bastante contraditório, a persistência da neurogênese no cérebro adulto foi relatada em um estudo recente (SORRELLS et al., 2018), e sabe-se que a neurogênese nesta etapa da vida passa por etapas sequenciais, que envolvem a proliferação, seleção, especificação, migração e diferenciação neuronal, para obtenção de neurônios funcionais (LUCASSEN et al., 2015). Células progenitoras neurais tanto presentes no feto, quanto no cérebro adulto têm a capacidade de autorrenovação e diferenciação em três componentes cruciais para o sistema nervoso: neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (IHUNWO et al., 2022).

Existem alguns fatores que afetam o progresso da neurogênese (LUCASSEN et al., 2015). Dentre estes fatores, destaca-se a infecção viral que além de interferir na neurogênese também pode afetar a sinaptogênese, ou seja, a formação das

sinapses, o que pode levar à morte celular e desregulação do funcionamento do ciclo celular, resultando em diferenciação celular precoce (IHUNWO et al., 2022). Devido à complexidade do cérebro, fatores que afetam as células que o compõe podem trazer danos por vezes permanentes e irreversíveis.

## 2.11 Os genes mestres da morfogênese: genes HOX

Os genes Homeobox (*HOX*) são importantes fatores de transcrição e também são conhecidos como os genes mestres do desenvolvimento, regulando aspectos da morfogênese de vários segmentos do corpo, bem como atuando na diferenciação de dos mais diversos tipos de células (LEWIS, 1978). Esses genes apresentam um alto grau de conservação no processo evolutivo e são expressos na fase do desenvolvimento embrionário de uma forma bastante coordenada (LAPPIN et al., 2006).

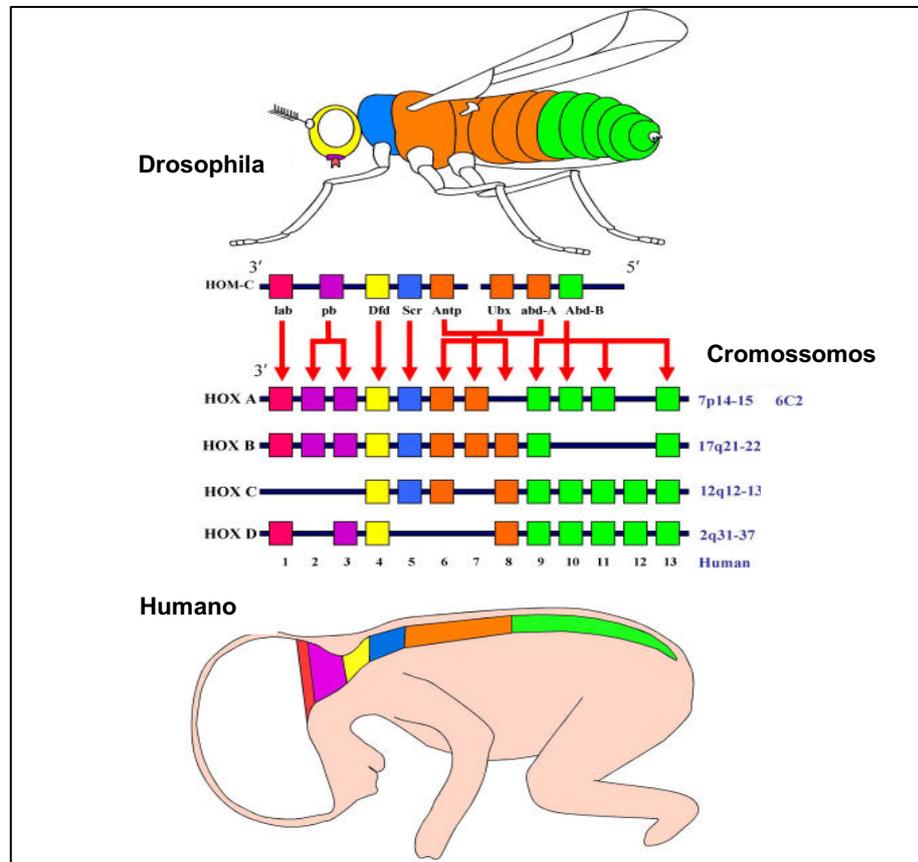
O termo “homeo” tem origem grega e significa similar, semelhante. Esse termo foi empregado para nomear um grupo de genes na sua primeira identificação ocorrida na mosca da fruta *Drosophila*, desse modo foram nomeados de genes homeóticos de *Drosophila* ou genes do complexo homeótico (HOM-C). Eles são assim chamados devido a sua capacidade de causar homeose, ou seja, quando mutados, os mesmos apresentaram a capacidade de transformar um segmento do corpo do inseto em uma outra estrutura de grande semelhança (MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997).

Apesar de identificados inicialmente na mosca da fruta, os genes *HOX* já foram descritos em todos os filos de metazoários, e também em plantas e fungos. As esponjas não apresentam os genes *HOX*, o que reflete na sua estrutura corporal muito simples, quando comparada com animais multicelulares (LAPPIN et al., 2006).

Em vertebrados, especificamente em camundongos e humanos, existem um total de 39 genes *HOX*, que estão organizados em quatro grupos de genes distintos, denominados *HOXA*, *HOXB*, *HOXC* e *HOXD*, localizados respectivamente nos seguintes cromossomos, 7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q31 (ALHARBI et al., 2013). Os grupos de genes *HOX* estão atribuídos a outros 13 grupos de genes parálogos (por exemplo, *HOXA1*, *HOXB1*, *HOXD1*). Eles se organizam de acordo com a semelhança da sequência homeobox e a posição do *cluster* gênico que contém de 9 a 11 membros. A estrutura dos genes *HOX* é composta por dois éxons e um íntron, sendo que o éxon de posição 2 possui uma sequência de DNA com 183 nucleotídeos, o chamado

homeobox, responsável por codificar uma região com aproximadamente 61 aminoácidos, o homeodomínio (GRIER et al., 2005). A organização da distribuição dos genes *HOX* pode ser vista na figura 10, abaixo:

Figura 10 – Organização dos genes *HOX*



Legenda: a imagem mostra os quatro grupos de genes *HOX* que são encontrados em mamíferos. Estes grupos são conservados do complexo *Drosophila* HOM-C em termos de sequência de nucleotídeos. No desenvolvimento embrionário, os genes apresentam expressão correlacionada com o posicionamento cromossômico. Os genes mais próximos de 3' são expressos mais cedo e mais anteriormente do que os genes da região 5'.

Fonte: Adaptado de LAPPIN et al., 2006.

Uma grande parte dos genes *HOX* é expressa no SNC dos vertebrados na fase de desenvolvimento, apresentando funções críticas, como a contribuição para o estabelecimento de redes neurais funcionais. Essas estruturas juntamente com outros conjuntos neurais desempenham uma coordenação chave no SNC, regulando processos fisiológicos complexos, como respiração, locomoção e diversos sistemas sensoriais do organismo (GONÇALVES et al., 2020). Para melhor compreender os mecanismos intrínsecos aos genes *HOX* no neurodesenvolvimento estudos utilizam comumente o cultivo de células *in vitro* (LIPPMANN et al., 2015).

## 2.12 Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e o seu uso na neurobiologia

As células SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) são derivadas de uma linhagem parental, denominada SK-N-SH, obtida de uma biópsia de tumor ósseo metastático de uma criança de 4 anos, do sexo feminino em 1970 (BIEDLER; HELSON; SPENGLER, 1973). A linhagem SK-N-SH foi subclonada três vezes, resultando em SH-SY, SH-SY5 e finalmente em SH-SY5Y. As linhagens resultantes diferem entre si em relação a sua morfologia e crescimento apresentados. As populações de células derivadas da SK-N-SH são semelhantes a neuroblastos ou células epiteliais. A SH-SY apresenta características morfológicas de células epiteliais. Já a linhagem SH-SY5Y além de apresentar células semelhantes a neuroblastos possui uma população de células mais homogênea, essa linhagem foi descrita pela primeira vez em 1978 (BIEDLER; SCHACHNER, 1978).

As células SH-SY5Y possuem a capacidade de se diferenciar em células com fenótipo característico de neurônios maduros e essa funcionalidade da SH-SY5Y proporciona inúmeros benefícios para o campo de estudo da neurobiologia. As vantagens para o seu uso, incluem a capacidade de expansão celular em grande escala, com uma relativa facilidade de cultivo, bem como baixo custo, quando comparada com neurônios primários. As células SH-SY5Y são células de linhagem, não sendo necessário ter questões éticas associadas ao seu uso. Por possuir origem humana, essa célula desperta o interesse para estudos que buscam analisar a expressão de diversas proteínas específicas dos seres humanos que não estão intrinsicamente presentes em culturas primárias de roedores, por exemplo (ENCINAS et al., 2000; ROSS; SPENGLER; BIEDLER, 1983).

Desde a década de 1970 o uso das células SH-SY5Y é bastante empregado em estudos da neurobiologia (PÅHLMAN et al., 1984). Até os dias atuais a aplicabilidade dessa linhagem celular é consolidada de forma satisfatória em diversas áreas do conhecimento. Estudos de doenças neurodegenerativas como Parkinson, utilizam dessa linhagem para avaliar respostas neuroinflamatórias (NIAZ et al., 2020). Investigações de efeitos neurotóxicos na doença de Alzheimer também fazem uso da SH-SY5Y, demonstrando sua eficácia em várias áreas (SHANG et al., 2019).

As células SH-SY5Y são utilizadas nas mais diversas abordagens em estudos de virologia, especificamente nas investigações das implicações de vírus neurotrópicos como o ZIKV. Estudos indicam a permissividade das células SH-SY5Y

frente à infecção com ZIKV. Esses estudos ainda permitiram analisar a cinética viral, a toxicidade e a viabilidade de células SH-SY5Y infectadas pelo ZIKV. Indicando que esse tipo de célula de neuroblastoma serve como um modelo adequado para a compreensão da biologia do ZIKV, e também os mecanismos utilizados na infecção (LUPLERTLOP et al., 2017).

As células SH-SY5Y também são utilizadas para analisar os efeitos da infecção pelo CHIKV. Um estudo realizado por DHANWANI e colaboradores, 2012 mostrou o efeito apoptótico do CHIKV em células SH-SY5Y, indicando esse tipo celular também como um modelo de estudo para analisar a biologia desse vírus (DHANWANI et al., 2012).

O estudo da neurociência abrange métodos de cultura de células neuronais *in vitro* para a compreensão de como funciona o sistema nervoso e suas alterações frente às enfermidades. Apesar da cultura neuronal ser desafiadora devido aos neurônios maduros não sofrerem divisão celular, existem algumas alternativas para estabelecer o cultivo de células de linhagem imortalizadas derivadas de tumores neuronais. Essas células podem ser cultivadas com uma relativa facilidade, apresentam a capacidade de fornecer uma grande proliferação celular, e também oferecem uma cultura celular mais homogênea. Para minimizar a desvantagem desse tipo de célula, que é de apresentar diferenças fisiológicas importantes do tipo de célula de origem, existem técnicas que induzem essas linhagens celulares a produzir um fenótipo neuronal maduro, por exemplo, por meio da suplementação do meio de cultura com fatores estimulantes do desenvolvimento neuronal (GORDON, 2013).

As células SH-SY5Y crescem continuamente com características de células indiferenciadas, com morfologia de neuroblastos. Quando diferenciadas, as células SH-SY5Y se assemelham morfologicamente à neurônios primários, apresentando prolongamentos na extensão celular e uma redução na taxa de proliferação celular. Essas características de neurônios maduros são comprovadas com o aumento da expressão de alguns marcadores específicos de neurônios (PÅHLMAN et al., 1984).

### **2.13 Indução da diferenciação neuronal por ATRA e BDNF**

O ácido retinóico (RA do inglês, *retinoic acid*), é um composto pertencente à classe dos retinóides e derivado da vitamina A, que por sua vez atua em diversos

processos biológicos vitais. O termo retinóides se refere aos análogos estruturais do retinol, sendo que todos derivam de um mono composto cíclico contendo cinco ligações duplas carbono-carbono e um grupo funcional no final da ligação acíclica. Sabe-se que os retinóides desempenham importantes e cruciais funções para a vida de todos os cordados, atuando na regulação do desenvolvimento normal, crescimento e diferenciação de vários tecidos (MONTRONE et al., 2009), além disso, estão envolvidos em uma via complexa de sinalização que regula a expressão de genes em diversos órgãos, como o cérebro, atuando no controle de processos do SNC, e no modelamento neuronal (MADEN, 2007). Sendo assim, a vitamina A é fundamental para a subsistência da vida humana, desde a embriogênese até a fase adulta, no entanto, é bem fundamentado que várias das funções associadas à esta vitamina são exercidas por meio de metabólitos ativos. Dentre esses, destaca-se o principal isômero do ácido retinóico (o ácido retinóico *all trans* (ATRA do inglês, *All-trans retinoic acid*) que está envolvido em mecanismos que atuam na homeostase, crescimento e diferenciação celular e na padronização de células e tecidos durante a embriogênese (AL TANOURY; PISKUNOV; ROCHETTE-EGLY, 2013).

O RA desempenha dois papéis fundamentais no sistema nervoso em desenvolvimento, o de padronização e diferenciação neuronal. Assumindo o papel de padronização, o RA atua tanto na região anteroposterior quanto dorsoventral da placa e tubo neural, sendo responsável pela organização do rombencéfalo posterior e medula espinhal anterior. Diante da ausência de sinalização pelo RA, são tidas consequências como o desenvolvimento anormal da medula espinhal. Outro papel assumido pelo RA, diz respeito à diferenciação neuronal, uma vez que o RA atua na indução de diferenciação celular, de vários tipos de células neurais, ativando a transcrição de muitos genes, incluindo os que codificam fatores de transcrição e os que atuam na sinalização celular (MADEN, 2007).

O conhecimento acerca do RA e sobre as suas propriedades de diferenciação e inibição da proliferação celular data de tempos remotos, nos quais já era empregado os seus mecanismos em células SH-SY5Y (MELINO et al., 1997). Desde então, diversos estudos na área de biologia do desenvolvimento mostram que o desenvolvimento e o tempo de formação de neurônios de um embrião dependem criticamente do nível de RA circulante, sendo este responsável pela regulação de processos como a neurogênese, revisado por (JANESICK; WU; BLUMBERG, 2015).

As células SH-SY5Y quando diferenciadas expressam marcadores neuronais e exibem morfologia de neuritos, dentre os métodos que induzem a diferenciação dessas células, o que faz uso do RA é o mais comumente utilizado e o mais bem descrito (LANGFORD, 2013). Por ser um método eficaz, estudos de diferentes áreas do conhecimento utilizam o RA com a finalidade de diferenciação de diversos tipos de células, destacando-se para o uso em SH-SY5Y (DE MEDEIROS et al., 2019; ILLENDULA; FULTANG; PEETHAMBARAN, 2020).

Dentre as várias concentrações testadas para o tratamento de diferenciação de células SH-SY5Y, a concentração de 10  $\mu$ M do ATRA por um período de 7 dias é a estratégia mais utilizada e uma das mais eficazes em comparação com outras já testadas (LANGFORD, 2013). Mesmo em abordagens mais complexas para o estudo do desenvolvimento neuronal a estratégia de diferenciação de células SH-SY5Y anteriormente mencionada mostrou-se eficaz para a identificação de mecanismos envolvidos na neurodiferenciação (ZHANG; GYGI; PAULO, 2020). Isso pode ser comprovado pela expressão de alguns marcadores específicos de células neuronais em estágios mais avançados da diferenciação celular. Lopes e colaboradores mostraram em seu estudo um aumento na expressão da proteína nuclear neuronal específica NeuN (*neuronal-specific nuclear protein*) em células diferenciadas quando comparado com células indiferenciadas. Em contrapartida, nesse mesmo estudo foi observada uma diminuição significativa na expressão do marcador de células não diferenciadas Nestin nas fases tardias da diferenciação celular (LOPES et al., 2010).

O ATRA quando combinado com o Fator neurotrófico derivado do cérebro, (*BDNF*, do inglês *Brain derived neurotrophic factor*) propicia uma maturação neuronal mais refinada e que mais se aproxima aos neurônios maduros, apresentando visualmente projeções celulares mais complexas, os neuritos, que são característicos do desenvolvimento neuronal. A indução da maturação neuronal realizada com ATRA juntamente com BDNF favorece um aumento significativo da expressão de genes sinápticos chave quando comparado com a indução realizada apenas com o ATRA (GOLDIE; BARNETT; CAIRNS, 2014). Isso ocorre porque o BDNF pertence a uma família de neurotrofinas que possui um papel crucial na sobrevivência e diferenciação das populações neuronais durante o desenvolvimento (HUANG; REICHARDT, 2001).

No cérebro adulto o BDNF apresenta a propriedade de regular tanto a transmissão sináptica excitatória e inibitória, quanto a plasticidade neural (WARDLE; POO, 2003; WILLIAM J. TYLER, STEPHEN P. PERRETT, 2002). O BDNF promove

a sobrevivência de vários tipos de neurônios, alguns inclusive, dependem da presença desse fator neurotrófico para seu desenvolvimento normal (SCHARFMAN, 2004). Sendo um fator da neurogênese, o BDNF tem um papel importante no crescimento, sobrevivência e diferenciação de neurônios (CUI et al., 2012). Teppola e colaboradores observaram em seu estudo que a morfologia das células SH-SY5Y quando tratada com BDNF apresentou uma relativa polarização e um crescimento mais disperso diferentemente das células do grupo controle que cresceram agrupadas (TEPPOLA et al., 2016).

O BDNF em associação com o ATRA auxilia a diferenciação celular são bastante eficazes para uma diferenciação celular mais refinada, levando células em estados mais iniciais do desenvolvimento para um estado mais maduro. O trabalho de Encinas e colaboradores evidenciou a importância do uso dos dois indutores em um tratamento sequencial. Seu estudo mostra que esse método para diferenciação de SH-SY5Y é capaz de gerar o desenvolvimento de uma população neuronal mais homogênea com a expressão de marcadores neuronais e redução da proliferação celular e muitas características de culturas primárias de neurônios, como a expressão de marcadores de polaridade neuronal como a proteína TAU associada à microtúbulos (MAPT) e a proteína associada a microtúbulos 2 (MAP2) (ENCINAS et al., 2000).

Fatores indutores de diferenciação celular como o RA apresentam um papel de destaque no neurodesenvolvimento ativando genes importantes da neurogênese, como por exemplo, os genes *HOX*, descritos a seguir (CUNNINGHAM; DUESTER, 2015).

O entendimento dos processos celulares que ocorrem em qualquer tipo de desenvolvimento, e neste caso na neurogênese perpassa pela identificação da expressão de fatores moleculares responsáveis por indicar determinadas alterações celulares induzidas por fatores externos, como as infecções neurais. Para investigar a neurogênese, bem como os efeitos das infecções virais nesse importante processo de formação neuronal, o cultivo de células em 3D vem se tornando um método bastante utilizado por sua capacidade de auto-organização e complexidade.

## 2.14 Cultura tridimensional (3D)

A cultura de células faz parte de experimentos necessários e de grande importância no estudo de medicamentos, na pesquisa de câncer, de diversas doenças crônicas e também para investigar possíveis mecanismos da infecção viral nos mais diversos tipos de células. A grande maioria dos estudos utilizam métodos bidimensionais (2D), modelo esse em que as células se encontram dispostas em monocamada (FRESHNEY, 2016). No entanto, com o aprimoramento e implementação de técnicas de cultura celular tridimensional (3D), aliadas a evidências de bons resultados com esse modelo de cultivo, tem-se tido um grande interesse da comunidade científica acerca de pesquisas que façam uso do cultivo 3D (EGLIN; REISINE, 2019).

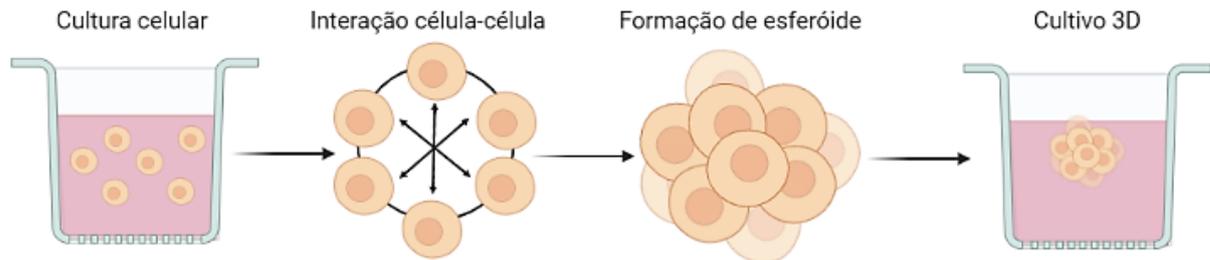
O cultivo tridimensional proporciona um ambiente celular que mais se assemelha as condições do ambiente *in vivo*, isso ao se comparar com o cultivo 2D, uma vez que proporciona um ambiente mais favorável para interações célula-célula. Atualmente existem diversas técnicas que permitem o cultivo 3D, como suporte baseado em hidrogel, fibra de vidro hidrofílica, levitação magnética e microplacas apropriadas para esse uso. Cada técnica apresenta suas próprias vantagens e limitações de acordo com a pesquisa de interesse. A escolha do cultivo 3D tem o intuito de preencher certas lacunas da cultura celular em monocamada e também oferecer uma metodologia alternativa ao uso de animais (RYU; LEE; PARK, 2019).

O uso da cultura de células em monocamada desempenha até os dias de hoje um papel fundamental na pesquisa das mais diversas áreas do conhecimento, tornando-se uma das principais ferramentas no estudo da biologia celular e molecular, contudo, o crescimento de alguns tipos celulares em superfícies planas permite o contato célula-célula apenas na sua periferia. Ao realizar o cultivo 3D é possível oferecer um ambiente no qual as células possam interagir utilizando as três dimensões, e essa condição proporciona melhorias em estudos direcionados à morfologia, proliferação e viabilidade celular, bem como resposta à estímulos (ANTON et al., 2015).

Diversos tipos de células tendem a formar agregados celulares por meio de contatos mútuos que possibilitam a formação de um fenótipo semelhante a um tecido. Nesse contexto os esferoides celulares, ou seja, a formação de uma estrutura em

formato de esfera (Figura 11) são modelos simples com poder de auto-organização gerados por meio do cultivo 3D (PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007).

Figura 11 – Formação da estrutura tridimensional



Fonte: criado pela autora.

Legenda: a imagem representa a formação de agregados celulares partindo de um cultivo celular, que após condições adequadas permitem a interação célula-célula, criando um microambiente favorável para a formação de agregados celulares, os esferóides, por meio do cultivo 3D.

Os estudos da evolução e progressão de distúrbios neurológicos, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson são bastante explorados em modelos animais. No entanto, com o desenvolvimento de inovações biotecnológicas que permitem o desenvolvimento de modelos de estudos com células neuronais, muitas pesquisas vêm fazendo uso de modelos cerebrais que recapitulam características fisiológicas de células humanas, com o intuito de compreender melhor os mecanismos cerebrais e a etiologia de diversas doenças neurológicas humanas (TAN; CHO; LEE, 2021). Estruturas 3D de células neuronais são fundamentais em diversos estudos do desenvolvimento do cérebro, como a neurogênese, bem como distúrbios do neurodesenvolvimento (BALDASSARI et al., 2020; LI et al., 2020).

Agregados celulares gerados a partir de células-tronco pluripotentes induzidas, também denominados de organoides cerebrais proporcionam características fisiológicas e estruturais muito semelhantes ao cérebro humano embrionário, sendo possível recapitular doenças complexas como a microcefalia (LANCASTER et al., 2013).

A tecnologia desse tipo de cultivo vem se tornando uma ferramenta poderosa para estudar vários aspectos biológicos, como a morfogênese de tecidos e a modelagem de doenças *in vitro* (ALHAQUE; THEMIS; RASHIDI, 2018).

Dentre as diversas ferramentas utilizadas para a cultura tridimensional, destaca-se o uso baseado em levitação magnética que emprega nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina que em conjunto com ímãs criam um

ambiente que proporciona o agrupamento celular por meio de levitação. Um estudo recente mostrou que o cultivo 3D com nanopartículas induziu a produção de uma complexa matriz extracelular, refletindo melhor a arquitetura do tecido *in vivo* (VU; SOUZA; DENGJEL, 2021).

Células humanas SH-SY5Y fazem parte de estudos da neurociência em várias áreas do conhecimento. Quando cultivadas em monocamada fornecem respostas eficazes para o estudo de infecções virais. No entanto, a cultura de células em um ambiente que proporciona a formação de uma estrutura tridimensional ganhou destaque nos últimos anos para melhor reproduzir mecanismos mais complexos, como por exemplo, a neurogênese, uma vez que no desenvolvimento embrionário as células se organizam em uma automontagem biológica com uma arquitetura 3D por meio de contatos célula-célula. Neste contexto, os genes HOX atuam no desenvolvimento embrionário regulando importantes processos biológicos como proliferação, diferenciação e migração celular. No entanto, vírus neurotrópicos, como o ZIKV e CHIKV podem alterar a expressão de importantes genes HOX em estruturas de neuroesferas (3D) em processo de diferenciação celular. Essas estruturas podem produzir citocinas reguladoras da resposta inflamatória frente à infecção viral.

### 3 JUSTIFICATIVA

A gravidade das doenças neurológicas associadas ao ZIKV e a sua rápida disseminação, bem como os relatos associados com desordens neurológicas provocadas pelo CHIKV resultaram em uma necessidade urgente de entender os mecanismos desses vírus na neuropatogênese no que se diz respeito a aspectos moleculares e imunológicos da infecção em células neuronais. A complexidade de estudar órgãos humanos, como o cérebro, leva a busca por novas alternativas que mimetizem *in vitro* o desenvolvimento de células desde os seus estágios iniciais até estágios mais maduros do desenvolvimento. Então o sistema utilizado no presente trabalho trata-se de neuroesferas por meio do cultivo em 3D. Uma das grandes vantagens desse tipo de cultura é a rapidez na montagem e o fácil manuseio.

Compreender mecanismos da neuropatogênese viral, no que se diz respeito à preencher lacunas nas áreas da virologia, imunologia, neurociência e biologia do desenvolvimento podem contribuir para maiores esclarecimentos dos mecanismos usados por vírus com características neurotrópicas como o ZIKV e CHIKV. São inúmeros os estudos sobre o ZIKV o que pode direcionar novas pesquisas acerca do CHIKV, já que existem lacunas nas pesquisas sobre o CHIKV e danos neurológicos.

O ZIKV e o CHIKV apresentam tropismo por células neurais, tanto as indiferenciadas, quanto as que estão em processo de maturação mais avançado. Com isso, a infecção por ambos os vírus pode alterar a expressão de fatores moleculares importantes para a diferenciação celular, como os genes *HOX*. Estes genes modulam vários processos do neurodesenvolvimento. Identificar quais destes genes são modulados pela infecção por vírus neurotrópicos, como o Zika e Chikungunya, pode impactar em descobertas da neuropatogênese ainda desconhecidas. Ademais, elucidar aspectos da infecção neural em sistema de cultivo celular em três dimensões (3D) permite compreender mecanismos em um ambiente mais complexo, frente à cultura em monocamada.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar novos modelos de cultivo neuronal 3D (neuroesferas) a partir de células SH-SY5Y diferenciadas e avaliar a modulação da expressão dos genes *HOX* nestes modelos após a infecção com os vírus neurotrópicos Zika e Chikungunya.

### 4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Desenvolver e otimizar o cultivo 3D em células neuronais SH-SY5Y;

4.2.2 Caracterizar o potencial das neuroesferas SH-SY5Y para ensaios de infecção experimental com ZIKV e CHIKV;

4.2.3 Analisar o perfil da expressão de fatores de transcrição (genes *HOX*) envolvidos com a diferenciação neuronal em neuroesferas infectadas pelos vírus ZIKV e CHIKV;

4.2.4 Avaliar o perfil de citocinas inflamatórias produzido por neuroesferas frente à infecção por ZIKV e CHIKV.

4.2.5 Analisar a morfologia e ultraestrutura celular de neuroesferas diferenciadas e infectadas por CHIKV.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ-PE.

### 5.1 Produção do estoque viral

#### 5.1.1 Células VERO (ATCC® CCL81™)

A produção do estoque viral, das cepas CHIKV *H.sapiens/Brazil/PB302/2016* e ZIKV/*H.sapiens/Brazil/PE243/2015*, foi realizada a partir do cultivo de células VERO, que correspondem a linhagem de rim de macaco-verde africano e foram obtidas originalmente da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA).

As células VERO foram cultivadas em garrafas T-75 (cm<sup>2</sup> de área) contendo 3 x 10<sup>6</sup> células. O cultivo foi feito em meio MEM (do inglês, *Minimum Essential Media*, Gibco™) suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino, inativado à 56 °C, por 30 minutos) e acrescido de uma solução de antibiótico contendo 1% de penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/ mL, Gibco™. A cultura celular de VERO foi mantida em estufa à temperatura de 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. A produção dos estoques virais de ZIKV e CHIKV foi realizada em dias diferentes respeitando o tempo de replicação específico para cada vírus, como descrito no próximo tópico.

#### 5.1.2 Infecção das células Vero

Para o estoque de CHIKV, uma amostra do vírus, contendo 1 mL de volume, foi inoculada em células VERO previamente cultivadas em garrafa. Para o processo de adsorção viral, as partículas virais ficaram em contato com às células por 2 horas, e a cada 15 min movimentos circulares de agitação foram realizados. Este processo ocorreu em estufa com temperatura de 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 horas do processo de adsorção viral, foi adicionada à garrafa de cultura celular, 14 mL de meio MEM suplementado com SFB à 2% e solução de antibiótico 1% de penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/ mL, Gibco™. O crescimento viral ocorreu em estufa nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

Passadas 24h após o início da infecção viral foi realizado o monitoramento dos efeitos citopáticos sobre as células por meio da visualização em microscópio óptico invertido. Mudanças na morfologia das células caracterizaram os efeitos da replicação viral quando comparada com o controle negativo, ou seja, culturas de células não infectadas. Após 48h desde o início da infecção, a garrafa de cultura passou por um ciclo de congelamento à - 80 °C a fim de promover a lise celular e liberar vírus intracelulares. Posteriormente, a garrafa com o conteúdo viral foi descongelada e a suspensão foi transferida para um tubo cônico tipo falcon e então centrifugada à rotação de 2.000 x g por 10 minutos em temperatura de 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante contendo as partículas virais foi separado do sedimentado, e mais uma etapa de centrifugação foi realizada. Por fim, o sobrenadante foi filtrado em filtro para seringa PVDF 0,22 µm e aliqotado em criotubos com um volume de 1mL.

Para a produção do estoque viral do ZIKV, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para o CHIKV, exceto pelo tempo de observação dos efeitos citopáticos e congelamento da garrafa, que se deu após 120h desde o início da infecção. Todas as etapas remanescentes seguiram os mesmos passos utilizados para o CHIKV.

Para analisar a eficácia dos estoques virais obtidos, foi necessário realizar um experimento que mensurasse os títulos virais de cada estoque.

## 5.2 Titulação dos Estoques Virais

Os estoques dos vírus foram titulados por meio de ensaios de placa de lise. Para tal, células VERO ( $1,0 \times 10^5$  células/ poço), cultivadas por 24 h, foram infectadas com diluições seriadas dos respectivos estoques virais, de ZIKV e CHIKV. Após 1 hora de adsorção viral em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, foi adicionado meio MEM contendo 1% de carboximetilcelulose (CMC) em volume final de 1 mL por poço. Após 6 dias de infecção para o ZIKV e 2 dias de infecção para o CHIKV. O tempo de infecção difere entre os vírus, devido as características do ciclo replicativo de cada um. Após o período de infecção as células foram fixadas com formalina e, logo em seguida, coradas com cristal violeta. O número total de placas de lise foi determinado por contagem a olho nu. Os valores foram expressos em unidades formadoras de placa (PFU, do inglês *Plaque Forming Units*) /mL.

Os estoques virais obtidos e titulados foram utilizados para todos os experimentos de infecção em células neuronais, SH-SY5Y.

### 5.3 Células SH-SY5Y

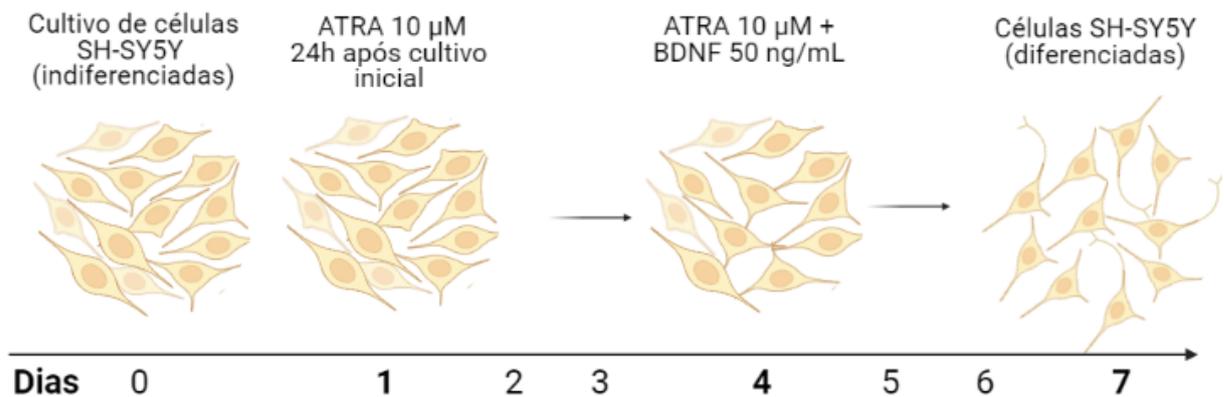
#### 5.3.1 Indução da diferenciação de células SH-SY5Y em monocamada

Este experimento de diferenciação de células SH-SY5Y em monocamada serviu como uma etapa preliminar para posteriormente ser realizada a diferenciação dessas células em modelo de cultura tridimensional.

As células neuronais SH-SY5Y foram obtidas originalmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). O total de  $1 \times 10^6$  células foram cultivadas em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> em meio MEM (*Modified Eagle Media*, Gibco™) suplementado com F-12 (do inglês, *Ham's F12 Nutriente Mixture*, Gibco™), HEPES, 10% de SFB e 1% de penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/ mL, Gibco™. Posteriormente as células foram mantidas em estufa a 37 °C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Então o meio foi substituído por novo meio MEM suplementado com os mesmos componentes já descritos, no entanto neste momento houve redução da porcentagem do SFB para 1%. A fim de inibir a proliferação celular e induzir a diferenciação das células SH-SY5Y o meio também foi suplementado com 10 µM de ATRA (*do inglês, all trans-Retinoic Acid*, Sigma Prod. No. R2625).

As células permaneceram com este meio até o 4º dia (96h) do cultivo celular. Neste momento da diferenciação, além da renovação do meio de cultura com adição de 10 µM de ATRA, foi também acrescentado ao meio 50 ng / mL de BDNF (do inglês, *Brain-derived neurotrophic fator*, B3795-10U, Sigma-Aldrich Brasil Ltda). O BDNF é responsável por auxiliar o ATRA no processo de diferenciação e juntos promovem a diferenciação de uma forma mais eficaz. Após essa nova suplementação, o final da diferenciação de células SH-SY5Y se deu no 7º dia (168h) do cultivo celular. Esse protocolo foi baseado nos estudos de Medeiros, 2019 e Encinas, 2000 (DE MEDEIROS et al., 2019; ENCINAS et al., 2000). As células diferenciadas em monocamada foram analisadas por microscópio de luz óptica invertido. O esquema de diferenciação celular em monocamada está exemplificado na figura 12.

Figura 12. Esquematização da diferenciação neuronal *in vitro*



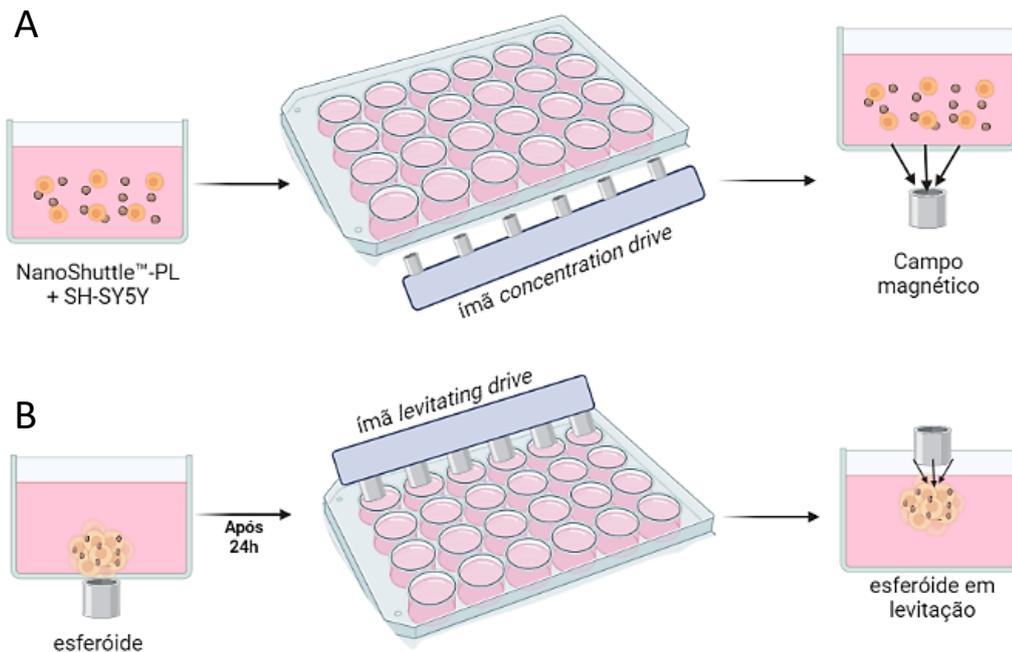
Fonte: criado pela autora

Legenda: a imagem representa o processo de diferenciação neuronal induzida por ATRA e BDNF. O processo se inicia com células SH-SY5Y imaturas e após a adição de ATRA ao meio as células tendem a desenvolver ramificações características da diferenciação celular e após a adição do BDNF a diferenciação neuronal torna-se mais eficaz com formações de neuritos mais acentuados.

#### 5.4 Cultivo tridimensional de células SH-SY5Y

Para esse experimento foi utilizada uma plataforma magnética de cultivo tridimensional (*Magnetic 3D Cell Culture*, Greiner Bio-One). Esta tecnologia é baseada na magnetização de células com nanopartículas magnéticas, *beads* NanoShuttle™-PL, como esquematizado na Figura 13. Essas *beads* são compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina que agem eletrostaticamente com a membrana celular permitindo a interação entre células e *beads*. Essas nanopartículas magnéticas são biocompatíveis e não interferem no metabolismo, proliferação e estresse celular (HAISLER et al., 2013).

Figura 13 - Esquematização do cultivo 3D por levitação magnética



Fonte: criado pela autora por meio do *BioRender*.

Legenda: a imagem esquematiza o sistema de formação da estrutura em 3D. Em A tem-se a representação da incubação de *beads* magnéticas com as células. O ímã de concentração celular cria um campo magnético que faz com que as células sejam atraídas para ele iniciando a formação do agregado celular. Em B, está representada a formação do esferóide 24h após o contato com ímã de concentração. Posteriormente, esse ímã é substituído pelo ímã de levitação celular que permite que a estrutura 3D (esferóide) levite no poço de cultura celular.

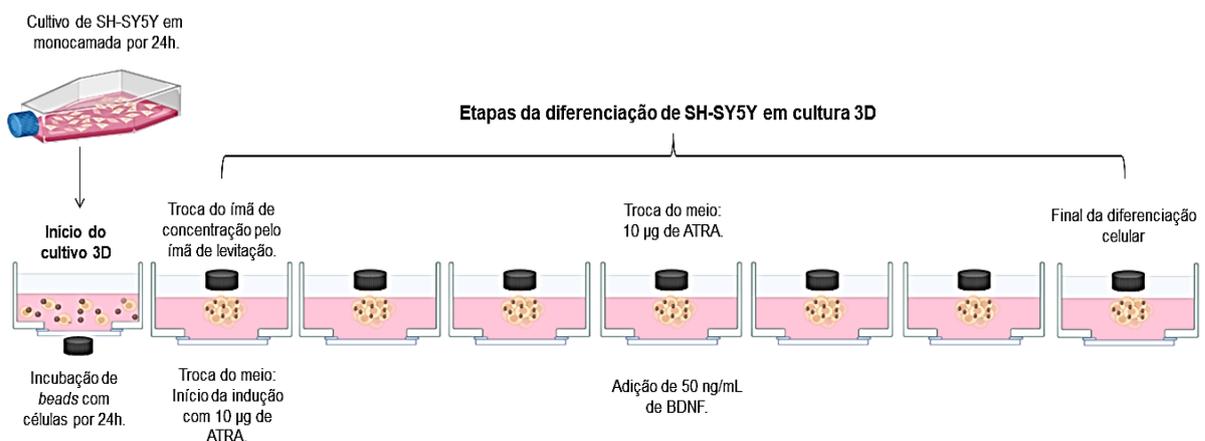
Testes de concentração do número de células com as *beads* foram realizadas com o objetivo de identificar qual a quantidade celular seria mais adequada para análises experimentais. Foram incubadas  $1,5 \times 10^6$  de células SH-SY5Y com  $15 \mu\text{L}$  NanoShuttle™-PL/poço em microplaca de 24 poços. O ímã *concentration drive* foi inserido logo embaixo da placa de cultivo para proporcionar a agregação celular e após o período de 24 horas o *concentration drive* foi substituído pelo ímã *levitating drive*, que permite a levitação do agregado celular até a formação completa da estrutura tridimensional. As ferramentas magnéticas são projetadas de tal modo que cada poço da placa tenha um ímã correspondente, servindo como um ponto focal de agregação celular (BAILLARGEON et al., 2019).

O processo de padronização da diferenciação celular em monocamada, seguido da padronização do cultivo em 3D, serviu para ser realizada a padronização da diferenciação celular também no modelo tridimensional, a fim de realizar ensaios de infecção, análises morfológicas e moleculares.

## 5.5 Diferenciação celular de neuroesferas com ATRA e BDNF

Para a diferenciação de neuroesferas foi seguido o mesmo protocolo padronizado para células SH-SY5Y em monocamada. As células em monocamada foram cultivadas em meio MEM suplementado com F12 Gibco™, HEPES, 1% de penicilina 10.000 U/mL e estreptomicina 10.000 µg/mL, Gibco™) e 10% de SFB. Após 24 h de cultivo de células SH-SY5Y em monocamada, foi realizada a transição desse tipo de cultura para o início da cultura em 3D que ocorre quando é utilizada a plataforma magnética apresentada anteriormente. No primeiro dia da diferenciação das neuroesferas foi adicionado um novo meio MEM/F12 com redução do SFB para 1% contendo 10 µM de ATRA (*do inglês* (Sigma Prod. No. R 2625). O meio foi substituído novamente no 4º dia do cultivo celular. Neste momento da diferenciação, além da adição de 10 µM de ATRA, foi acrescido ao meio 50 ng / mL de BDNF Sigma-Aldrich Brasil Ltda). A diferenciação de neuroesferas teve sua etapa final no 7º dia, no qual foi realizada a extração do RNA celular total a fim de analisar a eficácia do processo. A extração foi realizada por meio do *Direct-zol RNA purification Kits*, seguindo as recomendações do fabricante. Para esta análise foram utilizadas como controle neuroesferas tratadas com DMSO (*do inglês, dimethyl sulfoxide*, Sigma Aldrich), pois este é o meio de veículo de diluição do ATRA. O esquema da diferenciação pode ser observado na figura 14.

Figura 14– Diferenciação de neuroesferas



Fonte: criado pela autora por meio do BioRender.

Legenda: a imagem esquematiza o sistema de formação da estrutura 3D, bem como as etapas da diferenciação que tem início com a adição do ATRA 24 horas após a formação do agregado celular, no dia 4 do processo além do ATRA e adicionado ao meio BDNF.

## 5.6 Análise da integridade da estrutura de filamentos de actínia de neuroesferas diferenciadas

Neuroesferas diferenciadas foram fixadas em PFA (do inglês, *paraformaldehyde*) 4% por 20 min, emblocadas em Tissue Tek (O.C.T Compound, Fisher Healthcare) e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido por mergulhamento. Os blocos foram armazenados a - 80 °C até o dia da realização dos cortes histológicos.

Os cortes foram feitos em criostato Leica CM1860 na temperatura de 27 °C com a espessura de 10µm. As amostras foram permeabilizadas com PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) 1% contendo 0,5 % de triton X-100 por 15 min e posteriormente passaram pelo processo de 3 lavagens com PBS 1 X por 10 min e tratadas com uma solução de bloqueio (PBS 1% contendo 5% de BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. Para a marcação da estrutura celular foi utilizado Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (Invitrogen, USA), na concentração de 1:20 e posteriormente as lâminas foram montadas com *Fluoromount-G* contendo DAPI (Invitrogen, USA) até o dia da análise no Microscópio de Fluorescência DMI8, Leica.

## 5.7 Análise da diferenciação celular de neuroesferas por RT-qPCR

A fim de analisar a eficácia da diferenciação celular de neuroesferas foi investigada a expressão de genes importantes para a diferenciação de células neuronais: *MAPT* (do inglês, *Microtubule-associated protein Tau*), *MAP-2* (do inglês, *Microtubule-associated protein 2*), *SNAP-25* (proteína de 25 kDa associada ao sinaptossoma) e *ATP2A2*, gene que codifica a proteína sarco (endo) retículo plasmático Ca<sup>2+</sup> +ATPase isoforma 2. Os *primers* utilizados estão listados na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados para análise da diferenciação neuronal

<b>Primers</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
B2M	5'- ACTGAATTCACCCCCACTGA-3'	CCTCCATGATGCTGTTACA-3'
SNAP-25	5'- TGATGAGTCGCTGGAAAGCA-3'	5'- AAAGGCCACAGCATTTCCT-3'
MAP-T	5'- GCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAA-3'	5'- GGAAGGTCAGCTTGTGGGTTTCAAT-3'
MAP-2	5'- CAGAGGAGGTGTCTGCAAGG-3'	5'- TCAGCTGCTAAAGGCAGAGC-3'
ATP2A2	5'- GAAATGTGTAACGCCCTCAAC-3'	5'- AAGATGAGTGGCAAGGGTTC-3'

Legenda: a tabela mostra a sequência de *primers Forward* e *Reverse* utilizados para a análise de diferenciação de células SH-SY5Y.

Para tal análise foi realizada a extração do RNA celular total de neuroesferas tratadas com DMSO (controle) e tratadas com ATRA e BDNF por meio do kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Califórnia, EUA). O RNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o equipamento *NanoDrop*, Thermo Scientific™ e a concentração final foi dada em 150ng/μL. Para a produção de cDNA foi utilizado o *applied High-capacity cDNA Reverse transcription Kit*, (ThermoFisher, Waltham,MA) e posteriormente foi realizada a reação de PCR com SYBR™ Green PCR *Master Mix* (Applied Biosystems®), seguindo as recomendações do fabricante.

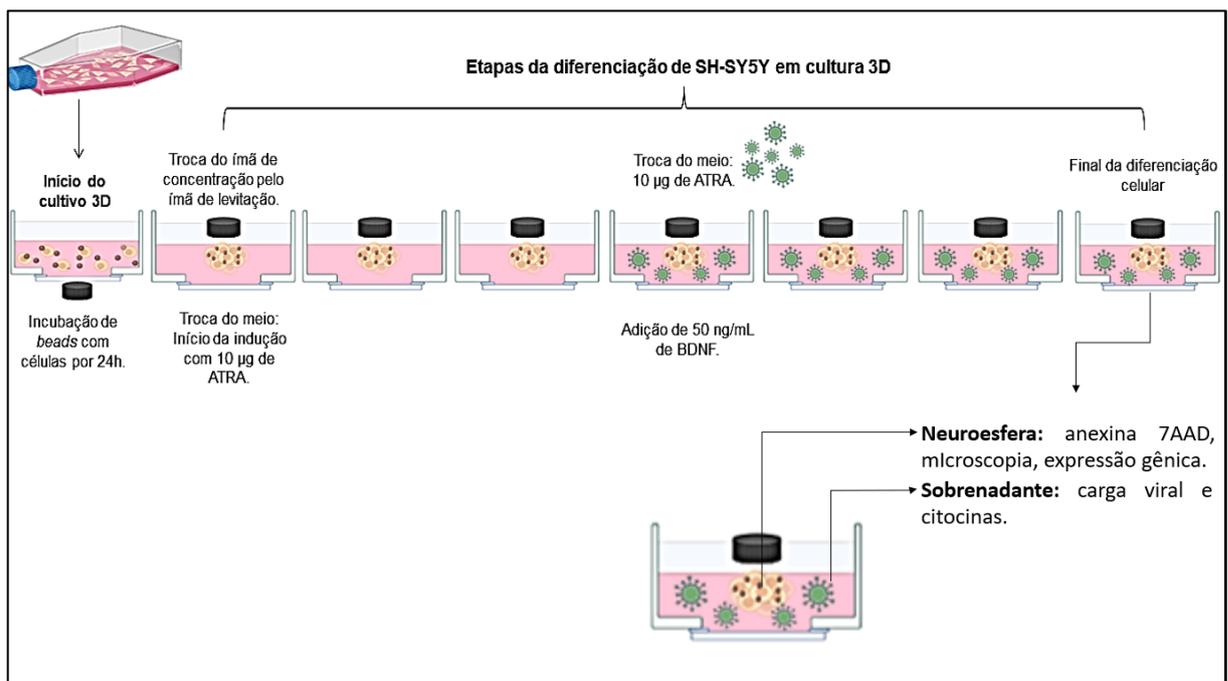
A análise estatística foi feita pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal dos dados. Em seguida, para a análise da expressão dos marcadores neuronais foi utilizado o teste *Two-way ANOVA*. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas valores de  $p < 0,05$ .

Após realizar os testes de diferenciação celular em neuroesferas, as mesmas passaram pelo processo de infecção com os vírus de interesse, CHIKV e ZIKV. O CHIKV foi o vírus mais explorado no presente trabalho, visto que estudos anteriores com o ZIKV já alcançaram muitas das respostas para as perguntas iniciais deste trabalho. No entanto, neuroesferas também foram infectadas com ZIKV e foi avaliada a expressão dos genes *HOX*, tema central deste estudo, a fim de avaliar a resposta da infecção frente à expressão gênica.

## 5.8 Infecção de neuroesferas

Para a infecção de neuroesferas com CHIKV foi utilizada a multiplicidade de infecção (*Multiplicity Of Infection-MOI*) de 1 e para a infecção com ZIKV foi utilizada a MOI de 3. Inicialmente as células foram incubadas com NanoShuttle™-PL, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Após 24h do cultivo celular e incubação com *beads* magnéticas as neuroesferas foram tratadas com 10 $\mu$ M de ATRA no 1º dia da diferenciação celular. No 4º dia, foi realizada a infecção pelo CHIKV da seguinte forma: o ímã *levitating drive* foi removido e 300  $\mu$ L de meio de MEM suplementado com F12, 1% de SFB, 10 $\mu$ M de ATRA e 50ng/mL de BDNF foi adicionado em neuroesferas para a condição controle (ATRA+BDNF) e para a condição infectada foi adicionado o inóculo viral correspondente ao MOI de 1. O processo de infecção de neuroesferas em fase de diferenciação celular está exemplificado na figura 15, abaixo:

Figura 15. Esquematização da infecção de neuroesferas



Fonte: a autora por meio do *Biorender.com*

Legenda: a imagem mostra o processo da formação de neuroesferas, diferenciação celular por meio do ATRA+BDNF e infecção viral no 4º do experimento.

Como mencionado anteriormente o trabalho ficou centrado nos experimentos com CHIKV e para isso muito do conhecimento teórico do ZIKV tornou este vírus como uma referência para o desenvolvimento dos experimentos com CHIKV.

### **5.9 Extração do RNA viral**

O kit *ReliaPrep™ Viral TNA Miniprep System, Custom* foi utilizado para a extração do RNA viral proveniente do sobrenadante de neuroesferas infectadas com CHIKV seguindo as recomendações do fabricante. O RNA foi eluído em um volume final de 60µl em água livre de nucleases e estocado imediatamente em freezer -80°C para a posterior avaliação da infecção em neuroesferas.

### **5.10 Cinética viral**

Com a finalidade de analisar a infecção pelo CHIKV ao longo do tempo em neuroesferas em processo de diferenciação celular, as mesmas tiveram seus sobrenadantes coletados nos tempos de 6 horas pós infecção (hpi), 12hpi, 24hpi, 48hpi e 72hpi. Os sobrenadantes foram armazenados em freezer a – 80 °C, até a quantificação da carga viral.

### **5.11 Quantificação da carga viral**

A quantificação da carga viral das neuroesferas infectadas foi analisada por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). Para isso foi utilizado o kit molecular ZDC *One Step* RT-qPCR de Bio-Manguinhos.

### **5.12 Detecção de partículas virais de CHIKV em neuroesferas infectadas**

Os procedimentos de imuno-histoquímica foram os mesmos descritos para a marcação de actina. No entanto, para observar partículas virais de CHIKV em neuroesferas infectadas foi utilizado o anti-CHIKV (*Chikungunya Virus monoclonal*, Invitrogen – MA5-18181) na concentração de 1:50 e como anticorpo secundário foi

utilizado o Alexa Fluor™ 488. Como controle do experimento neuroesferas diferenciadas com ATRA e BDNF também foram marcadas com anti-CHIKV.

A visualização da marcação dos cortes das neuroesferas foi feita pelo microscópio de fluorescência LeicaDMi do NPT- Núcleo de Práticas Tecnológicas do IAM-Instituto Aggeu Magalhães.

### **5.13 Processamento de amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para avaliar a superfície de neuroesferas tanto diferenciadas, quanto infectadas pelo CHIKV foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). As neuroesferas controle (diferenciadas com ATRA e BDNF) e neuroesferas infectadas com CHIKV foram lavadas com tampão PBS a fim de retirar componentes residuais do meio de cultura. Posteriormente as neuroesferas foram fixadas em 2,5% glutaraldeído e PFA em 0,1 M tampão de cacodilato, pH 7,2. As neuroesferas passaram pelo processo de pós-fixação por 30 min em OsO<sub>4</sub> (tetróxido de ósmio) 1% ao abrigo da luz. Após esta etapa as neuroesferas foram desidratadas em etanol em concentrações crescentes. O etanol foi substituído por gás carbônico liquefeito na câmara do aparelho de ponto crítico Leica EM CPD300. As neuroesferas foram então revestidas com ouro no equipamento metalizador EM ACE200 Leica e depois observadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-5600, operando a 15 Kv da Plataforma de Microscopia Eletrônica RPT07G, do Instituto Aggeu Magalhães (IAM).

### **5.14 Processamento de amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A fim de analisar a ultraestrutura celular das neuroesferas, as mesmas foram observadas por Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET). Elas passaram pelo mesmo processo de fixação descrito para a análise pelo microscópio eletrônico de varredura. Posteriormente foi realizada a pós fixação com OsO<sub>4</sub> e tampão de ferrocianeto 1%, ao abrigo da luz. As neuroesferas foram lavadas em 0,1 M de tampão cacodilato, pH 7,2 e posteriormente foram contrastadas com uranila 2,5%. Então foram desidratadas em acetona em concentrações crescentes e emblocadas em Epon-812. As seções das neuroesferas foram obtidas por ultramicrotomo e colhidas em redes de cobre que posteriormente foram tratadas com uranila e citrado de

chumbo. A observação das imagens foi também realizada por meio da Plataforma de Microscopia Eletrônica RPT07G, do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) com o uso do microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit.

### 5.15 Detecção de células apoptóticas em neuroesferas infectadas com CHIKV

Neuroesferas infectadas com CHIKV foram avaliadas quanto a porcentagem de apoptose quando comparadas com neuroesferas controle (apenas tratadas com ATRA e BDNF). Devido à estrutura relativamente densa das neuroesferas, foi necessário fazer a dissociação das mesmas com a enzima accutase™ (BD, Biosciences), seguindo as recomendações do protocolo *Dissociation of human or rat neurosphere cultures* da Innovative Cell Technologies, Inc. Após a completa dissociação das neuroesferas foi iniciado o experimento para detecção de células apoptóticas com o uso de anexina V e 7-aminoactinomicina D (7-AAD). Foi adicionada à suspensão celular 100 µL de meio de cultura MEM suplementado com F12 e 2% de SFB em tubo cônico e centrifugado por 295 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi lavado 3 vezes com PBS 1% gelado seguido de centrifugação nas mesmas condições já citadas. O *pellet* foi ressuspensionado em 100µL de *Annexin-V-Binding Buffer* 1% gelado, foi adicionado 5 µL de anexina-FITC e 5µL de 7-AAD-PercyPCy5. A solução foi homogeneizada e incubada por 15 min no gelo, ao abrigo da luz. A suspensão foi transferida para tubos apropriados para citometria e foi adicionado 400µL de *anexina binding buffer*. A leitura foi realizada imediatamente por meio do citômetro BD FACS Aria™ III.

Para a análise dos dados foi utilizado o programa *FlowJo* 10.5.0. Cada condição do teste foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagens de células anexina V e 7-AAD positivas (células apoptóticas e necróticas). Seguido da análise estatística utilizado o programa *GraphPad Prism* 8.0.2. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando o  $p < 0,05$ . Para essa análise foi adotado o teste *t* não pareado que compara as médias entre dois grupos independentes para determinar a diferença significativa entre ambos.

Este ensaio permitiu o reconhecimento eficiente da proteína anexina V aos resíduos de fosfatidilserina. Em células viáveis estes resíduos permanecem na face interna da membrana plasmática. Em caso de morte celular programada (apoptose),

esses resíduos ficam expostos na face externa da membrana, na qual é possível a ligação da proteína anexina V. Em combinação com a anexina foi utilizado o fluorocromo de viabilidade 7-AAD, pois é um intercalante de DNA que penetra apenas em células com ruptura de membrana, não sendo permeável à membrana de células viáveis.

### **5.16 Cytometric Beads Assay (CBA)**

Com o intuito de dosar citocinas em neuroesferas infectadas pelo CHIKV e ZIKV foram cultivadas neuroesferas nas seguintes condições: neuroesferas de SH-SY5Y sem nenhum tratamento, neuroesferas de SH-SY5Y tratadas com DMSO, e neuroesferas diferenciadas com ATRA e BDNF. Estas serviram como controles do experimento. As neuroesferas testes foram infectadas com CHIKV (MOI 1,0) ou ZIKV (MOI 3,0). Para todas as condições foram realizados ensaios em triplicata.

Os sobrenadantes das culturas das neuroesferas, em todas as condições, tiveram suas citocinas dosadas por meio do kit de CBA de citocinas inflamatórias (*BD CBA Kits inflammatory cytokines*<sup>®</sup>), seguindo as instruções do fabricante. Para esse ensaio foram dosadas as seguintes citocinas: IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-10 e TNF.

A análise dos dados se deu pelo *BD FCAP Array Software* e a análise estatística foi realizada pelo GraphPad Prism 8.0.2. O teste estatístico *One-Way ANOVA* foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos experimentais e posteriormente foi utilizado o teste de comparação múltipla *Bonferroni* e um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### **5.17 RT-qPCR array – Genes HOX**

A fim de avaliar se genes HOX são diferencialmente expressos em neuroesferas infectadas por CHIKV ou ZIKV quando comparadas com neuroesferas controle (tratadas com ATRA e BDNF) foi utilizado um ensaio de expressão gênica descrito a seguir. O tempo de infecção foi de 72 horas, coincidindo com o final da diferenciação celular. Para a análise da expressão gênica dos genes *HOX*, primeiramente foram extraídos os RNA's das neuroesferas utilizando o kit de extração *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Califórnia, EUA), que permite a purificação do RNA a partir

de pequenas quantidades de tecidos ou células. O procedimento foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Os RNA's foram quantificados por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop, Thermo Scientific™. Após ser mensurados foi adotada uma diluição na qual a concentração final de cada RNA foi de 150ng/μL. Para a produção de cDNA foi utilizado o *applied High-capacity cDNA Reverse transcription Kit*, (ThermoFisher, Waltham, MA), seguindo as recomendações do fabricante.

O cDNA obtido foi utilizado para avaliar a expressão e implicação da infecção pelo CHIKV e ZIKV em genes envolvidos com o neurodesenvolvimento. Para isso foi utilizado o sistema *TaqMan Gene Expression Assays* com a placa *Applied Biosystems® TaqMan® Array Human HOX Genes 96-well Plate*, seguindo as recomendações do fabricante. A placa é composta por 12 genes de controles endógenos e 84 de genes-alvo que estão envolvidos no controle da diferenciação e morfogênese do corpo humano. Na figura 16 está listada a identificação de cada gene, baseado no mapa da placa *TaqMan® Array Human HOX*.

Figura - 16 Desenho da placa *TaqMan® Array Human HOX*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	ACTB	B2M	RPLP0	HMBS	TBP	PGK1	UBC	PPA
B	ALX1	ALX4	ARX	BARX1	CDX1	CDX2	CUX1	DLX1	DLX2	DLX3	DLX4	DLX5
C	DLX6	DMBX1	DRGX	EMX1	EN1	EN2	HESX1	HHEX	HLX	HOPX	HOXA1	HOXA7
D	HOXA9	HOXB1	HOXB2	HOXB3	HOXB4	HOXB7	HOXB8	HOXB9	HOXC10	HOXC11	HOXC12	HOXC13
E	HOXC6	HOXC8	HOXC9	HOXD1	HOXD11	HOXD12	HOXD13	HOXD3	HOXD4	HOXD8	HOXD9	ISL1
F	ISL2	LBX1	LBX2	LHX1	LMX1A	LMX1B	MES1	MEOX1	MIXL1	MKX	MSX1	MSX2
G	NKX3-1	OTP	OTX1	OTX2	PAX3	PDHX	PHOX2B	PITX1	PITX2	PITX3	POU5F1,PO	PROP1
H	PROX1	SHOX	SHOX2	SIX1	SIX2	SIX3	SIX4	SIX6	TLX1	VAX1	VAX2	VSX1

Legenda: desenho da placa *Taqman Array Human HOX*. A linha A, refere-se aos genes constitutivos. As linhas de B à H, são referentes aos genes-alvo.

As análises da expressão dos genes HOX foi realizada por meio da expressão gênica relativa usando a análise por  $\Delta\Delta Ct$ . Para isso, foi calculado primeiramente o valor do  $\Delta Ct$  das amostras, que basicamente é a diferença entre o valor do Ct do gene-alvo e o Ct do gene endógeno, como exemplificado a seguir:

$$\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene endógeno}$$

Após obtidos os valores do  $\Delta Ct$  das amostras, tanto das neuroesferas na condição controle (tratadas com ATRA e BDNF), quanto das condições infectadas pelo CHIKV ou ZIKV foi realizado o cálculo de  $\Delta\Delta Ct$ , que por sua vez é obtido a partir

da diferença entre o  $\Delta\text{CT}$  do gene-alvo da condição infectada pelo  $\Delta\text{CT}$  da condição controle, como visto a seguir:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} (\text{Neuroesfera ATRA+BDNF+ CHIKV ou ZIKV}) - \Delta\text{CT} (\text{Neuroesfera ATRA+BDNF})$$

Posteriormente foi utilizada a fórmula  $2^{(-\Delta\Delta\text{CT})}$ , para a obtenção dos valores da expressão gênica relativa em *fold change* com aplicação de  $\text{Log}_2$ . Com estes dados foi gerado um mapa de calor (do inglês, *Heat map*) por meio do programa GraphPad Prism 8.0.2. A análise estatística também foi realizada por este programa, ao qual valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . O teste estatístico *Two-Way ANOVA* foi utilizado para avaliar a diferença entre os grupos experimentais e posteriormente foi utilizado o teste de comparação múltipla *Tukey's*.

O banco de dados de genes humanos, Gene Cards, foi utilizado para a identificação da função biológica dos genes amplificados por *Taqman Array Human HOX*.

### 5.18 Aspectos éticos

O estudo não necessitou de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos nem do Certificado de Licença do Comitê de Ética no uso de Animais, pois não utilizou de nenhum material proveniente de amostras humanas nem envolveu o uso de animais vertebrados.

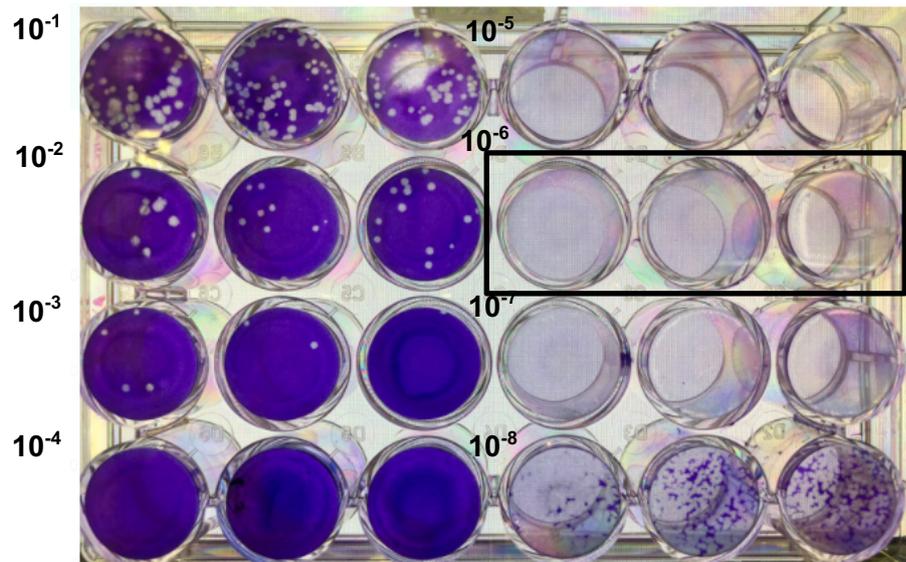
## 6. RESULTADOS

Os resultados obtidos mostram que células SH-SY5Y em monocamada se diferenciam pela indução de ATRA e BDNF, as células apresentaram extensões morfológicas (neuritos), quando comparadas com os controles. Após analisar a capacidade de diferenciação em monocamada foram realizados ensaios de otimização do cultivo 3D e a posterior diferenciação com ATRA e BDNF neste modelo de cultivo celular. Por meio de análises de RT-qPCR foi visto que o ATRA e o BDNF são capazes de induzir a diferenciação neuronal em neuroesferas. Para a infecção dessas estruturas, estoques virais foram obtidos e a partir dos títulos gerados, as neuroesferas passaram por processos de infecção por CHIKV ou ZIKV na etapa de diferenciação celular. Os resultados mostram que a cultura 3D gera estruturas capazes de receber estímulos externos que resultam em alterações da morfologia, do perfil inflamatório e da expressão gênica. Ao se analisar a resposta imunológica celular foi visto que tanto a infecção pelo ZIKV, quanto pelo CHIKV altera o perfil de citocinas inflamatórias e os vírus são capazes de influenciar na expressão de genes importantes para o neurodesenvolvimento, com aumento ou diminuição significativa dos seus níveis de expressão. Os dados a seguir mostram com detalhes estes resultados.

### 6. 1 Mensuração dos títulos virais obtidos

A titulação do estoque viral tanto para o CHIKV, quanto para o ZIKV foi realizada por meio do ensaio de placa, no qual placas de lise celular individualizadas e visíveis a olho nu foram contadas para a aplicação da fórmula, descrita anteriormente, com o intuito de obter o resultado expresso em PFU. Como observado a última diluição na qual foi possível a contagem de placas em todos os poços, para obtenção da média da triplicata, foi a diluição  $10^6$  (Figura 17). Após a aplicação da fórmula foi obtido o título de título  $4,5 \times 10^7$  PFU/mL.

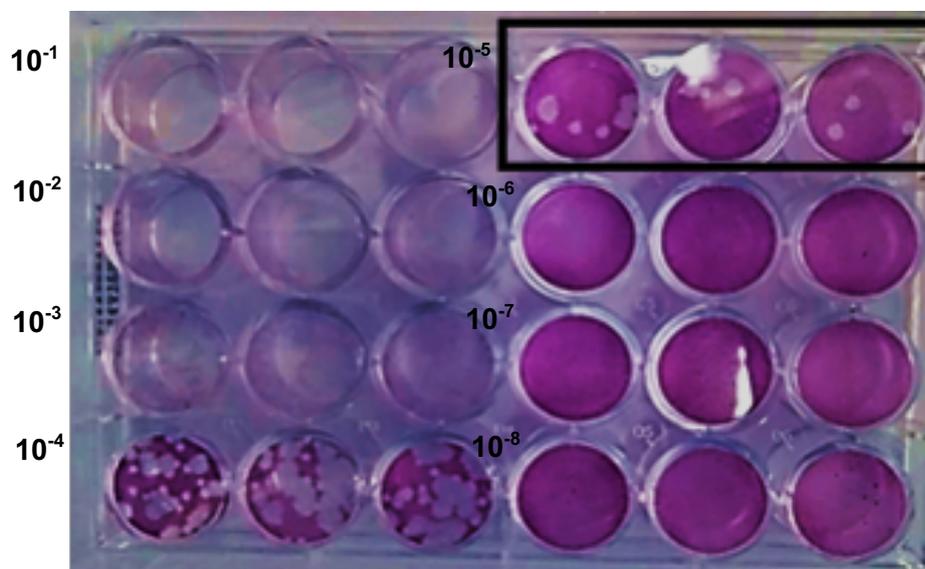
Figura 17 - Perfil da titulação por formação de placa (PFU) de CHIKV



Legenda: a placa mostra o padrão de infecção viral pelo CHIKV nas diferentes diluições da suspensão viral (desde  $10^{-1}$  até  $10^{-7}$ ). Como é possível observar no retângulo em preto, placas de lise celular foram obtidas na triplicata de diluição  $10^6$ .

A titulação do estoque viral do ZIKV foi realizada com o mesmo protocolo para CHIKV. Como pode ser observado na figura 18 a última diluição na qual foi possível a contagem de placas em todos os poços, para obtenção da média da triplicata, foi a diluição  $10^5$ . Após a aplicação da fórmula foi obtido o título de título  $21 \times 10^5$  PFU/mL.

Figura 18 - Perfil da titulação por formação de placa (PFU) de ZIKV



Legenda: a placa mostra o padrão de infecção viral pelo ZIKV nas diferentes diluições. Como é possível observar no retângulo em preto, placas de lise celular foram obtidas na triplicata de diluição  $10^5$ .

Tabela - 2 Informações dos títulos virais de CHIKV e ZIKV

	CHIKV	ZIKV
Cepa	CHIKV/H.sapiens/Brazil/PB302/2016	ZIKV/H.sapiens/Brazil/PE243/2015
Passagem	4 <sup>a</sup> passagem/48hpi	4 <sup>a</sup> passagem/96hpi
Título	45 x 10 <sup>6</sup> ou 4,5x10 <sup>7</sup> PFU/mL	21x10 <sup>5</sup> PFU/MI

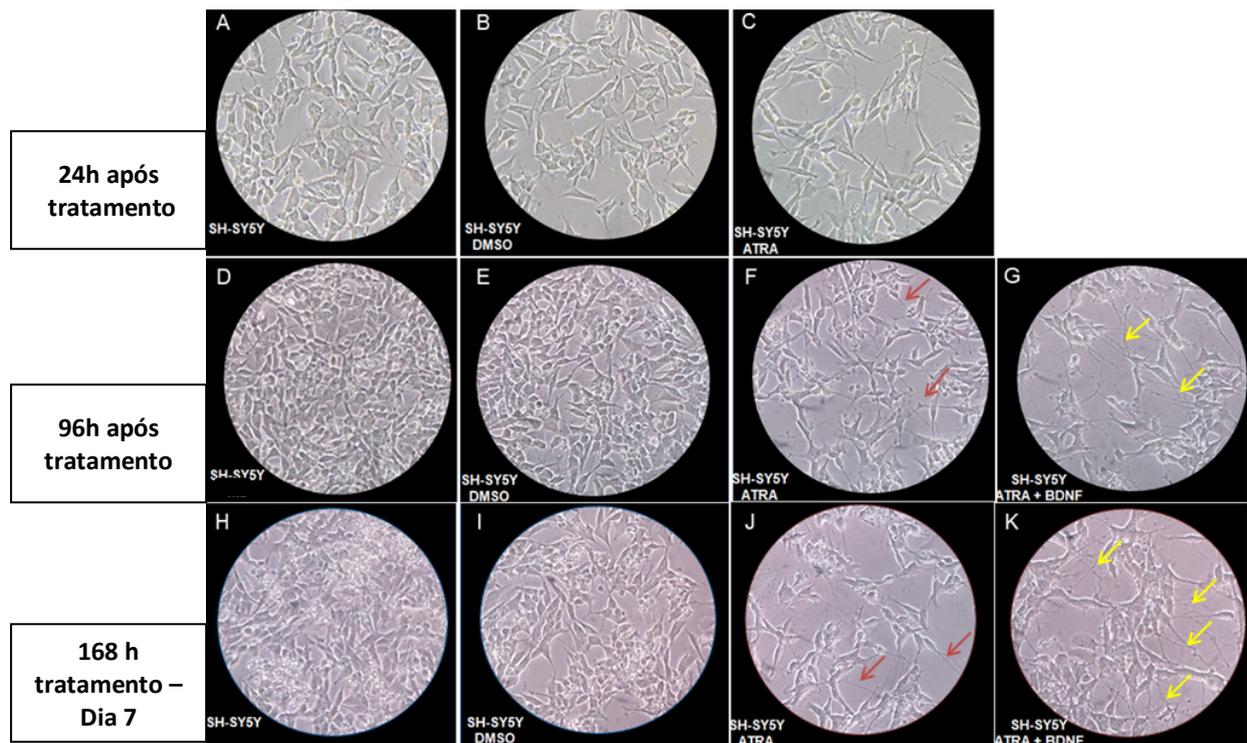
Legenda: a tabela apresenta as informações das cepas virais utilizadas e dos títulos obtidos.

O estoque viral obtido foi utilizado para os cálculos das multiplicidades de infecção (MOI) para os diferentes ensaios de infecção de neuroesferas.

## 6.2 Caracterização morfológica da diferenciação neuronal induzida por ATRA+BDNF

A diferenciação neuronal das células SH-SY5Y foi induzida por meio do tratamento com ATRA e sequencialmente com ATRA+BDNF. Para observar o comportamento da morfologia celular foram adotadas as seguintes condições como controle do experimento: células SH-SY5Y e células SH-SY5Y tratadas com DMSO (veículo de diluição do ATRA). Quando comparadas, células tratadas com ATRA em combinação com BDNF exibiram neuritos mais longos e ramificados em relação às células tratadas apenas com ATRA. Esse tratamento permitiu a indução da diferenciação morfológica (Figura 19).

Figura 19. Características morfológicas de células SH-SY5Y diferenciadas



Legenda: A, B e C indicam o registro fotográfico 24h após o início do tratamento das células SH-SY5Y. A, células SH-SY5Y. B, células tratadas com DMSO. C, células tratadas com ATRA. D, E, F e G representam 24h após o dia 4 do tratamento. D, células SH-SY5Y. E, células tratadas com DMSO. F, células tratadas com ATRA. G, células tratadas com ATRA e BDNF. H, I, J e K representam o último dia da diferenciação celular. H, células SH-SY-5Y. I células tratadas com DMSO. J, células tratadas com ATRA. K, células tratadas com ATRA e BDNF. As setas em vermelho mostram o desenvolvimento dos prolongamentos neurais em células tratadas apenas com ATRA. Setas em amarelo mostram uma maior extensão dos prolongamentos neurais em células tratadas com ATRA+BDNF.

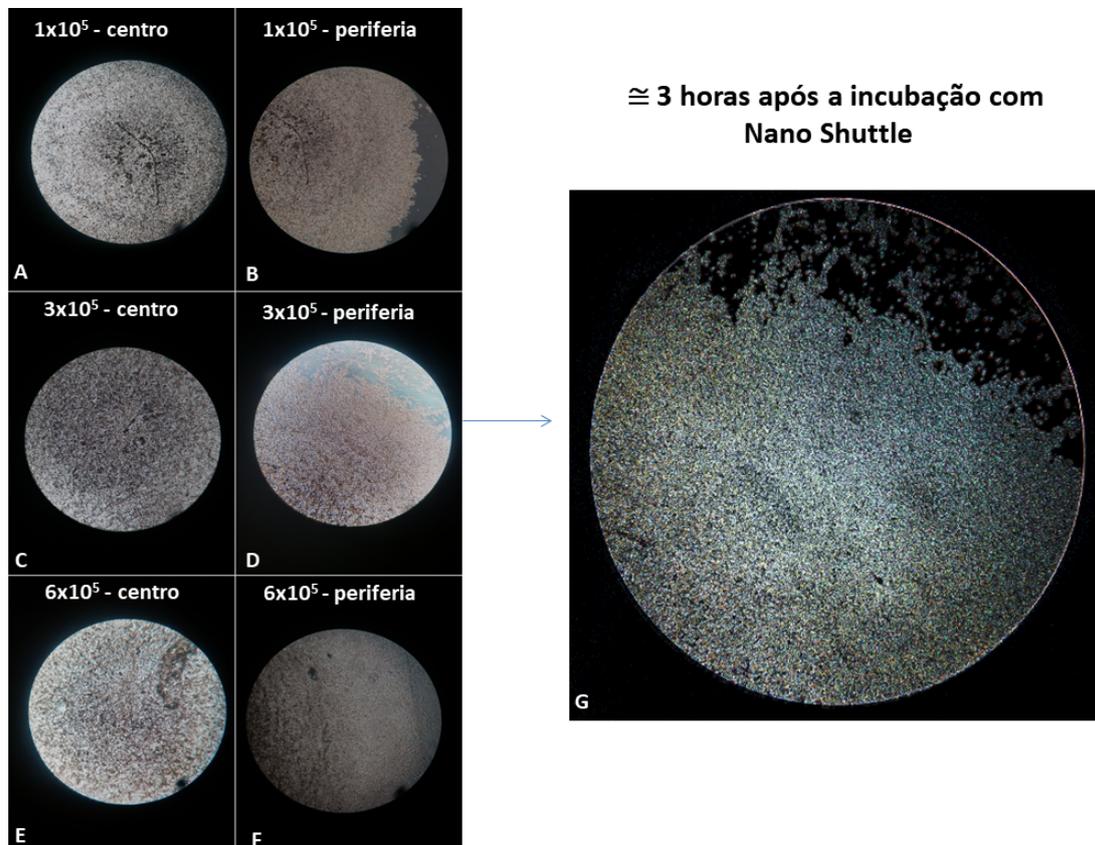
A padronização da diferenciação de SH-SY5Y em monocamada foi de suma importância para conhecimento do comportamento celular frente aos estímulos idealizados previamente para posteriores experimentos de diferenciação das neuroesferas (cultivo de SH-SY5Y em 3D).

### 6.3 Formação de estrutura tridimensional de células SH-SY5Y: neuroesferas

Com o intuito de otimizar o cultivo 3D de células de neuroblastoma (SH-SY5Y), foram utilizadas diferentes quantidades de células, a fim de analisar o comportamento do cultivo, quanto a sua estrutura organizacional, interação das células com as *beads*, e a formação de matriz extracelular. Observamos que independentemente do número de células, o cultivo 3D se mostrou eficaz, em termos de agregação celular com as

*beads Nano Shuttle* e a formação da estrutura se deu após aproximadamente 3 horas desde o início da incubação das *beads* com as células (Figura 20).

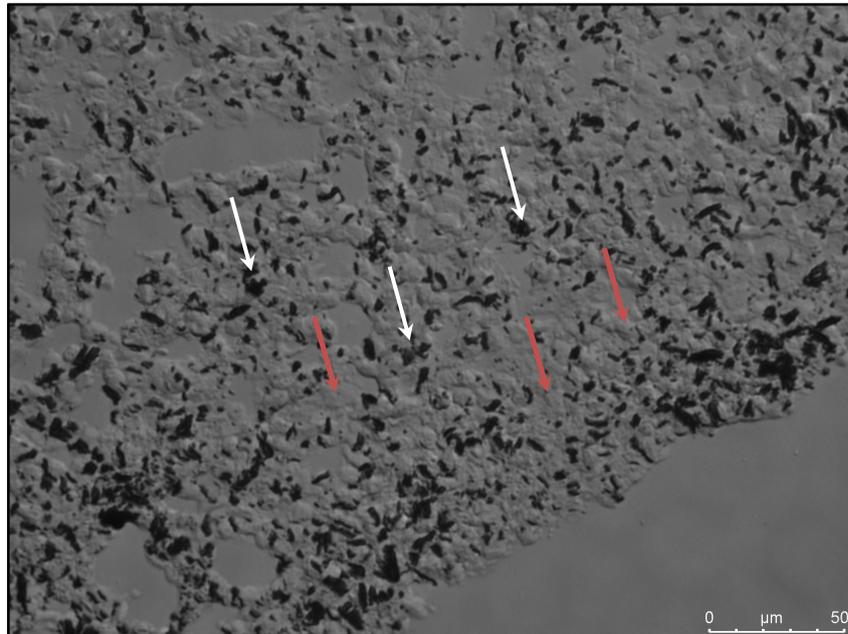
Figura 20 - Morfologia do cultivo tridimensional



Legenda: a ilustração apresenta o cultivo tridimensional, onde A, C e E ilustram o centro das neuroesferas com número de células diferentes, sendo  $1 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$  e  $6 \times 10^5$ , respectivamente. B, D e F, representam imagens da periferia das neuroesferas.

Após cortes histológicos das neuroesferas e visualização em microscópio de fluorescência no campo claro foi possível observar internamente a disposição entre as células e as *beads*. Como visto na figura 21 as *beads* (pontos em preto) interagiram uniformemente com as células (em cinza) por toda a estrutura 3D.

Figura 21 - Interação entre *beads* e células no cultivo 3D



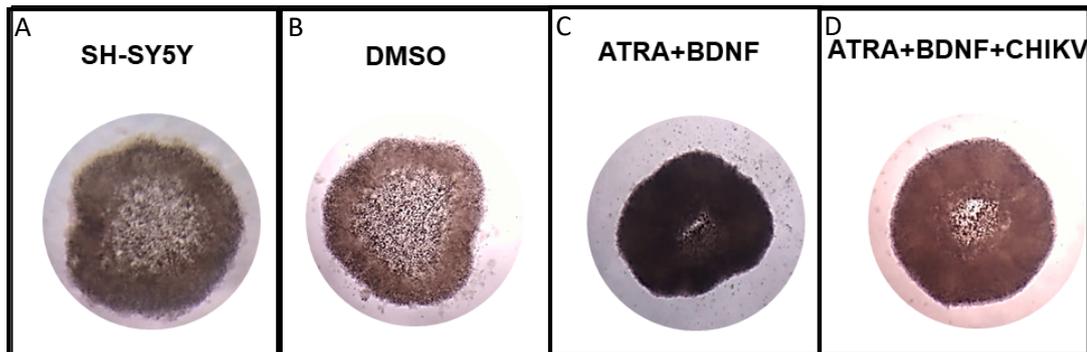
Legenda: neuroesfera com corte de 10 µm, os pontos em preto apontados pelas setas em branco representam as *beads* magnéticas. As setas em vermelho apontam para as estruturas celulares em cinza que foram incubadas com as células SH-SY5Y.

#### 6.4 Estrutura tridimensional de células SH-SY5Y diferenciadas e infectadas

Imagens representativas de neuroesferas SH-SY5Y, neuroesferas DMSO, neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e tratadas com ATRA+BDNF infectadas com CHIKV foram obtidas a fim de analisar o comportamento dos grupos de neuroesferas nas diferentes condições de tratamentos.

Existe uma diferença morfológica de acordo com cada condição na qual as neuroesferas foram submetidas (Figura 22). Foi observado uma dispersão celular em neuroesferas SH-SY5Y (não tratadas) quando comparadas com neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF. Essa observação pode indicar uma correlação com a diferenciação neuronal e agregação celular. Não foi observada alteração relevante entre neuroesferas SH-SY5Y e as neuroesferas SH-SY5Y tratadas com DMSO. A morfologia das neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e infectadas com CHIKV se assemelha mais com as neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF.

Figura 22 - Diferenças morfológicas de neuroesferas com diferentes tratamentos



Legenda: a figura mostra imagens de neuroesferas com aumento de 20X no campo claro de microscopia óptica em diferentes condições de cultivo. A, neuroesferas de SH-SY5Y sem nenhum tratamento. B, neuroesferas de SH-SY5Y tratadas com DMSO. C, neuroesferas de SH-SY5Y tratadas com ATRA+BDNF. D, neuroesferas de SH-SY5Y tratadas com ATRA+BDNF e infectada com CHIKV.

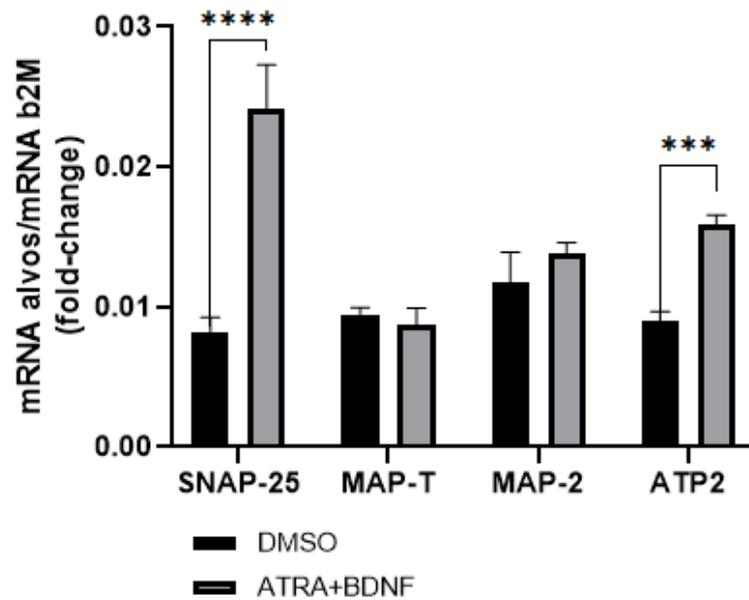
A análise da diferenciação neuronal também foi realizada por meio da avaliação de marcadores envolvidos com a maturação de neurônios em processos de desenvolvimento.

### 6.5 Expressão de marcadores da diferenciação neuronal

A análise dos marcadores de diferenciação neuronal foi realizada pela expressão dos seguintes marcadores: *SNAP-25*, *ATP2A2*, *MAP-T* e *MAP-2*.

As neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF apresentaram níveis de expressão significativamente maiores para o mRNA de *SNAP-25* ( $p=0,0001$ ), em comparação com neuroesferas tratadas com DMSO (controle do teste). Também foi visto, níveis de expressão significativamente maiores para o mRNA de *ATP2A2* ( $p=0,0002$ ) em neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF. Com relação aos níveis de expressão de mRNA de *MAP-T* e *MAP-2* não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre DMSO x ATRA+BDNF (Gráfico 1). Estes dados mostram que neuroesferas são capazes de se diferenciar pela indução de ATRA e BDNF.

Gráfico 1 - expressão dos mRNAs para análise de diferenciação de neuroesferas

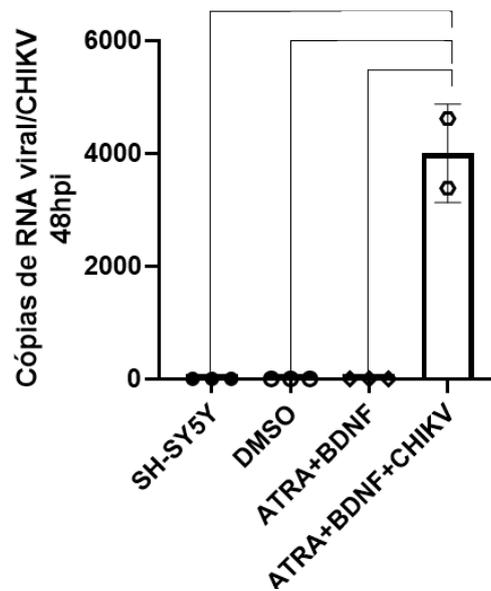


Legenda: o gráfico mostra a expressão dos mRNAs dos alvos escolhidos para avaliar a diferenciação celular de neuroesferas. As barras em preto representam neuroesferas tratadas com DMSO. As barras em cinza representam as neuroesferas tratadas (ATRA+BDNF).

## 6.6 Quantificação das cópias de RNA viral em neuroesferas infectadas com CHIKV

Quanto a análise da infecção viral em neuroesferas infectadas pelo CHIKV foram obtidos valores estatisticamente significativos entre os grupos analisados, dentre eles: SH-SY5Y vs. ATRA+BDNF+CHIKV; DMSO vs. ATRA+BDNF+CHIKV e ATRA+BDNF vs. ATRA+BDNF+CHIKV apresentaram  $p=0,0005$  (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Cópias de RNA viral



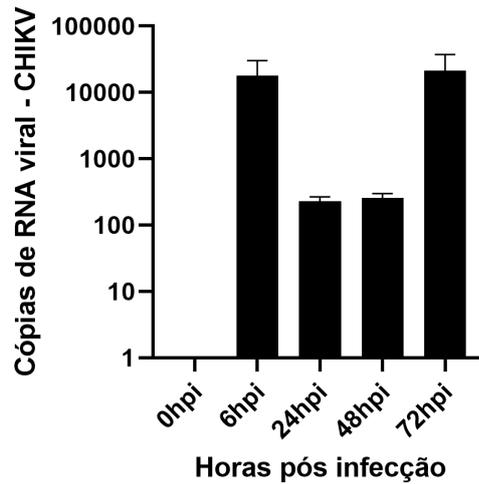
Legenda: Quantificação das cópias de RNA viral do CHIKV detectado por RT-qPCR em sobrenadantes de neuroesferas em processo de diferenciação celular e infectadas com MOI de 1.

Neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e infectadas com CHIKV foram avaliadas quanto a apoptose desencadeada pela infecção.

### 6.7 Aumento da carga viral de CHIKV ao longo do tempo de infecção

Foi visto um aumento na carga viral de CHIKV em neuroesferas infectadas a partir de 6 hpi. No tempo de 24 hpi houve uma redução da carga viral que permaneceu reduzida até 48hpi. Ao chegar em 72hpi a carga viral teve um novo aumento, como pode ser visto no gráfico 3.

Gráfico 3 - Cópias de RNA viral ao longo do tempo de infecção



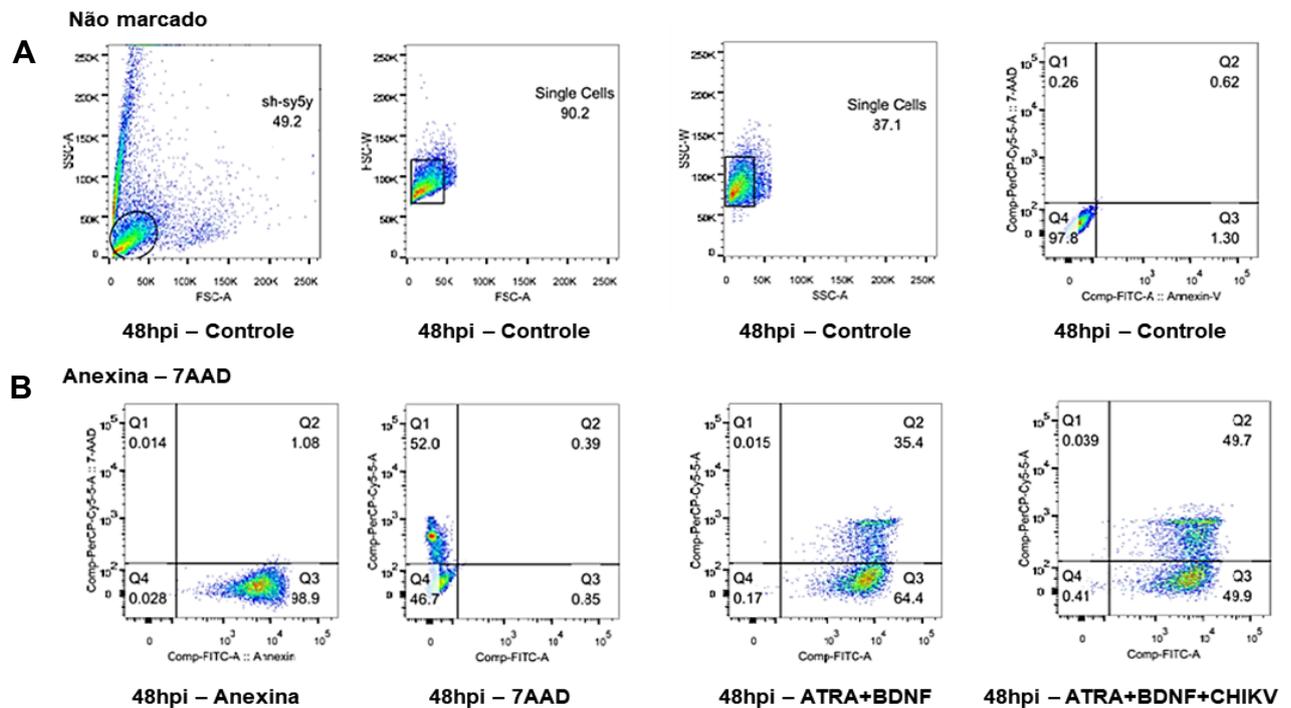
Legenda: Gráfico de barras indicando a média e desvio padrão da quantificação do RNA viral do CHIKV detectado em sobrenadantes de neuroesferas em processo de diferenciação celular ao longo do tempo de infecção.

### 6.8 Avaliação do perfil de morte celular em neuroesferas infectadas por CHIKV

O percentual de morte celular foi quantificado em neuroesferas infectadas por CHIKV, na qual células PE Anexina V e 7-AAD positivas indicam a porcentagem de células apoptóticas e necróticas (Figura 23).

A detecção do percentual de morte celular em neuroesferas diferenciadas com ATRA-BDNF e infectadas com CHIKV, MOI de 1, se deu 48h pós infecção e apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0048$ ) entre os valores percentuais de células infectadas e células não infectadas, ambas diferenciadas com ATRA-BDNF e marcadas com 7-AAD (7-aminoactinomicyn D) e Anexina V-FITC (Gráfico 4).

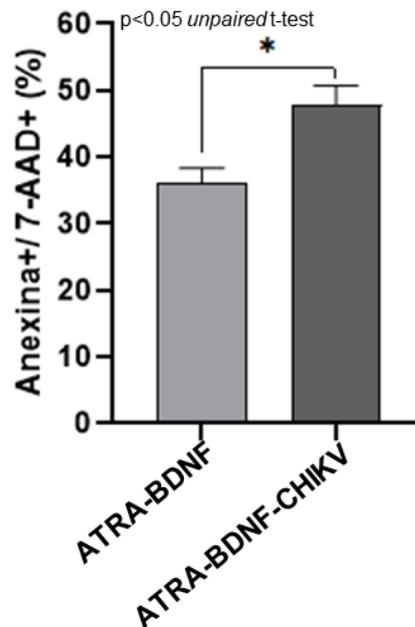
Figura 23 - Células apoptóticas e necróticas



Legenda: populações de células provenientes de neuroesferas dissociadas, as populações celulares estão destacadas por *gates*. A, tem-se células não marcadas com anexina-7AAD, sendo essa condição utilizada como controle do experimento. B, mostra populações de células marcadas apenas com anexina e 7AAD separadamente, seguida das marcações em neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e infectadas com CHIKV.

Os resultados foram expressos em porcentagens de células anexina V e 7-AAD positivas (células apoptóticas e necróticas). Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando o  $p < 0,05$ . Para essa análise foi adotado o teste  $t$  não pareado que compara as médias entre dois grupos independentes para determinar a diferença significativa entre ambos.

Gráfico 4 - Porcentagem de células apoptóticas em neuroesferas infectadas



Legenda: análise estatística indicando por meio de (\*) diferença significativa entre as neuroesferas tratadas com ATRA-BDNF e as tratadas com ATRA-BDNF e infectadas com CHIKV.

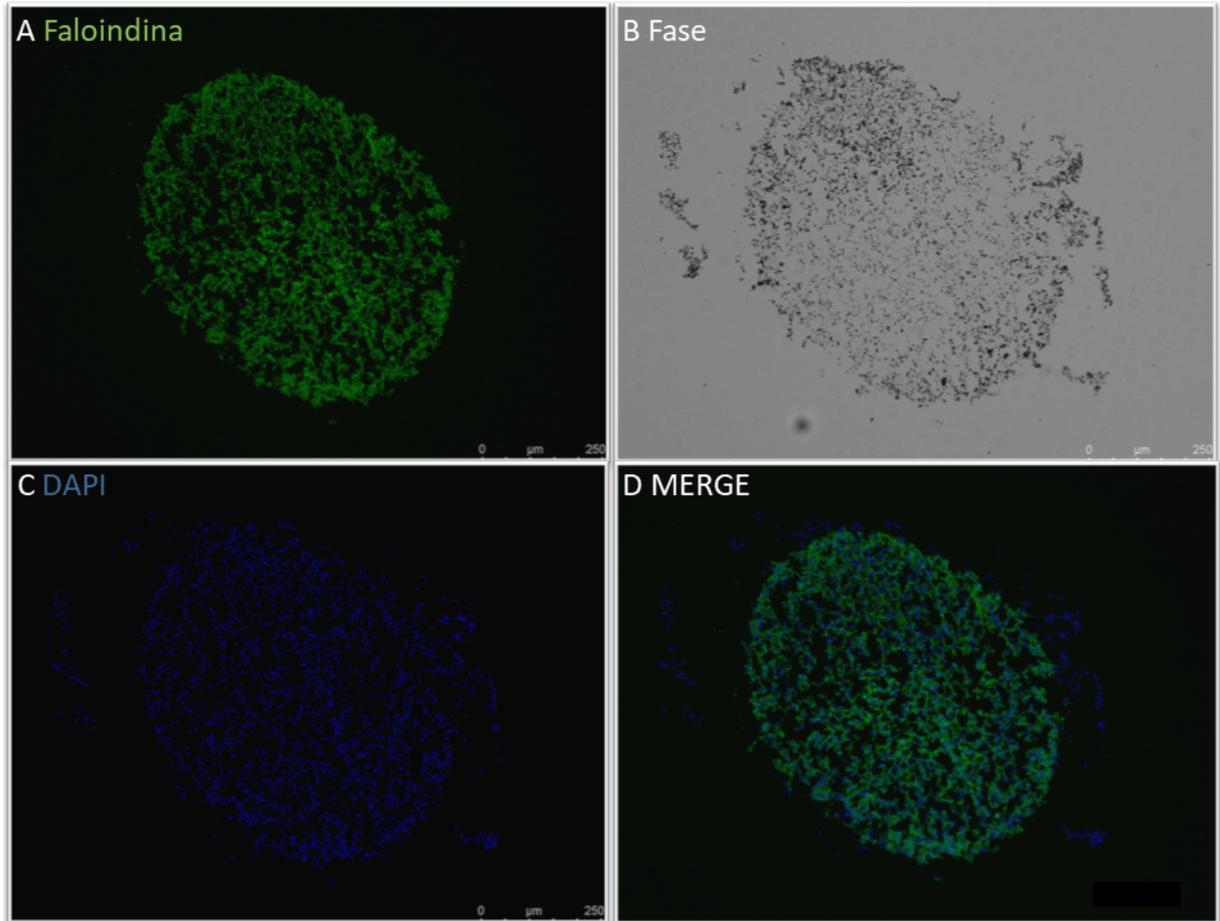
## 6.9 Imunohistoquímica de neuroesferas marcadas com Faloidina

A fim de melhor compreender a estrutura de filamentos celulares em neuroesferas após 7 dias de cultivo (tempo final da diferenciação celular) foi analisada a marcação de actina filamentosa (F-actina).

Sabe-se que a actina desempenha um papel significativo na plasticidade e estabilidade sináptica. Regiões ricas em actina auxiliam na função neuronal, pois os neurônios dependem do transporte intracelular para o desempenho de atividades cruciais a sua manutenção, como a migração celular e transporte de neurotransmissores. Esse mecanismo de transporte celular é mediado por diversas estruturas do citoesqueleto, com relevância para os filamentos de actina (VENKATESH; MATHEW; KOUSHIKA, 2020).

Foi visto por meio de microscopia de fluorescência aspectos íntegros da estrutura 3D em cortes histológicos de neuroesferas marcadas com Alexa Fluor 488® *phalloidin* e DAPI (Figura 24). Indicando uma reorganização tridimensional do citoesqueleto celular nesse tipo de cultivo.

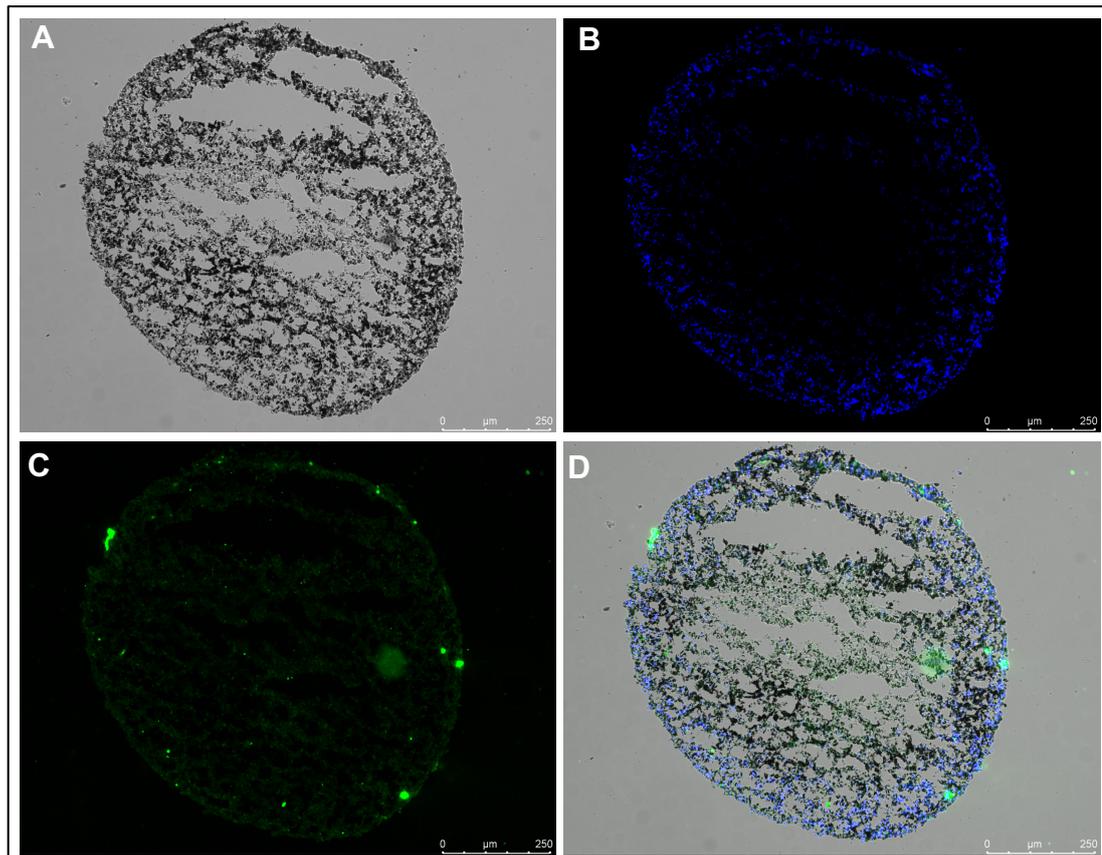
Figura 24- Marcação de Faloidina em neuroesferas



Legenda: A imagem mostra cortes histológicos de neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF no último dia do processo de diferenciação celular. A, marcação de faloidina. B, estrutura vista no campo de luz branca. C, DAPI. D, Merge, da faloidina com DAPI. As imagens mostram aspectos morfológicos íntegros.

Neuroesferas infectadas com CHIKV também passaram por processos de cortes por meio do criostato a fim de analisar a distribuição de partículas virais na extensão das estruturas 3D (Figura 25). A figura mostra a estrutura da neuroesfera em campo claro, apresentando a interação das *beads* com as células, apresenta a marcação nuclear por meio do DAPI e também a presença de partículas virais na extensão da neuroesfera quando marcadas com anti-CHIKV. É possível observar com detalhes a marcação viral com o aumento da magnificação da imagem (Figura 26).

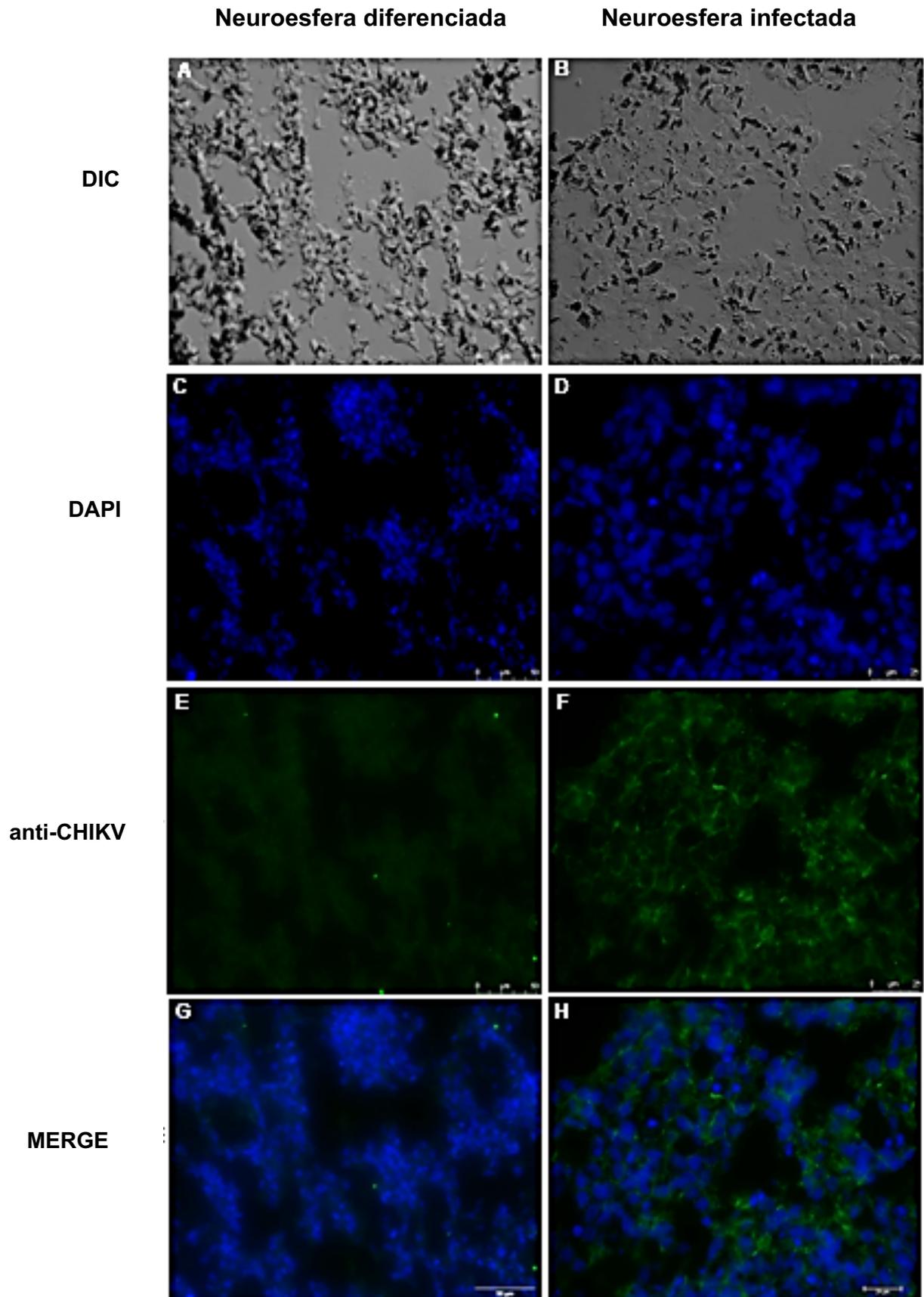
Figura 25 - Marcação de anti-CHIKV em neuroesferas infectadas



Legenda: as imagens mostram cortes histológicos de neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e infectadas com CHIKV 48hpi no último dia do processo de diferenciação celular. A, estrutura vista no campo de luz branca. B, DAPI. C, anti-CHIKV, e D, sobreposição do DAPI, anti-CHIKV e campo claro.

O aumento da magnificação da imagem com a marcação com anti-CHIKV pode ser visto na figura 26.

Figura 26 - Marcação de anti-CHIKV em neuroesferas

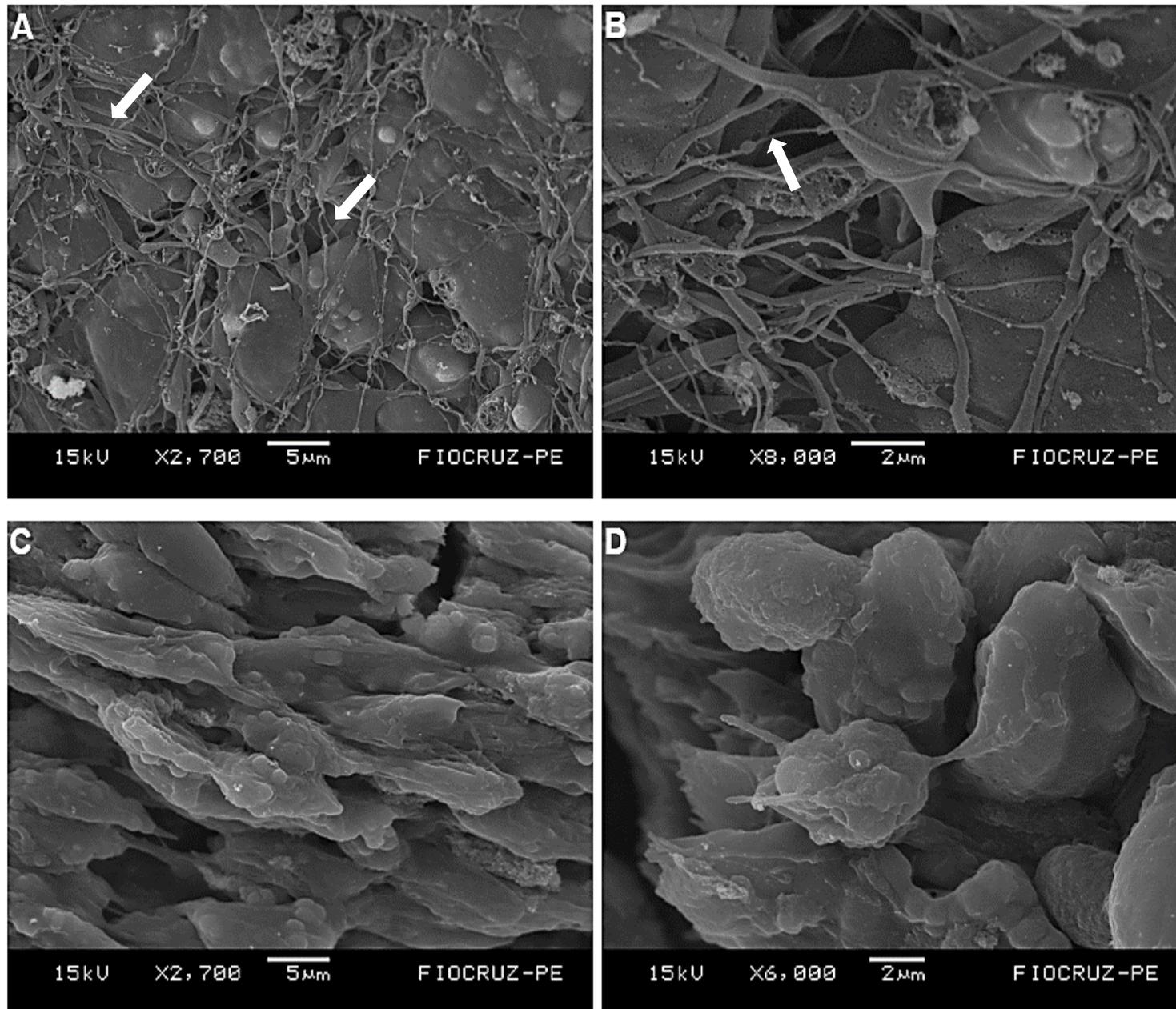


Legenda: imagem ampliada da marcação com anti-CHIKV em neuroesfera infectada. Em A, é visto o DIC (do inglês, *Differential Interference Contrast*), em B é visto a marcação nuclear com DAPI. C, marcação com anti-CHIKV e em D, a sobreposição entre a marcação do DAPI e do anti-CHIKV.

### **6.10 Neuroesferas infectadas com CHIKV apresentam alterações morfológicas**

A fim de melhor observar o comportamento celular das neuroesferas nas condições de indução da diferenciação celular e na condição de infecção pelo CHIKV, as mesmas foram analisadas morfológicamente por microscopia eletrônica de varredura. Neuroesfera diferenciada possui em sua superfície prolongamentos celulares típicos de neurônios maduros, enquanto que neuroesferas infectadas por CHIKV perdem essa característica morfológica de diferenciação celular (figura 27).

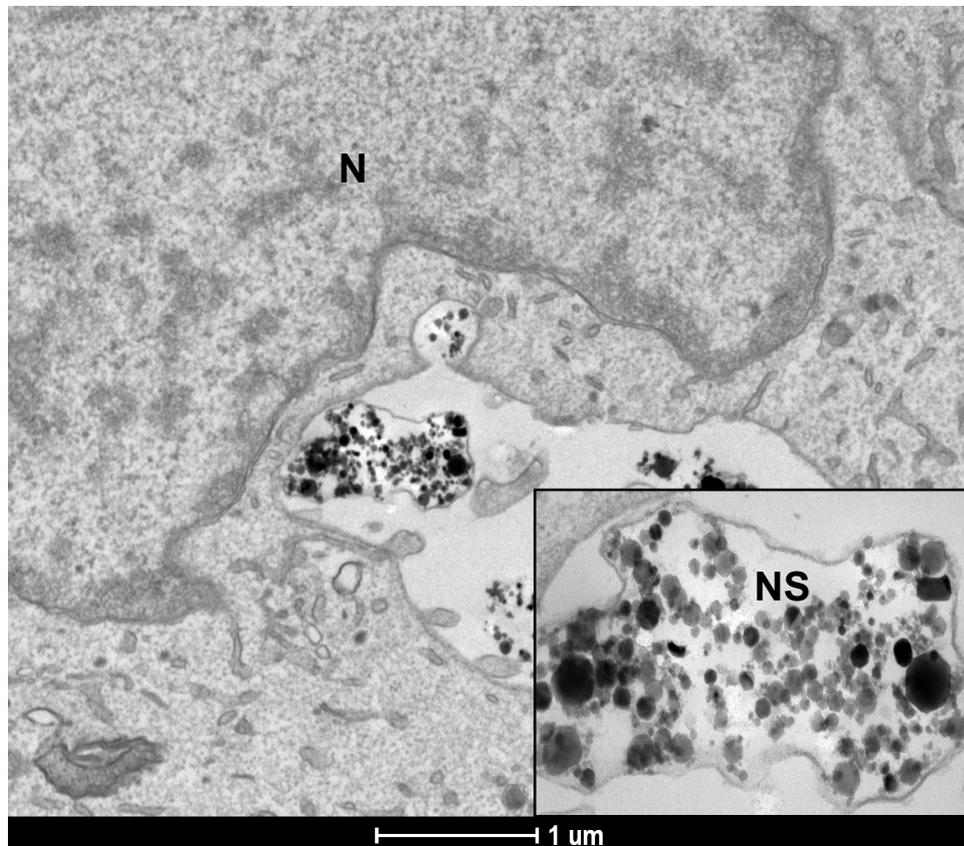
Figura 27 – Alteração morfológica de neuroesferas infectadas por CHIKV



Legenda: as imagens obtidas por MEV mostram a superfície de neuroesferas diferenciadas e neuroesferas infectadas por CHIKV. A e B correspondem a neuroesferas diferenciadas, é possível observar a presença de prolongamentos neurais (setas brancas), característicos de neurônios maduros, em B tem o aumento da magnificação da imagem da neuroesfera diferenciada. C e D correspondem a superfície de neuroesferas infectas por CHIKV, não são vistos prolongamentos celulares quando comparados com as neuroesferas diferenciadas.

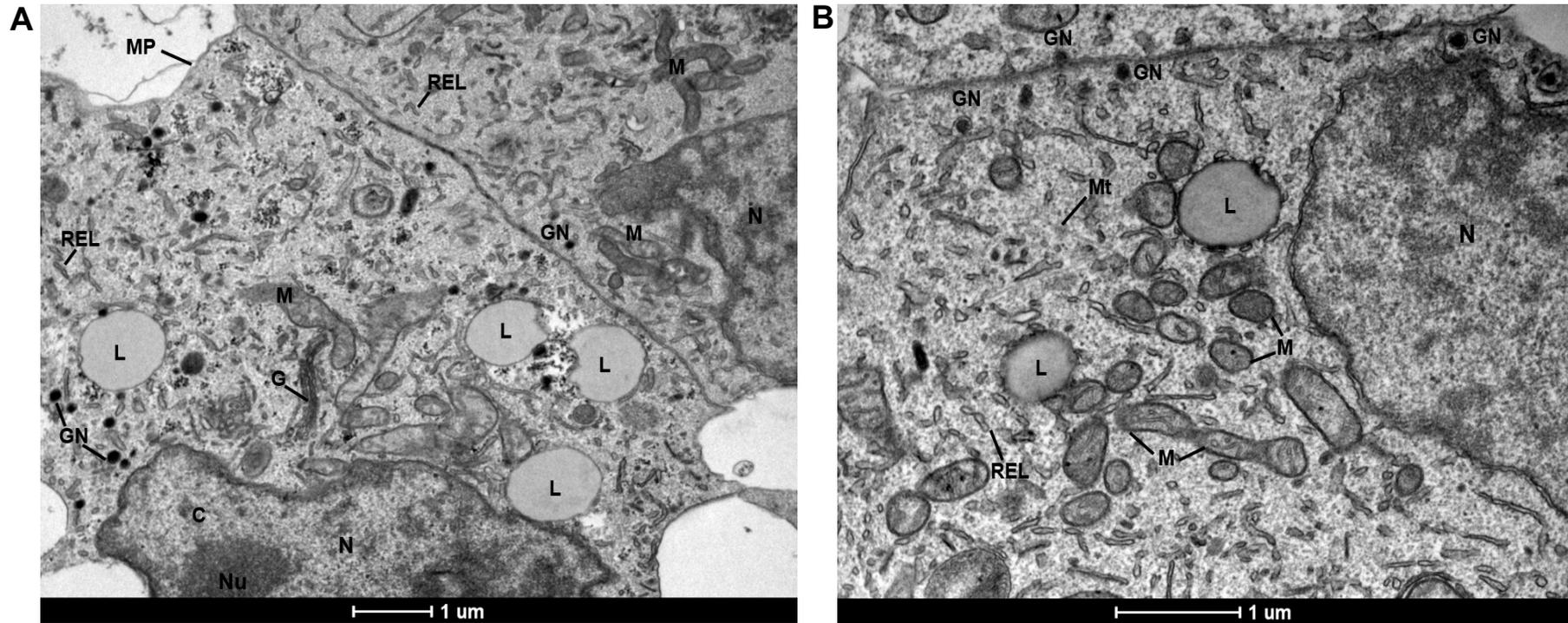
Ao se analisar a ultraestrutura por MET de neuroesferas foi possível observar a interação celular com as *beads* magnéticas (figura 28). Como pode ser visto na figura 29, neuroesferas sem ser infectadas pelo CHIKV continuam com características e organelas com aparência preservadas, dentre elas foram identificadas: núcleo, membrana plasmática, mitocôndrias, lipídios, retículo endoplasmático liso, microtúbulo e grânulos neurosecretórios. É possível observar a interação entre duas células com características preservadas (Figura 28, A).

Figura 28 - Interação entre *beads* e células em neuroesfera



Legenda: na imagem são mostradas *beads* magnéticas interagindo com as células SH-SY5Y. Essa interação é fundamental para a estruturação das neuroesferas.

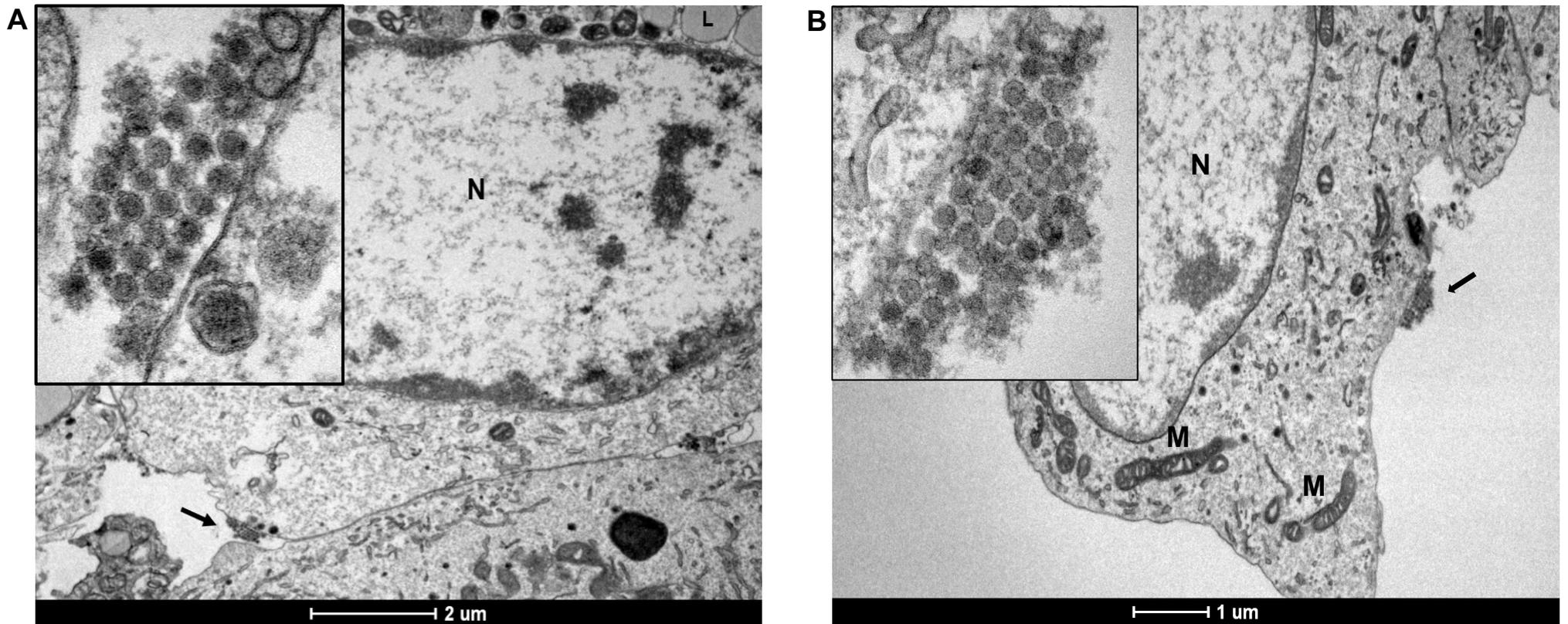
Figura 29– Análise da ultraestrutura de neuroesferas diferenciadas



Legenda: as imagens obtidas por meio de MET mostram seções de neuroesferas diferenciadas. Em A e B é possível observar a preservação de estruturas celulares. As estruturas estão identificadas por suas respectivas abreviações: MP (Membrana Plasmática), N (Núcleo), Nu (Nucléolo), C (Carioteca), L (Lipídio), REL (Retículo Endoplasmático Liso), M (Mitocôndria), Mt (microtúbulos), GN (Grânulos Neurosecretórios).

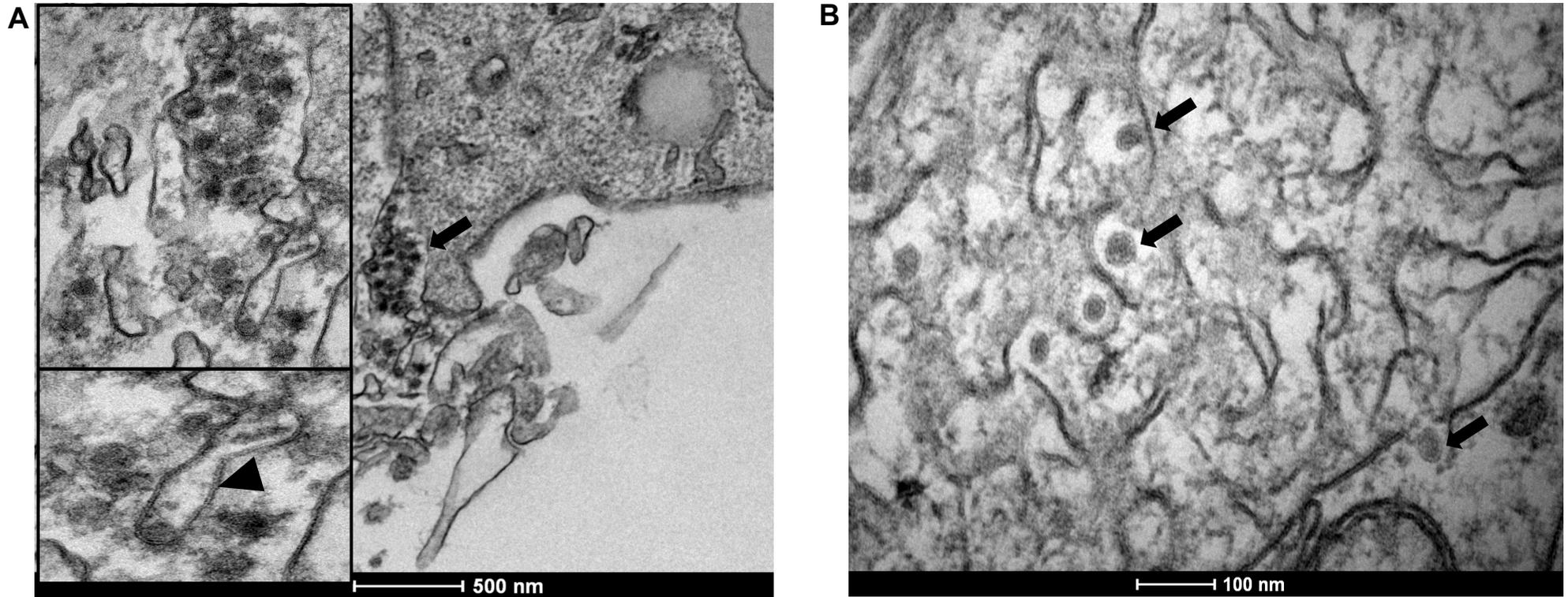
Em neuroesferas infectadas pelo CHIKV foram vistas várias partículas virais organizadas na superfície citoplasmática (figura 30). A replicação viral ficou evidente, pois várias partículas virais foram observadas agrupadas tanto na superfície celular, quanto em regiões intercelulares (figura 31). Essas figuras mostram as partículas virais como estruturas esféricas. Algumas das células infectadas apresentaram a presença de aglomerados de glicogênio (Figura, A e B), também foi visto nessas células, aglomerados de gotículas de lipídios (Figura 32, C e D) e também a presença de mitocôndrias com cristas eletrodensas (Figura 32, C).

Figura 30 – Análise da ultraestrutura de neuroesferas infectadas por CHIKV



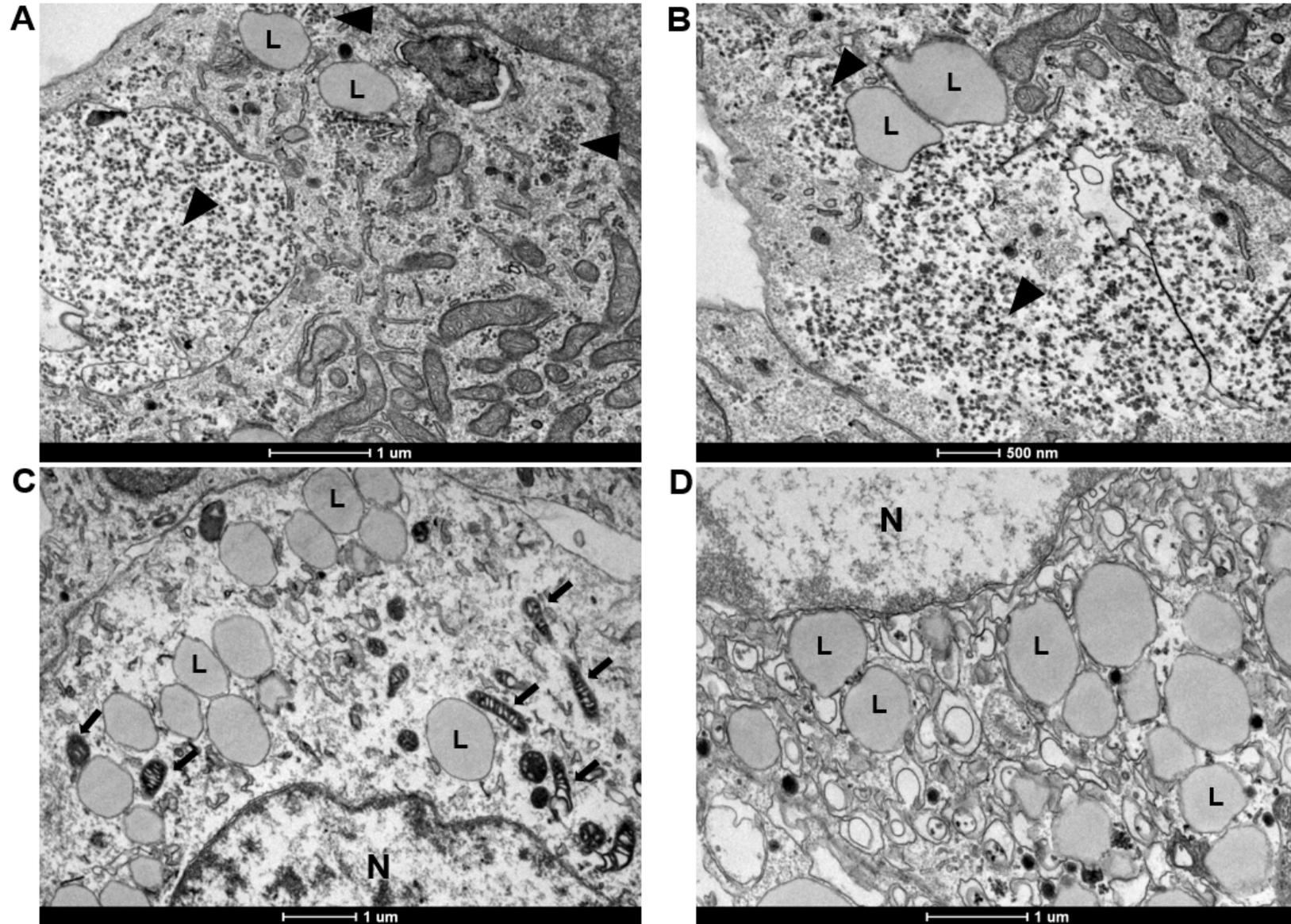
Legenda: as imagens obtidas por meio de MET mostram seções de neuroesferas infectadas por CHIKV no processo de diferenciação celular. As setas apontam a interação entre os vírus com a membrana plasmática de células hospedeiras. Os retângulos do lado superior esquerdo de cada imagem mostram os vírus em aumento da magnificação da imagem. O núcleo (N) em A e B apresenta característica de degradação, estando com visíveis lacunas no lugar da carioteca. Em B é possível observar mitocôndrias (M) com características de danos celular.

Figura 31 – Interação de partículas virais de CHIKV com membranas das células hospedeiras



Legenda: as imagens em A e B mostram partículas virais interagindo no interior das células hospedeiras. As setas apontam os locais de interação e os retângulos do lado esquerdo das imagens mostram o aumento da magnificação das estruturas celulares e das partículas virais. Em A, a ponta da seta mostra a interação de uma partícula viral com compartimentos internos da célula.

Figura 32 – Presença de clusters de glicogênio e lipídios em neuroesferas infectadas por CHIKV



Legenda: foi possível observar em várias seções de neuroesferas infectadas a presença de aglomerados de glicogênio que podem ser vistos em A e B, estas estruturas estão sinalizadas pelas pontas de setas. Em C, são observados aglomerados de lipídios e mitocôndrias com características de matriz densa. Em D também são observados aglomerados lipídicos.

### **6.11 Perfil de citocinas inflamatórias em neuroesferas**

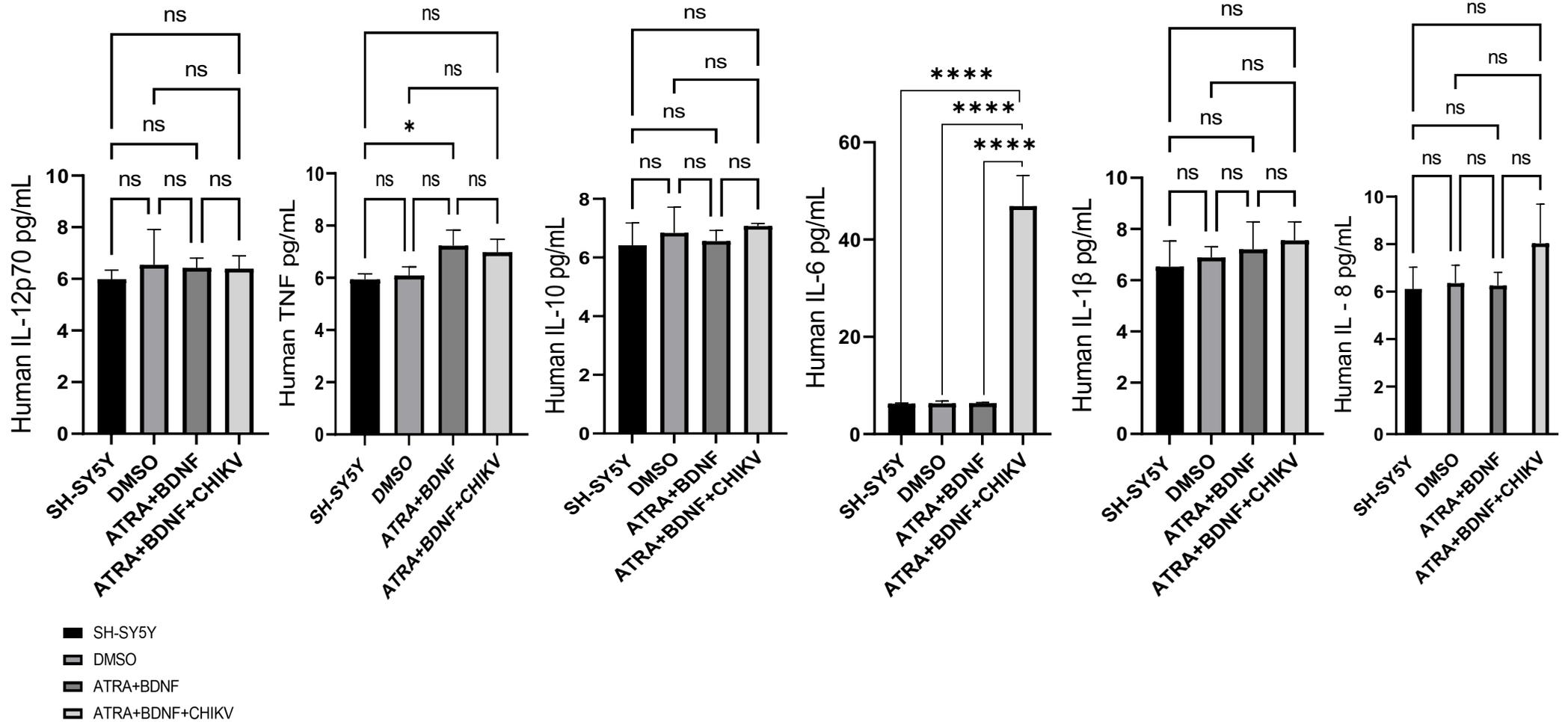
Para analisar o perfil inflamatório em neuroesferas infectadas pelo CHIKV ou ZIKV foram dosadas as seguintes citocinas inflamatórias: interleucina-8 (IL-8), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-12p70 (IL-12p70). Para este experimento foram necessárias condições de tratamentos distintas para as neuroesferas. Como controle dos experimentos foram utilizadas neuroesferas sem nenhum tratamento (SH-SY5Y), tratadas com DMSO e neuroesferas tratadas com ATRA e BDNF. As condições de infecção foram nomeadas como ATRA+BDNF+CHIKV para as infectadas por CHIKV ou ATRA+BDNF+ZIKV para as infectadas por ZIKV.

Tanto as neuroesferas infectadas com CHIKV (gráfico 5), quanto infectadas com ZIKV (gráfico 6) em fase final da diferenciação tiveram níveis aumentados de IL-6 com valores estatisticamente significativos, com  $p < 0,05$  quando comparados com as condições controle do experimento (SH-SY5Y, DMSO e ATRA+BDNF). A infecção pelo ZIKV também aumentou os níveis de IL-8 com valores estatisticamente significativos, com  $p < 0,05$  quando comparados com as condições controle. No experimento relacionado à infecção pelo CHIKV foi visto níveis aumentados de TNF em neuroesferas diferenciadas (ATRA+BDNF) quando comparadas com neuroesferas SH-SY5Y (sem tratamento) e tiveram valores estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Não foram observados valores estatisticamente significativos para os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12p70 entre as condições controle e as condições de infecção.

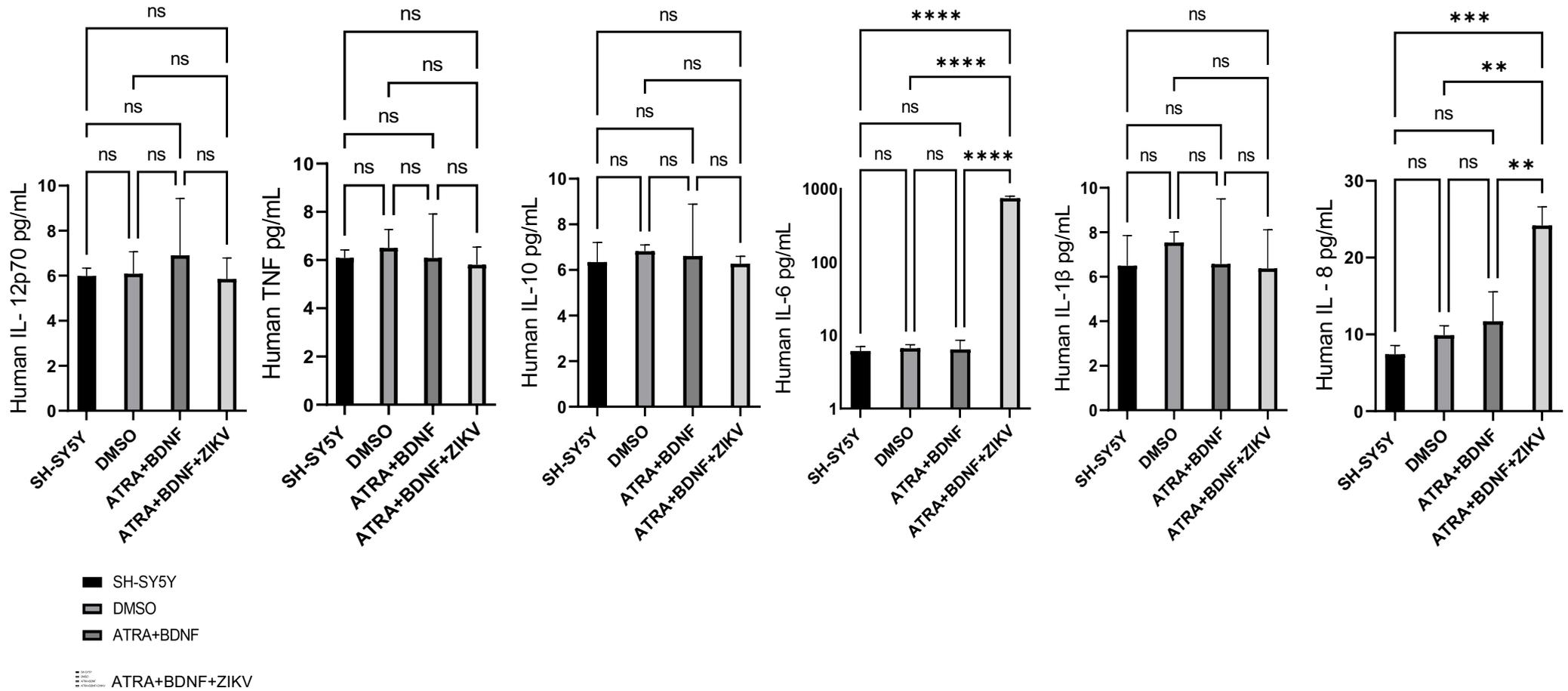
Esses achados revelam que a infecção tanto pelo CHIKV, quanto pelo ZIKV é capaz de ativar o perfil inflamatório em neuroesferas infectadas, em contrapartida as condições de tratamento utilizadas para o controle não interferem na ativação do perfil inflamatório de citocinas.

Gráfico 5 - Níveis de citocinas inflamatórias em neuroesferas infectadas com CHIKV



Legenda: os gráficos representam níveis de citocinas inflamatórias em neuroesferas nas condições controle, sem nenhum tratamento (SH-SY5Y), tratadas com DMSO, tratadas com ATRA e BDNF e infectadas por CHIKV (ATRA+BDNF+CHIKV). O (\*) representa valores estatisticamente significativos e ns, significa não significativo, após análise pelo GraphPad Prism 8.0.2.

Gráfico 6 - Níveis de citocinas inflamatórias em neuroesferas infectadas com ZIKV



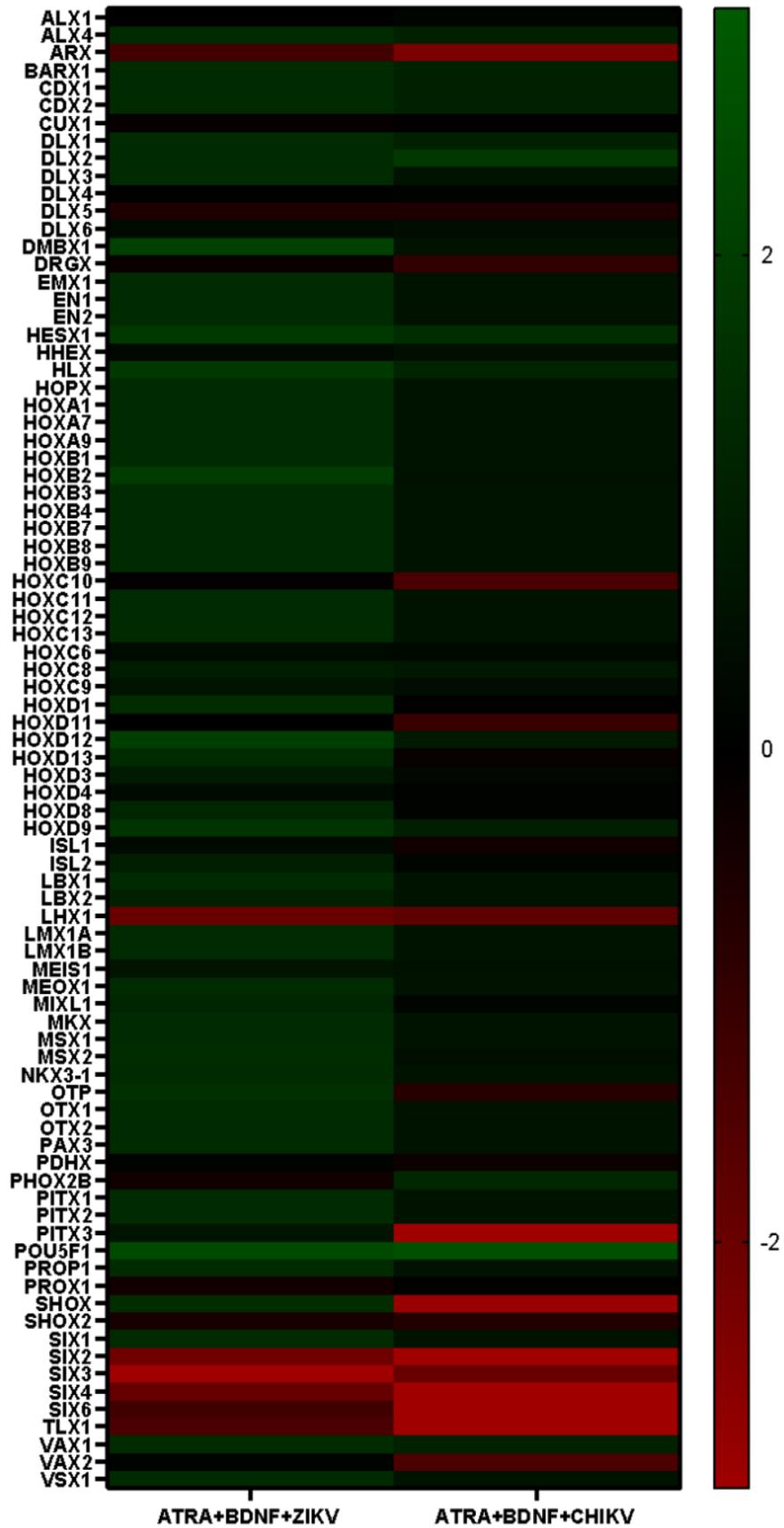
Legenda: os gráficos representam níveis de citocinas inflamatórias em neuroesferas nas condições controle, sem nenhum tratamento (SH-SY5Y), tratadas com DMSO, tratadas com ATRA e BDNF e infectadas por ZIKV (ATRA+BDNF+ZIKV). O (\*) representa valores estatisticamente significativos e ns, significa não significativo, após análise pelo GraphPad Prism 8.0.2.

## 6.12 Análise da Expressão gênica dos genes HOX

Foi avaliada a expressão de genes envolvidos em processos da morfogênese, incluindo aqueles que estão relacionados com o neurodesenvolvimento e se o processo de infecção por ZIKV ou CHIKV altera a expressão desses genes. Os resultados foram obtidos por meio da expressão gênica relativa, que determina a diferença de vezes da expressão do gene alvo em uma amostra teste (infectada) em relação a uma amostra referência (ATRA+BDNF), normalizada por genes endógenos.

Valores de *fold change* com  $\text{Log}_2$  foram gerados e serviram para a construção de um *heat map* (Figura 33) que mostra a distribuição dos níveis de expressão obtidos. O *heat map* apresentado em gradiente duplo (cor verde e vermelha) mostra que valores entre 0 valores negativos a partir de -2 (representado em vermelho) são genes que se apresentaram mais *down* regulados pela infecção de ZIKV ou CHIKV em comparação com o controle (neuroesfera ATRA+BDNF), já valores positivos a partir de 1 (representado em verde) são genes que se apresentaram mais *up* regulados em comparação com o controle.

Figura 33 – Heat map da expressão gênica relativa dos genes HOX



Legenda: o *heatmap* apresenta genes regulados positivamente e genes regulados negativamente de acordo com cada infecção viral (ZIKV ou CHIKV) comparadas com o controle.

Tabela 3 – Regulação da expressão gênica dos genes HOX em neuroesferas infectadas por ZIKV ou CHIKV

Gene	Regulação da expressão gênica - ZIKV	Regulação da expressão gênica - CHIKV	Função biológica	Banco de Dados <i>GeneCards</i>
<i>ARX</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição necessário para o desenvolvimento cerebral normal. Importante para a manutenção neuronal	<a href="#">ARX Gene - GeneCards</a>   <a href="#">de proteína ARX</a>   <a href="#">Anticorpo ARX</a>
<i>SIX3</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Atua na proliferação e diferenciação de células progenitoras neurais	<a href="#">SIX3 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">SIX3 Protein</a>   <a href="#">SIX3 Antibody</a>
<i>LHX1</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição potencial. Pode desempenhar um papel na formação na diferenciação lateral do mesoderme e neurogênese.	<a href="#">LHX1 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">LHX1 Protein</a>   <a href="#">LHX1 Antibody</a>
<i>SIX6</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Expresso na região hipotalâmica	<a href="#">SIX6 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">SIX6 Protein</a>   <a href="#">SIX6 Antibody</a>
<i>SIX4</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Regulador transcricional que pode atuar como repressor e ativador transcricional e está envolvido em processos como diferenciação celular, migração celular e sobrevivência celular.	<a href="#">SIX4 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">SIX4 Protein</a>   <a href="#">SIX4 Antibody</a>
<i>DRGX</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição necessário para a formação de projeções corretas de neurônios	<a href="#">DRGX Gene - GeneCards</a>   <a href="#">DRGX Protein</a>   <a href="#">DRGX Antibody</a>
<i>PROX1</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição envolvido em processos de desenvolvimento como determinação do destino celular, regulação transcricional genética e regulação de células progenitoras em vários órgãos. Regulador chave na neurogênese.	<a href="#">PROX1 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">PROX1 Protein</a>   <a href="#">PROX1 Antibody</a>

<i>DLX5</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Promove a proliferação celular	<a href="#">DLX5 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">DLX5 Protein</a>   <a href="#">DLX5 Antibody</a>
<i>PHOX2B</i>	<i>down</i> regulado	<i>up</i> regulado	Envolvido no desenvolvimento de várias grandes populações de neurônios. Fator de transcrição que poderia determinar um fenótipo neurotransmissor em vertebrados.	<a href="#">PHOX2B Gene - GeneCards</a>   <a href="#">PHOX2B Protein</a>   <a href="#">PHOX2B Antibody</a>
<i>SIX2</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Desempenha um papel importante no desenvolvimento de vários órgãos, incluindo o crânio	<a href="#">SIX2 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">SIX2 Protein</a>   <a href="#">SIX2 Antibody</a>
<i>ISL1</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Envolvido na especificação dos neurônios motores.	<a href="#">ISL1 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">ISL1 Protein</a>   <a href="#">ISL1 Antibody</a>
<i>SHOX2</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Pode ser um regulador de crescimento e ter um papel na especificação de sistemas neurais envolvidos no processamento de informações somatossensoriais.	<a href="#">SHOX2 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">SHOX2 Protein</a>   <a href="#">SHOX2 Antibody</a>
<i>HOXC10</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição específico de sequência que faz parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXC10 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXC10 Protein</a>   <a href="#">HXC10 Antibody</a>
<i>DMBX1</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Funciona como um repressor transcricional	<a href="#">Gene DMBX1 - GeneCards</a>   <a href="#">de proteína DMBX1 Anticorpo DMBX1</a>
<i>PDHX</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Necessário para ancorar dihidrolipoamida desidrogenase (E3) ao núcleo dihidrolipoamida transacetylase (E2) dos complexos de desidrogenase piruvato de eucariotes.	<a href="#">PDHX Gene - GeneCards</a>   <a href="#">ODPX Protein</a>   <a href="#">ODPX Antibody</a>
<i>HOXD13</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior (Por similaridade).	<a href="#">HOXD13 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXD13 Protein</a>   <a href="#">HXD13 Antibody</a>
<i>CUX1</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição envolvido no controle da diferenciação neuronal no cérebro.	<a href="#">CUX1 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">CUX1 Protein</a>   <a href="#">CUX1 Antibody</a>



<i>OTP</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Provavelmente envolvido na diferenciação de células neuroendócrinas	<a href="#">Gene OTP - GeneCards</a>   <a href="#">de proteína OTP</a> <a href="#">Anticorpo OTP</a>
<i>HOXD12</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Faz parte do sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXD12 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXD12 Protein</a>   <a href="#">HXD12 Antibody</a>
<i>MSX2</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Pode desempenhar um papel na formação de membros-padrão.	<a href="#">MSX2 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">MSX2 Protein</a>   <a href="#">MSX2 Antibody</a>
<i>HOXD9</i>	<i>up</i> regulado	<i>up</i> regulado	Sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais	<a href="#">HOXD9 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXD9 Protein</a>   <a href="#">HXD9 Antibody</a>
<i>SHOX</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Controla aspectos fundamentais de crescimento e desenvolvimento.	<a href="#">Gene SHOX - GeneCards</a>   <a href="#">de proteína SHOX</a> <a href="#">Anticorpo SHOX</a>
<i>MIXL1</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição que desempenha um papel central na adequada mesoderme morfogênese e formação de endoderme.	<a href="#">MIXL1 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">MIXL1 Protein</a>   <a href="#">MIXL1 Antibody</a>
<i>POU5F1</i>	<i>up</i> regulado	<i>up</i> regulado	Crítico para a embriogênese precoce	<a href="#">POU5F1 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">PO5F1 Protein</a>   <a href="#">PO5F1 Antibody</a>
<i>HOXD11</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição específico de sequência que faz parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXD11 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXD11 Protein</a>   <a href="#">HXD11 Antibody</a>
<i>HLX</i>	<i>up</i> regulado	<i>up</i> regulado	Envolvido em embriogênese e hematopoiese (por similaridade).	<a href="#">HLX Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HLX Protein</a>   <a href="#">HLX Antibody</a>

<i>HOXB2</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição específico de sequência que faz parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">Gene HOXB2 - GeneCards</a>   <a href="#">de proteína HXB2 Anticorpo HXB2</a>
<i>HESX1</i>	<i>up</i> regulado	<i>up</i> regulado	Possível repressor transcricional.	<a href="#">HESX1 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HESX1 Protein</a>   <a href="#">HESX1 Antibody</a>
<i>HOXC8</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fornecer às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXC8 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXC8 Protein</a>   <a href="#">HXC8 Antibody</a>
<i>HOPX</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Proteína homeodoma atípica que não une DNA e é necessária para modular o crescimento e o desenvolvimento cardíaco.	<a href="#">HOPX Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HOP Protein</a>   <a href="#">HOP Antibody</a>
<i>HOXC13</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição que desempenha um papel na diferenciação do folículo piloso.	<a href="#">HOXC13 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXC13 Protein</a>   <a href="#">HXC13 Antibody</a>
<i>DLX6</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Homólogo menos distal de Drosophila, gene de codificação de domínio homeo, expresso em cérebro e esqueleto.	<a href="#">DLX6 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">DLX6 Protein</a>   <a href="#">DLX6 Antibody</a>
<i>HOXC6</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição específico de sequência que faz parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXC6 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXC6 Protein</a>   <a href="#">HXC6 Antibody</a>
<i>LBX2</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição.	<a href="#">LBX2 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">LBX2 Protein</a>   <a href="#">LBX2 Antibody</a>
<i>HOXD3</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição específico de sequência que faz parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXD3 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXD3 Protein</a>   <a href="#">HXD3 Antibody</a>

<i>DRGX</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição necessário para a formação de projeções corretas de neurônios sensoriais.	<a href="#">DRGX Gene - GeneCards</a>   <a href="#">DRGX Protein</a>   <a href="#">DRGX Antibody</a>
<i>HOXC9</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição específico de sequência que faz parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXC9 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXC9 Protein</a>   <a href="#">HXC9 Antibody</a>
<i>ISL2</i>	<i>down</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator transcricional que define subclasses de motoneurônios que se segregam em colunas na medula espinhal.	<a href="#">ISL2 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">ISL2 Protein</a>   <a href="#">ISL2 Antibody</a>
<i>HOXD8</i>	<i>up</i> regulado	<i>down</i> regulado	Fator de transcrição específico de sequência que faz parte de um sistema regulatório de desenvolvimento que fornece às células identidades posicionais específicas no eixo anterior-posterior.	<a href="#">HOXD8 Gene - GeneCards</a>   <a href="#">HXD8 Protein</a>   <a href="#">HXD8 Antibody</a>

Legenda: a tabela apresenta os valores de expressão gênica relativa de cada gene correspondente a condição de neuroesferas infectadas por CHIKV ou ZIKV. Na quarta coluna da tabela estão listadas as funções biológicas de cada gene obtidas por meio do banco de dados *Gene Cards*.

Os padrões de expressão de alguns genes mudaram para positivo (*up* regulados) ou negativo (*down* regulado) a depender da infecção pelo ZIKV ou CHIKV (Tabela 3). Genes envolvidos em processos do neurodesenvolvimento, como *ARX*, *SIX2*, *SIX3*, *SIX4*, *SIX6*, *DRGX*, *PROX1*, *ISL1*, *SHOX2*, *CUX1*, *ALX1* e *VAX2*, apresentaram regulação negativa para ZIKV e CHIKV. O gene *PHOX2B* envolvido no desenvolvimento de vários tipos de neurônios se mostrou *down* regulado para ZIKV e *up* regulado para CHIKV, demonstrando que a infecção pelo ZIKV inibe a sua expressão, frente à infecção por CHIKV. O gene *DLX2* e *POU5F1* foram *up* regulados nas duas condições de infecção. No entanto, os genes *OTP*, *HOXD1*, *DMBX1*, *MIXL1*, *HOXC3*, *HOXD13* e *HOXD12* só apresentaram *up* regulação na condição de infecção pelo ZIKV.

Apesar de alguns genes ter alteração na sua expressão não foram todos que apresentaram valores estatisticamente significativos. O gene *ARX* se apresentou *down* regulado para ambos os vírus, no entanto apenas para CHIKV o valor de *p* foi significativo  $p=0,0005$ . *ARX* possui múltiplas funções no desenvolvimento, incluindo regulação do ciclo celular e especificação migração/destino de precursores neuronais. O mesmo aconteceu para o gene *VAX2*, que apesar de *down* regulado para ambos os vírus, o valor estatisticamente significativo foi visto apenas para a infecção por CHIKV ( $p= 0,0472$ ).

O gene *LHX1* se apresentou *down* regulado para ambos os vírus, com valores estatisticamente significativos, sendo para ZIKV ( $p= 0,0035$ ) e para CHIKV ( $p= 0,0136$ ). *LHX1* desempenha um papel importante na diferenciação do tecido morfogenético no desenvolvimento da cabeça e diferenciação neuronal. O gene *PITX3* se apresentou *down* regulado para ambos os vírus, mas com valores estatisticamente significativos apenas para o CHIKV ( $<0,0001$ ). *PITX3* desempenha um papel importante na diferenciação e manutenção dos neurônios durante o desenvolvimento.

O gene *DMBX1* apresentou-se *up* regulado na infecção pelo ZIKV, com valores estatisticamente significativos ( $p= 0,0016$ ). O *DMBX1* é expresso nos tecidos neuronais durante os períodos embrionários e pós-natais. O gene *OTP* apresentou-se *up* regulado na condição de infecção pelo ZIKV, com valor de  $p= 0,0297$ . *HLX* também se apresentou *up* regulado na infecção por ZIKV ( $p= 0,0158$ ).

Os genes *SIX2*, *SIX3*, *SIX4* e *SIX6*, apresentaram-se *down* regulados para ambos os vírus, com valores estatisticamente significativos para ZIKV (*SIX2*,  $p=$

0,0016; *SIX3*  $p < 0,0001$ ; *SIX4*,  $p = 0,0136$  e *SIX6*,  $p = 0,1087$ ) e para CHIKV (*SIX2*,  $p < 0,0001$ ; *SIX3*  $p = 0,0035$ ; *SIX4*,  $p < 0,0001$  e *SIX6*,  $p < 0,0001$ ). Estes genes atuam no neurodesenvolvimento, sendo necessários para a formação neuronal. O gene *POU5F1*, também conhecido como *OCT4* foi *up* regulado para ZIKV e CHIKV, com valores de  $p$  significativos,  $p = 0,0002$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente.

## 7 DISCUSSÃO

O estudo da neuropatogênese causada pelo ZIKV ficou em evidência quando a sua infecção foi associada com manifestações neurológicas graves como a microcefalia em recém-nascidos. Desde então, diversos estudos buscaram compreender os mecanismos moleculares que o vírus utiliza. A transmissão transplacentar do Zika pode resultar na propagação do vírus em células progenitoras neurais humanas levando à alteração de sinalização e vias imunológicas nas células hospedeiras, o que interfere no percurso da neurogênese, interrompendo o ciclo celular e gerando morte neuronal (FAIZAN, 2016).

A epidemia de 2015 do CHIKV trouxe um novo olhar para a infecção por esse vírus, ao contrário do que tinha sido observado nos alphavirus encefalíticos, o CHIKV não era caracterizado por atingir as células endoteliais dos microvasos do cérebro ou infectar neurônios do SNC em humanos. No entanto, o surgimento de complicações neurológicas em epidemias do CHIKV indicou o neurotropismo por esse vírus. O ressurgimento de novos surtos epidêmicos pelo CHIKV permitiu uma associação mais eficaz de várias doenças neurológicas relacionadas com a sua infecção (MATUSALI et al., 2019). Desse modo vários estudos buscam melhor compreender os danos provocados pela infecção do CHIKV nos diversos tipos de células neurais. A inoculação intracerebral do CHIKV em camundongos mostrou a localização do vírus em astrócitos e neurônios (CHIAM et al., 2015). No entanto são poucos os estudos que utilizam neurônios de linhagem humana para a investigação da infecção pelo CHIKV.

Células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) são bastante utilizadas na neurobiologia, apresentando resultados consistentes na investigação de doenças neurodegenerativas (DE MEDEIROS et al., 2019). Dentre os estudos que fizeram uso de SH-SY5Y, estão os relacionados com infecções virais. O ZIKV infecta eficientemente células SH-SY5Y resultando em alterações na viabilidade celular, citotoxicidade e morfologia (Natthanej, 2017). O uso de SH-SY5Y também pode ser aplicado a outros vírus, como o CHIKV. Um recente estudo fez uso de células de neuroblastomas (SK-N-MC) humanos para avaliar o potencial antiviral de substâncias contra o CHIKV, destacando a eficácia dessas células na investigação dos mecanismos da infecção por CHIKV (FRANCO et al., 2021).

O cultivo tridimensional recapitula características relevantes da organização celular que ocorre *in vivo* como a interação célula a célula com a automontagem celular, por meio de diversas técnicas. A cultura 3D fornece diversas possibilidades de estudos com células de diferentes origens (YLOSTALO, 2020). Então métodos de cultivo bidimensional (monocamada) vêm sendo aprimorados para a obtenção de técnicas de culturas 3D cada vez mais complexas, e muitas vezes utilizadas como alternativas ao uso de animais (JENSEN; TENG, 2020). A cultura 3D tornou-se uma técnica de destaque no estudo de desordens neurológicas, inclusive mimetizando aspectos relevantes da microcefalia. Estudos com cultura 3D de células neurais elucidaram aspectos antes desconhecidos da neurogênese durante o desenvolvimento do cérebro (GABRIEL et al., 2020).

As neuroesferas se mostraram eficazes e suscetíveis à infecção pelo CHIKV e CHIKV, aspectos imunológicos e moleculares, no que se diz respeito à expressão de genes do neurodesenvolvimento puderam ser investigados no presente trabalho. Cabe mencionar a importância da diferenciação neuronal no processo de formação da estrutura 3D realizada no presente estudo. A diferenciação de células SH-SY5Y em monocamada é bastante utilizada por meio do uso dos indutores de diferenciação neuronal ATRA e BDNF. Um dos trabalhos pioneiros da diferenciação de neuroblastomas foi o estudo de Encinas, et al., 2000 (ENCINAS et al., 2000). Estudos subsequentes aprimoram a diferenciação das células SH-SY5Y e mostraram a importância dessa técnica para a investigação de doenças complexas do SNC (ILLENDULA; FULTANG; PEETHAMBARAN, 2020; LOPES et al., 2010)

A diferenciação neuronal ocorre por meio da ativação de cascata de fatores de transcrição que atuam em progenitores neuronais que fundamentam a identidade funcional dos mais diversos tipos de neurônios (MAREK; KURTZ; SPITZER, 2010). O estudo de Encinas e colaboradores mostrou o aumento dos níveis de marcação por imunofluorescência de *MAPT* e *MAP2* em células de neuroblastoma diferenciadas com ATRA+BDNF (ENCINAS et al., 2000).

No presente estudo ao avaliar a expressão gênica não foram tidos níveis de expressão estatisticamente significativos para *MAPT* e *MAP2* em células diferenciadas quando comparadas com células não-diferenciadas. Esses achados corroboram com o estudo de Jahn e colaboradores, 2017, no qual ao diferenciar células SH-SY5Y com ATRA e BDNF e avaliar a expressão de mRNA *MAPT* e *MAP2*, não obtiveram valores significativos entre células diferenciadas e não diferenciadas. Em

contrapartida ao analisar *MAPT* e *MAP2* por imunofluorescência foi visto por Jahn um aumento da intensidade da fluorescência entre células indiferenciadas e diferenciadas, assim como foi visto por Encinas. O estudo de Kirsten relata a grande importância da característica morfológica de células SH-SY5Y diferenciadas, revelando ser um aspecto relevante e que indica o sucesso da diferenciação celular (JAHN et al., 2017).

No nosso trabalho ficou evidente a formação de neuritos decorrentes da diferenciação celular em células tratadas com ATRA+BDNF. Foi observado também o aumento da expressão do mRNA de *SNAP-25* em células diferenciadas. O *SNAP-25* é uma proteína associada ao sinaptossoma de 25 kDa e está envolvida no processo de liberação de neurotransmissores durante a transmissão sináptica, pois interage diretamente com canais de cálcio, regulando a dinâmica do cálcio intracelular e transporte de neurotransmissores. A redução de *SNAP-25* afeta diferentes neurônios, principalmente no que se diz respeito à transmissão sináptica (ANTONUCCI et al., 2016).

A funcionalidade do sistema nervoso de vertebrados é estabelecida no período embrionário, e continua a se adaptar ao longo da vida. Quanto mais maduros, mais neuritos são formados, em um processo conhecido como neuritogênese. Após a formação de extensos neuritos mudanças adicionais e novas funções são atribuídas ao neurônio, como uma dinâmica mais intensa da transmissão sináptica. Com isso, a membrana neuronal é um elemento chave para o tráfego de várias substâncias na comunicação entre neurônios. Proteínas do complexo SNARE (do inglês, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors*), no qual a *SNAP-25* faz parte, estão envolvidas de forma crítica na sinapse, morfologia e na expansão neuronal durante a neuritogênese (CORTNEY CHELISE. GUPTON, 2016). Neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF expressam *SNAP-25* em relação a neuroesferas não tratadas, sendo indicativo da função dessas substâncias na comunicação entre neurônios e desenvolvimento dos mesmos.

O mRNA de *ATPA2*, também teve sua expressão aumentada em neuroesferas diferenciadas, quando comparadas com as não diferenciadas. O *ATPA2* (ATPase 2) é uma enzima dependente de magnésio, que participa da bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana do retículo endoplasmático e é importante para sinalização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . O retículo endoplasmático é uma organela abundantemente presente em neurônios, incluindo o corpo celular, dendritos e terminais de axônio. Os íons cálcio

atuam regulando a sinalização celular, sendo fundamentais para processos celulares importantes para a sobrevivência e função neuronal. (BRITZOLAKI et al., 2018). As neuroesferas que apresentaram a expressão aumentada de *ATPA2* indicam uma maior complexidade na estrutura e funcionalidade neuronal.

Apesar de doenças neuroinvasivas não serem os principais danos provocados pelo CHIKV, o desequilíbrio imunológico decorrente da infecção por esse vírus parece estar relacionado com uma importante função em mediadores de morte neuronal (LIM et al., 2017). O CHIKV mostrou ter um importante papel na resposta inflamatória de neuroesferas, sendo um indicativo de sua função na neuropatogênese de células neuronais. Também foi visto no presente trabalho a resposta inflamatória da infecção pelo ZIKV.

Neuroesferas diferenciadas e infectadas com CHIKV apresentaram níveis estatisticamente aumentados de IL-6, resultados semelhantes foram encontrados em estudos com macacos infectados com CHIKV que mostrou a elevação dos níveis de citocina pró-inflamatória IL-6 significativamente em 48hpi (LABADIE et al., 2010). Níveis aumentados de IL-6 apresentam uma relação direta com a gravidade da infecção pelo CHIKV (VALDÉS et al., 2019). De acordo com as informações expostas modelos de neuroesferas são adequados para o estudo da resposta imune frente à infecção pelo CHIKV, fornecendo possibilidades de estudos para novas pesquisas. Também foi visto um aumento do nível de IL-6 em neuroesferas infectadas por ZIKV.

A associação entre IL-6 com a infecção pelo ZIKV já é bastante relatada. A IL-6 é uma citocina produzida em resposta a danos e infecções em diferentes tipos de tecidos. Níveis aumentados de IL-6 foram relatados em estudos com diversos tipos de vírus. Esses estudos apontam o papel primordial de IL-6 para uma resposta imune adequada durante a infecção. No entanto, outras pesquisas demonstram que níveis aumentados de IL-6 podem estar relacionados com a exacerbação da doença viral (VELAZQUEZ-SALINAS et al., 2019). Estudos com soros de pacientes infectados com CHIKV na fase aguda da doença revelaram aumento de IL-6 na fase aguda da infecção, posteriormente, na fase de recuperação dos pacientes os níveis dessa IL diminuíram significativamente (CHIRATHAWORN et al., 2013). Níveis aumentados de IL-8 também foram detectados em ZIKV e CHIKV, no entanto no ZIKV os valores foram estatisticamente significativos. Sabe-se que o ZIKV, tipicamente neurotrópico induz respostas inflamatórias que elevam os níveis de várias citocinas. Foi indentificado por Ornelas e colaboradores, 2017 o aumento dos níveis de IL-6 e IL-8

no fluido amniótico de gestantes infectadas por ZIKV, essas citocinas são associadas com danos neuronais e também podem interferir na diferenciação de células progenitoras (ORNELAS, 2017).

Níveis aumentados de TNF em neuroesferas diferenciadas (ATRA+BDNF) quando comparadas com neuroesferas SH-SY5Y (sem nenhum tratamento) podem revelar aspectos que não foram bem compreendidos, uma vez que a resposta inflamatória é mediada por citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF. Esses mediadores inflamatórios em combinação com outros fatores desempenham um papel importante na neurogênese e apoptose em condições quiescentes no cérebro em desenvolvimento. O efeito de TNF em células precursoras neurais demonstraram que o mesmo desempenha um papel na regulação da especificação do destino celular, morfologia neuronal e sobrevivência dessas células em desenvolvimento (GREEN; NOLAN, 2014).

Estudos com culturas de hipocampo mostraram que o TNF- $\alpha$  secretado por astrócitos aumentaram a eficácia sináptica e o bloqueio da sinalização do TNF- $\alpha$  reduziu os mecanismos de sinapse em astrócitos (YIRMIYA; GOSHEN, 2011). Um estudo mostrou que TNF desencadeou toxicidade em células-tronco neurais em proliferação, mas não afetou a diferenciação celular (WONG; GOLDSHMIT; TURNLEY, 2004). Os estudos são discrepantes em relação a função de TNF em células em desenvolvimento, sendo necessárias maiores investigações. No entanto, a neuroinflamação pode ser um tipo de resposta fisiológica para a manter a homeostase cerebral, mas também pode ser prejudicial para o processo da neurogênese (SUNG et al., 2020).

Neuroesferas tratadas com ATRA+BDNF e infectadas com CHIKV apresentaram um aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células apoptóticas quando comparadas com neuroesferas apenas tratadas com ATRA+BDNF, mas não infectadas. Esse achado revela que o tratamento com ATRA+BDNF não induz a apoptose celular, não interferindo nos resultados da infecção pelo CHIKV.

Estudos mostram que o CHIKV mobiliza a maquinaria apoptótica em células HeLa e em fibroblastos primários (KREJBICH-TROTOT et al., 2011). A apoptose é um mecanismo característico de células infectadas por vírus, pois desempenha um papel importante na inibição da replicação e disseminação de partículas virais nas células hospedeiras vizinhas (BARBER, 2001). O estudo da apoptose em modelo de cultura

3D (neuroesferas) possibilita um melhor entendimento do comportamento da infecção pelo CHIKV no processo de diferenciação neuronal, contribuindo para melhor caracterizar o papel da neurogênese em um modelo que mimetiza a conformação celular *in vivo*.

O estudo da ultraestrutura celular permitiu observar aglomerados de lipídios em neuroesferas infectadas pelo CHIKV. Sabe-se que a interação entre vírus e células hospedeiras alteram o perfil metabólico celular, pois os vírus desenvolvem diversas estratégias para uso das funções celulares. Os lipídios, por exemplo, são alvos dos vírus, pois contribuem para a regulação da replicação viral, servindo para a montagem e saída das partículas virais maduras (MAZZON & MERCER, 2014).

Um estudo realizado por Melo e colaboradores (2018) mostrou que os lipídios fazem parte da resposta imune sobre a infecção pelo vírus da dengue e também auxiliam no mecanismo de manutenção das infecções virais no organismo (MELO et al., 2018). Os lipídios têm se mostrado de grande importância nos processos de infecção viral, na infecção pelo DENV ocorrem alterações lipídicas durante a infecção celular, essas alterações estão implicadas na regulação de mecanismos de autofagia para atender às necessidades da replicação viral (HEATON et al., 2010).

Ao se observar diversas gotículas de lipídios em neuroesferas infectadas por CHIKV sugerimos que o vírus induz alterações no perfil lipídico celular utilizando-o como estratégia de replicação viral ao induzir resposta de autofagia na célula hospedeira.

Neuroesferas infectadas pelo CHIKV apresentaram vários aglomerados de glicogênio. Sabe-se que neurônios quando em estado saudável não armazenam caracteristicamente glicogênio, mesmo possuindo o maquinário necessário para a síntese do glicogênio em um estado inativo e acumulando uma baixa quantidade neste tipo celular. Saez e colaboradores (2014) mostraram que culturas neuronais de células primárias de camundongos acumulam glicogênio em pequena quantidade, no entanto o metabolismo ativo de glicogênio provou ser protetor para neurônios em estado de hipóxia (SAEZ et. Al., 2014).

Em contrapartida, o estudo de Duran e colaboradores (2012) mostrou que o acúmulo progressivo de glicogênio em neurônios de camundongos e drosófilas levou à perda neuronal, os resultados de Duran mostra, que o acúmulo de glicogênio e neurônios tem uma relevante associação com a neurodegeneração (DURAN J. et al., 2012).

Alguns estudos demonstraram a participação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3 $\beta$ ) que desempenha um papel importante no metabolismo do glicogênio atua na indução de apoptose em infecções virais causadas por exemplo, pelo vírus varicela-zoster (VZV) (KEHN-HALL et al., 2012) e vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) (RAHAUS et al., 2007). Um estudo recente mostrou o papel da enzima glicogênio sintase quinase 3 nos estágios finais da infecção pelo DENV, mostrando que a mesma modula os estágios tardios da infecção durante a possível ativação da apoptose a fim de promover a liberação viral das células infectadas (CUARTAS-LÓPES et. Al., 2020).

Ao serem observados aglomerados de glicogênio em neuroesferas infectadas pelo CHIKV e diante dos achados de outros estudos com a enzima glicogênio sintase quinase 3 e sua associação com a modulação da morte celular em estágios tardios da infecção por outros arbovírus, indicam que o CHIKV também pode modular a atividade desta enzima que é importante para o metabolismo do glicogênio. Estudos adicionais são necessários para modular os níveis de glicogênio em neuroesferas infectadas frente às neuroesferas controle.

No contexto de infecção pelo CHIKV e pelo ZIKV em neurônios em processo de desenvolvimento e diante da hipótese da implicação da infecção em genes importantes para o processo de maturação de neurônios, investigamos se a infecção por estes vírus altera a expressão de genes que codificam Fatores de Transcrição envolvidos na neurogênese. Os genes HOX moldam a especificidade sináptica e muitos são expressos no SNC dos vertebrados em desenvolvimento. Os genes HOX ainda participam da determinação do destino celular dos diferentes tipos de células neurais, participando da organização de redes neuronais funcionais, que são centros fundamentais para a coordenação do SNC (GONÇALVES et al., 2020).

De acordo com nossas análises o gene HOXD1 se apresentou *up* regulado em neuroesferas infectadas por ZIKV. São poucos os trabalhos que avaliam a expressão de determinados genes HOX em função neuronal, como é o caso do gene HOXD1, também conhecido como HOX4, HOX4G ou HOX-4.7. O estudo realizado por Park e colaboradores, 2011, mostrou que o HOXD1 é expresso tanto em células endoteliais imaturas, quanto em processo de crescimento celular. O *knockdown* de HOXD1 afetou a migração, adesão e formação da estrutura tubular de células endoteliais, revelando que esse gene pode ser importante para a angiogênese *in vitro* (PARK et al., 2011). Por ter uma constituição diferente de células neuronais, o gene HOXD1 pode

desempenhar um papel importante na angiogênese, mas talvez não exerça a mesma função em células neurais. É necessária uma investigação mais aprofundada acerca desse *HOX* em células neuronais.

Os genes *SIX2*, *SIX3*, *SIX4* e *SIX6* foram *down* regulados em neuroesferas infectadas por ZIKV ou CHIKV, com valores estatisticamente significativos. *SIX3* é um regulador transcricional envolvido na regulação de progenitores neuronais. A expressão incorreta de *SIX3* afeta o ciclo celular interferindo na diferenciação neuronal. A formação do SNC exige um equilíbrio entre a proliferação e diferenciação de progenitores neurais. Existem vários fatores que participam dessa regulação, dentre eles o Fator de Transcrição *SIX3* que é essencial para a especificação do sistema neural. Estudos em modelo murino demonstrou que o *SIX3* influencia na maturação de neurônios precursores, sugerindo a atuação do *SIX3* na proliferação e diferenciação neuronal (APPOLLONI et al., 2007). Um outro estudo mostrou que a redução na expressão de *SIX3* em camundongos compromete o desenvolvimento do epitélio e bulbo olfatório resultando em migração incorreta de neurônios (PANDOLFI et al., 2018).

O gene *SIX2* que é expresso em múltiplos tecidos durante o desenvolvimento craniofacial foi *down* regulado pela infecção por ZIKV e CHIKV. Estudos revelam que camundongos com perda de função de *SIX2* apresentam defeitos de base craniana grave, indicando a importância desse gene em tipos de células distintas em vários estágios da morfogênese craniofacial (LI et al., 2020), podendo indicar o papel desse gene em vias que regulam o desenvolvimento de estruturas complexas para a formação craniofacial.

O *SIX4* que é fundamental para a padronização de identidades celulares derivadas da mesoderme (CLARK et al., 2016) também teve a expressão alterada por ZIKV e CHIKV. Um estudo recente que utilizou a estratégia de *knockdown* de *SIX4* em neuroblastos de *Drosophila*, identificou que o *SIX4* atua como um regulador da homeostase de progenitores neurais intermediários, sugerindo que o *SIX4* evita a diferenciação prematura de células progenitoras (CHEN et al., 2021). Nossos achados mostram que assim como em neuroblastos de *Drosophila*, o *SIX4* também pode desempenhar uma função importante em células de neuroblastos humano e a infecção por viral interfere na sua expressão, regulando-a negativamente.

O *SIX6*, também *down* regulado em neuroesferas infectadas por ZIKV e CHIKV é necessário para o desenvolvimento de neurônios hipotalâmicos, sendo expresso em

uma linha celular neuronal mais madura. Estudos mostram que o Six6 desempenha importante papel na sobrevivência neuronal, indicando a importância desse fator em células neurais (PANDOLFI et al., 2019). Esse achado pode indicar o impacto da infecção pelo CHIKV e pelo ZIKV em células neuronais em processo de maturação celular.

O gene *PITX3* que apesar de *down* regulado para ambas as infecções, só apresentou valores estatisticamente significativos para a infecção por CHIKV. O *PITX3* é importante para a diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento e também desempenha um papel fundamental no destino celular no desenvolvimento, auxiliando na sobrevivência neuronal a longo prazo (LI et al., 2009). Sendo assim, a infecção por ZIKV e CHIKV é capaz de alterar este outro gene que possui função importante na neurogênese.

O gene *LHX1* também apresentou regulação negativa pela infecção por ZIKV e CHIKV. *LHX1* desempenha uma função importante na diferenciação celular e no desenvolvimento da cabeça e atua regulando a transcrição de seus alvos durante o desenvolvimento embrionário (McMAHON, et al., 2019). A *down* regulação de *LHX1* em neuroesferas infectadas por ZIKV e CHIKV indica uma potencial função alterada em células em processo de desenvolvimento.

Foi observada *up* regulação do gene *DMBX1* em neuroesferas infectadas por ZIKV e não por CHIKV. O *DMBX1* é expresso principalmente durante a embriogênese. Um estudo com *DMBX1* silenciado em camundongos, mostrou que alguns camundongos morreram durante o período neonatal, e outros sobreviveram até a idade adulta, no entanto o crescimento foi prejudicado. Os resultados sugerem a importância do *DMBX1* para a sobrevivência pós natal e desenvolvimento cerebral (OHTOSHI et al. 2004). Esse resultado indica que mesmo tendo uma *up* regulação de *DMBX1* em neuroesferas infectadas por ZIKV, que não são todos os genes envolvidos com o neurodesenvolvimento que são afetados pelo ZIKV, se comportando de uma maneira diferente em relação ao CHIKV.

Ao se tratar de genes *up* regulados, o *POU5F1/OCT4* apresentou-se regulado positivamente para ZIKV e CHIKV. O *POU5F1/OCT4* é regulador da diferenciação de células tronco. O estudo de OKUDA e colaboradores, 2004 mostrou que a *down* regulação de *POU5F1* tem o papel de acelerar a diferenciação neuronal das células progenitoras, em contrapartida a sua expressão regulada positivamente altera a diferenciação neuronal, interferindo em seu processo (OKUDA et al. 2004).

Interessantemente ao observar a *up* regulação de *POU5F1* em neuroesferas infectadas por ZIKV e CHIKV pode ser um indício da interrupção da neurogênese.

A formação do SNC é regulada por etapas cruciais que envolvem um rigoroso controle entre a proliferação e diferenciação de células progenitoras. Várias evidências demonstram a atuação de fatores transcricionais que regulam a diferenciação de células neurais. Apresentamos no trabalho, que a infecção pelo ZIKV em neuroesferas, altera a expressão de genes cruciais para o desenvolvimento do SNC. O CHIKV, por sua vez apresentou características semelhantes na expressão de vários genes *HOX*. Por ser um vírus bastante explorado em estudos de neurotropismo, o ZIKV serviu como um parâmetro de modelo para a análise da expressão dos genes *HOX*. O trabalho revelou também por imagens de microscopia os efeitos da infecção pelo CHIKV em neuroesferas em processo de diferenciação neuronal.

Até o presente momento não se tem na literatura estudos que correlacionam a infecção pelo CHIKV em modelo de cultura 3D em fase de diferenciação neuronal, alterações na ultraestrutura celular e as implicações imunológicas e moleculares da sua infecção no neurodesenvolvimento. A base deste estudo poderá servir de instrumento para estudos futuros, utilizando genes importantes para a neurogênese que possuíram expressão alterada pela infecção por ZIKV e CHIKV.

## 8 CONCLUSÕES

- As neuroesferas se diferenciam em células neuronais maduras;
- As neuroesferas de células SH-SY5Y são permissivas e susceptíveis a infecção tanto por CHIKV quanto pelo ZIKV;
- As estruturas em 3D são capazes de passar pelo processo de indução da diferenciação celular;
- Neuroesferas em processo de diferenciação celular quando infectadas pelo CHIKV têm alteração na estrutura celular;
- A infecção das estruturas em 3D no momento crítico da diferenciação celular gera respostas inflamatórias e altera a expressão de importantes marcadores moleculares envolvidos na neurogênese.

## REFERÊNCIAS

- AL TANOURY, Z.; PISKUNOV, A.; ROCHETTE-EGLY, C. Vitamin a and retinoid signaling: Genomic and nongenomic effects. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 7, p. 1761–1775, 2013.
- ALHAQUE, S.; THEMIS, M.; RASHIDI, H. Three-dimensional cell culture: From evolution to revolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1750, 2018.
- ALHARBI, R. A. et al. The role of HOX genes in normal hematopoiesis and acute leukemia. **Leukemia**, n. January, p. 1000–1008, 2013.
- ALI, S. et al. Environmental and Social Change Drive the Explosive Emergence of Zika Virus in the Americas. n. Fig 1, p. 1–16, 2017.
- ALMEIDA, R. S. et al. Cytokines and Soluble HLA-G Levels in the Acute and Recovery Phases of Arbovirus-Infected Brazilian Patients Exhibiting Neurological Complications. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. March, p. 1–14, 2021.
- ANTON, D. et al. Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5517–5527, 2015.
- ANTONIOU, E. et al. Zika virus and the risk of developing microcephaly in infants: A systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 11, 2020.
- ANTONUCCI, F. et al. SNAP-25, a Known presynaptic protein with emerging postsynaptic functions. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 8, n. MAR, p. 1–9, 2016.
- APPOLLONI, I. et al. Six3 controls the neural progenitor status in the murine CNS. **Cerebral Cortex**, v. 18, n. 3, p. 553–562, 2007.
- ARPINO, C.; CURATOLO, P.; REZZA, G. Chikungunya and the nervous system: What we do and do not know. **Reviews in Medical Virology**, v. 19, n. 3, p. 121–129, 2009.
- AZEVEDO, R. S. S. et al. In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. n. June 2017, p. 1–11, 2018.
- BAILLARGEON, P. et al. Automating a Magnetic 3D Spheroid Model Technology for High-Throughput Screening. **SLAS Technology**, v. 24, n. 4, p. 420–428, 2019.
- BALDASSARI, S. et al. Brain Organoids as Model Systems for Genetic Neurodevelopmental Disorders. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. October, p. 1–9, 2020.
- BARBER, G. N. Host defense, viruses and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, n. 2, p. 113–126, 2001.
- BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n.

7446, p. 504–507, 2013.

BIEDLER, J. L.; HELSON, L.; SPENGLER, B. A. Morphology and Growth , Tumorigenicity , and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture1. n. November, 1973.

BIEDLER, J. L.; SCHACHNER, M. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. **Cancer Research**, v. 38, n. November, p. 3751–3757, 1978.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 18, 2022 v. 53, n.18, 2022Disponível em: < [boletim-epidemiologico-vol-53-no18\(www.gov.br\)](http://boletim-epidemiologico-vol-53-no18(www.gov.br)) > Acesso em: junho. 2022

BLITVICH, B. Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control. Nikos Vasilakis and Duane J. Gubler. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 488–489, 2016.

BLITVICH, B. J.; FIRTH, A. E. A review of flaviviruses that have no known arthropod vector. **Viruses**, v. 9, n. 6, p. 1–25, 2017.

BRASIL, P. et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. **Current Medicine Research and Practice**, v. 6, n. 2, p. 95, 2016.

BRINTON, A. MARGO., BASU, M. HHS Public Access Author manuscript Virus Res. Author manuscript; available in PMC 2016 August 03. Published in final edited form as: Virus Res. 2015 August 3; 206: 108–119. doi:10.1016/j.viruses.2015.02.006. Functions of the 3' and 5' genome RNA regions. **Virus Research**, v. 206, n. 1, p. 108–119, 2015.

BRITZOLAKI, A. et al. The SERCA2: A Gatekeeper of Neuronal Calcium Homeostasis in the Brain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 5, p. 981–994, 2018.

BRIZZI, K. Neurologic Manifestation of Chikungunya Virus. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 2, 2017.

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

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

CAIN, M. D. et al. Review Mechanisms of Pathogen Invasion into the Central Nervous System. **Neuron**, v. 103, n. 5, p. 771–783, 2019.

CHEUNG, Y. T. et al. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. **NeuroToxicology**, v. 30, n. 1, p. 127–135, 2009.

CHEN, R. et al. Homeodomain protein Six4 prevents the generation of

supernumerary *Drosophila* type II neuroblasts and premature differentiation of intermediate neural progenitors. **Plos genetics**, v. 17, n.2, 2021.

CHIAM, C. W. et al. Neurovirulence comparison of chikungunya virus isolates of the Asian and East/Central/South African genotypes from Malaysia. **Journal of General Virology**, v. 96, n. 11, p. 3243–3254, 2015.

CHIRATHAWORN, C. et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 8, p. 631–634, 2013.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

CLÉ, M. et al. Neurocognitive impacts of arbovirus infections. **Journal of Neuroinflammation**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2020.

COLAVITA, F. et al. ZIKV infection induces an inflammatory response but fails to activate types I, II, and III IFN response in human PBMC. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.

CORTNEY CHELISE. GUPTON, S. L. Membrane Trafficking in Neuronal Development: Ins and Outs of Neural Connectivity. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 322, p. 247–280, 2016.

COUDERC, T. et al. A mouse model for Chikungunya: Young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, 2008.

CUI, H. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in schizophrenia: A systematic review. **Shanghai Archives of Psychiatry**, v. 24, n. 5, p. 250–261, 2012.

CUNNINGHAM, T. J.; DUESTER, G. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. **Nat Rev Mol Cell Biol. Author**, v. 16, n. 2, p. 110–123, 2015.

CUARTAS-LÓPEZ AM, GALLEGGO-GÓMEZ JC. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  participates in late stages of Dengue virus-2 infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 2020.

CLARK, I. B. N. et al. D-six4 plays a key role in patterning cell identities deriving from the *Drosophila* mesoderm. **Developmental Biology**. v. 294, n 1, p. 220-231, 2006.

DASEN, P. P. AND J. S. HOX Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization. **Neuron**, v. 80, n. 1, p. 12–34, 2013.

DE BERNADI SCHNEIDER, A. et al. Flavi: An enhanced annotator for viral genomes of flaviviridae. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 1–22, 2020.

DE MEDEIROS, L. M. et al. Cholinergic Differentiation of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Line and Its Potential Use as an In vitro Model for Alzheimer's Disease Studies. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 11, p. 7355–7367, 2019.

DEEBA, F. et al. Chikungunya virus: recent advances in epidemiology, host

pathogen interaction and vaccine strategies. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 3, p. 1–10, 2016.

DEVHARE, P. et al. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. p. 1–8, 2017.

DHANWANI, R. et al. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus Research**, v. 163, n. 2, p. 563–572, 2012.

DI MAIO FERREIRA, F. C. P. A. et al. Late Identification of Chikungunya Virus in the Central Nervous System of a 2-Month-Old Infant: Persistence of Maternal-Neonatal Infection? **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 8, n. 4, p. 374–377, 2019.

DURAN J, et al. Deleterious effects of neuronal accumulation of glycogen in flies and mice. **Molecular Medicine**.719-729, 2012.

EGLIN, R. M.; REISINE, T. Human iPS Cell-Derived Patient Tissues and 3D Cell Culture Part 2: Spheroids, Organoids, and Disease Modeling. **SLAS Technology**, v. 24, n. 1, p. 18–27, 2019.

ENCINAS, M. et al. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 75, n. 3, p. 991–1003, 2000.

ENDY, T. P. et al. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: A prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n. 1, p. 40–51, 2002.

FAIZAN, M, L, et al. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. **Intervirology**, p. 152-158, 2016.

FIONA M. INGLIS, KIM M. LEE, KEVIN B. CHIU, OLIVIA M. PURCELL, PETER J. DIDIER, KASI RUSSELL-LODRIGUES, SCOTT C. WEAVER, CHAD J. ROY, AND A. G. M. Neuropathogenesis of Chikungunya Infection: Astrogliosis and Innate Immune Activation. **J Neurovirol.**, v. 22, n. 2, p. 140–148, 2016.

FRANCO, E. J. et al. Combination regimens of favipiravir plus interferon alpha inhibit chikungunya virus replication in clinically relevant human cell lines. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 1–16, 2021.

GABRIEL, E. et al. Human Brain Organoids to Decode Mechanisms of Microcephaly. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 14, n. May, p. 1–13, 2020.

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

GOH, V. S. L.; MOK, C. K.; CHU, J. J. H. Antiviral natural products for arbovirus infections. **Molecules**, v. 25, n. 12, 2020.

GOULD, E.A. et al. Understanding the alphaviruses: Recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v.87, n. 2. p. 111-124, 2010.

GOLDIE, B. J.; BARNETT, M. M.; CAIRNS, M. J. BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. v. 8, n. October, p. 1–7, 2014.

GONÇALVES, C. S. et al. HOX gene cluster (de)regulation in brain: from neurodevelopment to malignant glial tumours. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 19, p. 3797–3821, 2020.

GORDON, J. **GORDON, J. General Overview of Neuronal Cell Culture. In: S, Amini; M.K., White. Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols. Hatfield, Inglaterra: Humana Press, 2013. p. 1-8, [s.l: s.n.]. v. 1078**

GOSZTONYI, G.; KOPROWSKI, H. The concept of neurotropism and selective vulnerability (“Pathoclisis”) in virus infections of the nervous system a historical overview. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 253, p. 1–13, 2001.

GREEN, H. F.; NOLAN, Y. M. Inflammation and the developing brain: Consequences for hippocampal neurogenesis and behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 40, p. 20–34, 2014.

GRIER, D. G. et al. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. v. 205, p. 154–171, 2005.

GRIFFIN, D. E. Neuronal cell death in alphavirus encephalomyelitis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 289, p. 57–77, 2005.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, 2002.

GUERRERO-ARGUERO, I. et al. A comparison of Chikungunya virus infection, progression, and cytokine profiles in human PMA-differentiated U937 and murine RAW264.7 monocyte derived macrophages. **PLoS ONE**, v. 15, n. 3, p. 1–21, 2020.

HAISLER, W. et al. Célula tridimensional culminando por levitação magnética. **Nature Protocols** v. 8, p. 1940-1949, 2013.

HOLLYDAY, M. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 19, n. 2, p. 161–173, 2001.

HORCADA, M. L.; DÍAZ-CALDERÓN, C.; GARRIDO, L. Fiebre chikungunya. Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa. **Reumatología Clínica**, v. 11, n. 3, p. 161–164, 2015.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.

IDREES, M. Global expansion of Chikungunya Virus: Mapping the 64 year history. **International Journal of Infectious Diseases**, 2017.

IHUNWO, A. O. et al. Neurogenesis and Viral Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. February, p. 1–12, 2022.

ILLENDULA, A.; FULTANG, N.; PEETHAMBARAN, B. Retinoic acid induces differentiation in neuroblastoma via ROR1 by modulating retinoic acid response elements. **Oncology Reports**, v. 44, n. 3, p. 1013–1024, 2020.

JAHN, K. et al. A cell culture model for investigation of synapse influenceability: epigenetics, expression and function of gene targets important for synapse formation and preservation in SH-SY5Y neuroblastoma cells differentiated by retinoic acid. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 11, p. 1341–1367, 2017.

JANESICK, A.; WU, S. C.; BLUMBERG, B. Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 8, p. 1559–1576, 2015.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2020.

JOSE, J.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol**, v. 4, p. 837–856, 2009.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 9, p. 1–14, 2015.

KREJBICH-TROTOT, P. et al. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 1, p. 314–325, 2011.

KEHN-HALL K, ET AL., Modulation of GSK-3beta activity in Venezuelan equine encephalitis virus infection. **PLoS One**. 7(4):e34761, 2012.

KÜMMERER, B. M. **Advances in Experimental Medicine and Biology 1062**. [s.l.: s.n.]. v. 1062

LABADIE, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 3, p. 894–906, 2010.

LANCASTER, M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 373–379, 2013.

LANGFORD, J. K. AND D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. **Methods and Protocols**, v. 1078, p. 35–44, 2013.

LAPPIN, T. R. J. et al. HOX genes: Seductive science, mysterious mechanisms. **Ulster Medical Journal**, v. 75, n. 1, p. 23–31, 2006.

LAURETI, M. et al. Flavivirus Receptors : Diversity , Identity , and Cell Entry. v. 9, n. September, p. 1–11, 2018.

LESSLER, J. et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 353, n. 6300, 2016.

LEWIS, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. **Nature**, v. 276, p. 229–242, 1978.

LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.

LI C, et al. Generation and characterization of Six2 conditional mice. **Genesis**. V.58, n.7, 2020.

LI, W.; CHEN, S.; LI, J. Y. Human induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: A novel cell source of cell therapy and disease modeling. **Progress in Neurobiology**, v. 134, p. 161–177, 2015.

LI J. et al. The role of transcription factor Pitx3 in dopamine neuron development and Parkinson's disease. **Curr Top Med Chem**. v.9, n. 10, 2009.

LI, Y. C. E. et al. Toward a neurospheroid niche model: optimizing embedded 3D bioprinting for fabrication of neurospheroid brain-like co-culture constructs. **Biofabrication**, v. 13, n. 1, 2020.

LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016.

LIM, S. M. et al. Transcriptomic analyses reveal differential gene expression of immune and cell death pathways in the brains of mice infected with West Nile virus and chikungunya virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–16, 2017.

LIPPMANN, E. S. et al. Deterministic HOX patterning in human pluripotent stem cell-derived neuroectoderm. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 4, p. 632–644, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPES, F. M. et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. **Brain Research**, v. 1337, p. 85–94, 2010.

LUCASSEN, P. J. et al. Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspective in Biology**, v. 7, p. 1–16, 2015.

LUDLOW, M. et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 2, p. 159–184, 2016.

LUM, F. M. et al. Longitudinal study of cellular and systemic cytokine signatures to define the dynamics of a balanced immune environment during disease manifestation in zika virus-infected patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 5, p. 814–824, 2018.

LUPLERTLOP, N. et al. The impact of zika virus infection on human neuroblastoma (Sh-SY5Y) cell line. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 54, n. 3, p. 207–214, 2017.

- MADEN, M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 755–765, 2007.
- MAZZON, M & MERCER, J. Lipid interactions during virus entry and infection. **Cellular Microbiology**, v. 16, n.10, p. 1493-1502, 2014.
- MALLO, M.; ALONSO, C. R. The regulation of HOX gene expression during animal development. **Development (Cambridge)**, v. 140, n. 19, p. 3951–3963, 2013.
- MAREK, K. W.; KURTZ, L. M.; SPITZER, N. C. cJun integrates calcium activity and *tlx3* expression to regulate neurotransmitter specification. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 8, 2010.
- MARK, M.; RIJLI, F. M.; CHAMBON, P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. **Pediatric Research**, v. 42, n. 4, p. 421–429, 1997.
- MATUSALI, G. et al. Tropism of the chikungunya virus. **Viruses**, v. 11, n. 175, 2019.
- MAXIMOVA, O. A.; PLETNEV, A. G. Flaviviruses and the Central Nervous System: Revisiting Neuropathological Concepts. **Annual Review of Virology**, v. 5, p. 255–72, 2018.
- MCCMAHON, R. et al. Mechanistic insights from the LHX1-driven molecular network in building the embryonic head. **Develop Growth Differ.** v. 61, p327–336, 2019.
- MEHTA, R. et al. The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. **Rev Med Virol.** v. 28, 2018.
- MELINO, G. et al. Retinoids and the control of growth/death decisions in human neuroblastoma cell lines. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 31, n. 1–2, p. 65–83, 1997.
- MELO, C.F.O.R. et al. The role of lipids in the inception, maintenance and complications of dengue virus infection. **Scientific Reports.** v. 8, n. 1, 2018.
- MINER, J. J. et al. Brief Report: Chikungunya viral arthritis in the United States: A mimic of seronegative rheumatoid arthritis. v. 67, n. 5, p. 1214–1220, 2016.
- MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.
- MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951–958, 2016.
- MONTRONE, M. et al. Retinoids as Critical Modulators of Immune Functions: New Therapeutic Perspectives for Old Compounds. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 9, n. 2, p. 113–131, 2009.
- MOSTASHARI, F. et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: Results of a household-based seroepidemiological survey. **Lancet**, v. 358, n. 9278, p. 261–264, 2001.
- MUNJAL, A. et al. Advances in developing therapies to combat zika virus: Current knowledge and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. AUG, p. 1–

19, 2017.

MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika virus infection — After the pandemic. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 2019.

MUSTAFÁ, Y. M. et al. Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

NATTHANEJ, L et al. The impact of Zika virus infection on human neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. **J Vector Borne Disease**, v. 54 p. 207–214.

NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.

NIAZ, A. et al. Robust Dopaminergic Differentiation and Enhanced LPS-Induced Neuroinflammatory Response in Serum-Deprived Human SH-SY5Y Cells: Implication for Parkinson's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, 2020.

STEPHEN C NOCTOR, S.C. et al. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. **Nature neuroscience**, v.7, n. 2, 2004.

ORNELAS, A.M. et al. Immune activation in amniotic fluid from Zika virus-associated microcephaly. **Ann Neurol**. v. 1, p.152-156, 2017.

OKUDA, T. et al. Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo. **Molecular Brain Research**. v. 132, n.1, p. 18-30, 2004.

OHTOSHI, A and Behringer, R.R. Neonatal Lethality, Dwarfism, and Abnormal Brain Development in *Dmbx1* Mutant Mice. **Molecular and Cellular Biology**. v. 24, n.17, 2004.

PÅHLMAN, S. et al. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. **Cell Differentiation**, v. 14, n. 2, p. 135–144, 1984.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. october, p. 839–845, 2007.

PANDOLFI, E. C. et al. Haploinsufficiency of SIX3 Abolishes Male Reproductive Behavior Through Disrupted Olfactory Development, and Impairs Female Fertility Through Disrupted GnRH Neuron Migration. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 11, p. 8709–8727, 2018.

PANDOLFI, E. C. et al. Deletion of the homeodomain protein six6 from gnrh neurons decreases gnrh gene expression, resulting in infertility. **Endocrinology**, v. 160, n. 9, p. 2151–2164, 2019.

PARK, H. et al. Homeobox D1 regulates angiogenic functions of endothelial cells via integrin  $\beta 1$  expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,

v. 408, n. 1, p. 186–192, 2011.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: Entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, v. 80, n. 1, p. 11–22, 2008.

PETITDEMANGE, C.; WAUQUIER, N.; VIEILLARD, V. Control of immunopathology during chikungunya virus infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 4, p. 846–855, 2015.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. Review The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, 2018.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The continued threat of emerging flaviviruses. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 796–812, 2020.

PINHEIRO, T. J. et al. Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 11, p. 937–943, 2016.

RAJAPAKSE, S.; RODRIGO, C.; RAJAPAKSE, A. Atypical manifestations of chikungunya infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 104, n. 2, p. 89–96, 2010.

ROCHA, R. F. et al. Host target-based approaches against arboviral diseases. **Biological Chemistry**, v. 399, n. 3, p. 203–217, 2017.

RODENHUIS-ZYBERT, I. A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J. M. Dengue virus life cycle: Viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2773–2786, 2010.

RODRIGUEZ, A. K. et al. Molecular characteristics and replication mechanism of dengue, zika and chikungunya arboviruses, and their treatments with natural extracts from plants: An updated review. **EXCLI Journal**, v. 18, p. 988–1006, 2019.

ROEHRIG, J. T. West Nile Virus in the United States — A Historical Perspective. p. 3088–3108, 2013.

ROMBI, F. et al. The journey of Zika to the developing brain. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 4, p. 3097–3115, 2020.

ROSS, B. Y. R. W. The Newala Epidemic. **The Journal of Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 177–191, 1956.

ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A.; BIEDLER, J. L. Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 71, n. 4, p. 741–747, 1983.

ROTHAN, H. A. et al. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 2551–2557, 2019.

RAHAUS M, et al., Varicella-zoster virus requires a functional PI3K/Akt/GSK-3alpha/beta signaling cascade for efficient replication. **Cell Signal**.19(2):312–320, 2007.

RYU, N. E.; LEE, S. H.; PARK, H. Spheroid Culture System Methods and

Applications for Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1–13, 2019.

SAGER, G. et al. Role of host cell secretory machinery in zika virus life cycle. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 2013–2014, 2018.

SAEZ I, et al. Neurons have an active glycogen metabolism that contributes to tolerance to hypoxia. **J, Cereb. Blood Flow Metab.** V. 34, p 945-955, 2014.

SALVADOR, E. Zika Virus and the Guillain – Barré Syndrome — Case Series from Seven Countries. p. 23–26, 2019.

SÁNCHEZ-SAN MARTÍN, C. et al. Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

SCHARFMAN, D. K. B. AND H. E. Brain derived neurotrophic factor. **Growth Factors**, v. 22, n. 3, p. 123–131, 2004.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 491–500, 2010.

SHANG, Y. et al. Modifications of autophagy influenced the Alzheimer-like changes in SH-SY5Y cells promoted by ultrafine black carbon. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 763–771, 2019.

SHAO, Q. et al. Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. **Development (Cambridge)**, v. 143, n. 22, p. 4127–4136, 2016.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.

SIMMONDS, P. et al. ICTV ICTV Virus Taxonomy Profile : Flaviviridae. p. 2–3, 2017.

SORRELLS, S. F. et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. **Nature**, v. 555, n. 7696, p. 377–381, 2018.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 25 p. 183-197, 2009.

SUNG, P. S. et al. Neuroinflammation and neurogenesis in alzheimer's disease and potential therapeutic approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 701, n. 3, 2020.

TAN, H. Y.; CHO, H.; LEE, L. P. Human mini-brain models. **Nature Biomedical Engineering**, v. 5, n. 1, p. 11–25, 2021.

TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell.**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TENG, T. S. et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 2015.

- TEPPOLA, H. et al. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 4, p. 731–747, 2016.
- THOMAS J. CHAMBERS, M. S. D. PATHOGENESIS OF FLAVIVIRUS ENCEPHALITIS. **Advances in virus research**, v. 60, n. January, p. 273–342, 2003.
- VALDÉS LÓPEZ, J. F.; VELILLA, P. A.; URCUQUI-INCHIMA, S. Chikungunya Virus and Zika Virus, Two Different Viruses Examined with a Common Aim: Role of Pattern Recognition Receptors on the Inflammatory Response. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 39, n. 9, p. 507–521, 2019.
- VAN DEN POL, A. N. et al. Zika virus targeting in the developing brain. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 2161–2175, 2017.
- VELAZQUEZ-SALINAS, L. et al. The role of interleukin 6 during viral infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 6–11, 2019.
- VENKATESH, K.; MATHEW, A.; KOUSHIKA, S. P. Role of actin in organelle trafficking in neurons. **Cytoskeleton**, v. 77, n. 3–4, p. 97–109, 2020.
- VU, B.; SOUZA, G. R.; DENGJEL, J. Scaffold-free 3D cell culture of primary skin fibroblasts induces profound changes of the matrisome. **Matrix Biology Plus**, v. 11, 2021.
- VU, D. M.; JUNGKIND, D.; LABEAUD, A. D. Chikungunya Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 37, n. 2, p. 371–382, 2017.
- WALTER, J. E. Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2192–2193, 2016.
- WARDLE, R. A.; POO, M. M. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8722–8732, 2003.
- WILDER-SMITH, A. et al. Dengue. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 350–363, 2019.
- WILLIAM J. TYLER, STEPHEN P. PERRETT, AND L. D. P.-M. The Role of Neurotrophins in Neurotransmitter Release William. **Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 524–531, 2002.
- WONG, G.; GOLDSHMIT, Y.; TURNLEY, A. M. Interferon- $\gamma$  but not TNF $\alpha$  promotes neuronal differentiation and neurite outgrowth of murine adult neural stem cells. **Experimental Neurology**, v. 187, n. 1, p. 171–177, 2004.
- XU, D. et al. Update on the Animal Models and Underlying Mechanisms for ZIKV-Induced Microcephaly. **Annual Review of Virology**, v. 6, p. 459–479, 2019.
- YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 181–213, 2011.
- YLOSTALO, J. H. 3D Stem Cell Culture. **Cells**, v. 9, n. 10, p. 8–10, 2020.
- ZAMBRANA, V. et al. Zika virus infection in Nicaraguan households. p. 1–19, 2018.

ZHANG, T.; GYGI, S. P.; PAULO, J. A. Temporal Proteomic Profiling of SH-SY5Y Differentiation with Retinoic Acid Using FAIMS and Real-Time Searching. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 1, p. 704–714, 2020.

WHO Director-General summarizes the outcome of the emergency committee regarding clusters of microcephaly and Guillain-Barré syndrome [Internet]. 2016 [cited April 14, 2016]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/>

# APÊNDICE A - A REVIEW ON CHIKUNGUNYA VIRUS EPIDEMIOLOGY, PATHOGENESIS AND CURRENT VACCINE DEVELOPMENT



Review

## A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development

Thaise Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti <sup>1</sup>, Mylena Ribeiro Pereira <sup>2</sup>, Sergio Oliveira de Paula <sup>3</sup> and Rafael Freitas de Oliveira Franca <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Virology and Experimental Therapy, Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Recife 50740-465, PE, Brazil; thaiseyasmine@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 52171-900, PE, Brazil; myribeiro@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, MG, Brazil; depaula@ufv.br

\* Correspondence: rafael.franca@fiocruz.br

**Abstract:** Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus that recently re-emerged in many parts of the world causing large-scale outbreaks. CHIKV infection presents as a febrile illness known as chikungunya fever (CHIKF). Infection is self-limited and characterized mainly by severe joint pain and myalgia that can last for weeks or months; however, severe disease presentation can also occur in a minor proportion of infections. Among the atypical CHIKV manifestations that have been described, severe arthralgia and neurological complications, such as encephalitis, meningitis, and Guillain-Barré Syndrome, are now reported in many outbreaks. Moreover, death cases were also reported, placing CHIKV as a relevant public health disease. Virus evolution, globalization, and climate change may have contributed to CHIKV spread. In addition to this, the lack of preventive vaccines and approved antiviral treatments is turning CHIKV into a major global health threat. In this review, we discuss the current knowledge about CHIKV pathogenesis, with a focus on atypical disease manifestations, such as persistent arthralgia and neurologic disease presentation. We also bring an up-to-date review of the current CHIKV vaccine development. Altogether, these topics highlight some of the most recent advances in our understanding of CHIKV pathogenesis and also provide important insights into the current development and clinical trials of CHIKV potential vaccine candidates.

**Keywords:** chikungunya; pathogenesis; virus receptor; vaccine; immunopathogenesis; epidemiology



**Citation:** de Lima Cavalcanti, T.Y.V.; Pereira, M.R.; de Paula, S.O.; Franca, R.F.d.O. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. *Viruses* **2022**, *14*, 969. <https://doi.org/10.3390/v14050969>

Academic Editor: Richard J. Kuhn

Received: 30 March 2022

Accepted: 3 May 2022

Published: 5 May 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

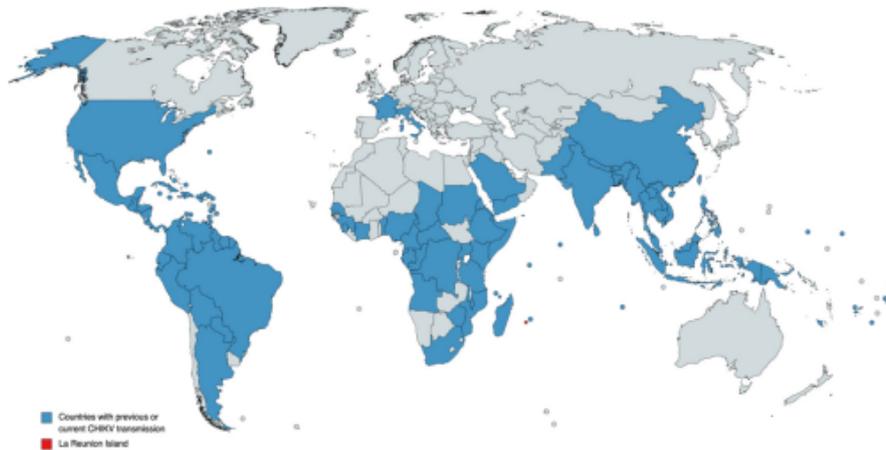
### 1. Introduction and Epidemiology

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus. The virus was first isolated from the serum of an infected patient during a large outbreak of a debilitating arthritic disease in 1952 in Tanzania [1]. The name “chikungunya” is a descriptive term used by the local Tanzanian Makonde people to describe the disease and can be translated as “disease that bends up the joints” [1,2]. For the following 50 years (approximately) after its initial isolation, CHIKV caused only occasional outbreaks in Africa and Asia. Although CHIKV mortality rates are low, this virus imposes pronounced morbidity resulting in a substantial impact on the quality of life of infected individuals and significant economic losses, especially in developing countries. In the vast majority of individuals, CHIKV infection is characterized by an abrupt onset of fever, frequently associated with joint pain. Other symptoms are also reported, although to a minor extent, and these may include incapacitating polyarthralgia and arthritis, rash, myalgia, and headache [3]. Asymptomatic CHIKV infections do occur but are rare and estimated at about 3 to 28% of the infected individuals, varying between different epidemic outbreaks [4,5]. Acute symptomatic CHIKV disease resembles other common well-known arbovirus-induced diseases, such as dengue fever caused by the dengue virus (DENV) and the Zika virus (ZIKV) disease, which

are frequently inaccurately diagnosed given the simultaneous circulation of the different viruses in the same location, making diagnosis challenging. Although the infection is usually a self-limited disease, some patients develop persistent joint pain that may last for months or years after the acute phase of disease [6,7].

CHIKV originated in Africa over 500 years ago and was subsequently introduced to Asia. The initial genetic analysis of the common CHIKV African lineage showed that the virus diverged into three genotypes, named West African (WA) and East/Central/South African (ECSA), and Asian. The ECSA can be further divided into the sublineage Indian Ocean lineage (IOL). These genotypes are now spread worldwide, with ECSA and Asian genotypes being those predominately found [8]. Interestingly these genotypes exhibited differences in their transmission cycles, while in Asia transmission appears to be maintained in an urban cycle with *Aedes* sp. mosquitoes, CHIK virus transmission in Africa was mostly related to a sylvatic cycle, primarily with *Aedes fuscifer* and *Aedes africanus* mosquitoes [9]. In the urban cycle, the virus is primarily transmitted through the bite of female mosquito vectors of the genus *Aedes*, mostly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, vectors widely found in urban areas. However, vertical CHIKV transmission (mother-to-child transmission) was also reported in different outbreaks [10–12]. The virus is maintained in a rural enzootic transmission cycle, which occurs between various sylvatic *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes and animal reservoirs, with nonhuman primates acting as the main reservoir host [13]. However, just like DENV and ZIKV, Chikungunya virus has become fully adapted to the urban cycles and no longer requires the presence of nonhuman primates and a sylvatic cycle for their maintenance. Thus, the urban transmission cycles of CHIKV, especially in densely inhabited tropical areas, usually result in large outbreaks, where a sustained low level of virus circulation is enough to maintain these viruses in the population.

It is believed that CHIKV infection has a low fatality rate, but since a large outbreak that occurred in 2005–2006 on the Indian Ocean island of Réunion (Figure 1), CHIKV infection assumptions have been made suggesting that CHIKV may have evolved to a more severe form of the disease with central nervous system (CNS) involvement and fulminant hepatitis cases being reported [14]. On the other hand, the gap in CHIKV severe disease may just be a consequence of the lack of data, with poorly described infectious mechanisms and associated pathologies from the early 21st century outbreaks. During this outbreak in 2006, CHIKV was estimated to infect a third of the population of 775,000, causing 237 deaths [15]. Given that prior to the Réunion outbreak CHIKV was reported only from sporadic cases and to a limited number of small outbreaks in several African countries and Southeast Asia, the magnitude of the Réunion Island outbreak has led to speculations that a new variant of the virus had emerged that would be either more virulent or more easily transmitted by mosquito vectors. Genetic analysis of the virus responsible for the 2006 epidemic showed that this virus originated in coastal Kenya in 2004, where CHIKV isolates obtained during this epidemic maintained a high degree of similarity and had over 99% identity at the nucleic acid level, forming a single clade within the Central/East African genotype [16]. Further analysis of genome microevolution during the 2006 Réunion outbreak identified an alanine to valine mutation at position 226 in the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V) of CHIKV isolates. This mutation, found in over 90% of viral sequences from Réunion Island, was associated with a slight increase in transmission by *Ae. albopictus*, showing an enhanced ability of the virus to replicate in insect cells that are naturally low in cholesterol [17]. Thus, this mutation may have facilitated virus transmission, added to the fact that the virus was introduced in a region where the population was naïve (not previously exposed to CHIKV) and where mosquito population control measures were not enough to stop the virus from spreading.



**Figure 1.** Countries with previous or current chikungunya transmission are blue-colored, according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (available at <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>, accessed on 28 April 2022), as reported by February 2022. La Réunion Island is red-colored, given its historical importance. Does not include imported cases. Although the United States territory of Alaska is blue-colored, no CHIKV transmission was documented in this area.

Before the 2005–2006 Réunion outbreak, the virus was restricted to small African and Asian outbreaks. Of these, minor outbreaks in India were recorded in 1963 in Calcutta, followed by epidemics in Chennai, Pondicherry, and Vellore in 1964; Visakhapatnam, Rajmundry, and Kakinada in 1965; Nagpur in 1965; and Barsi in 1973 [18]. In the African continent, the first outbreaks occurred in Kenya and on the Comoros Islands (located on the southeastern coast of Africa) in 2004 [19]. During the 2006 Réunion outbreak, a large number of travelers from industrialized countries became infected, remaining infected when they returned home, which resulted in CHIKV being dispersed to other countries, and in 2007 CHIKV was identified in Italy, where a total of 205 cases of confirmed CHIKV infection were reported between 4 July and 27 September 2007 [20]. Other outbreaks were later reported in Malaysia in 2008–2009 and Bangladesh in 2008, where the CHIKV isolates were similar to the variants isolated in Cameroon, Indian Ocean islands, India, Italy, and Gabon. All these outbreaks were triggered by the emerging Indian Ocean lineage (IOL), a monophyletic lineage descendant from the ECSA phylogroup, which contains the mutation E1-A226V enhancing virus transmission by *Ae. albopictus* mosquitoes. Subsequently, CHIKV autochthonous cases of chikungunya fever were reported in France in 2010 [21]. Thus, CHIKV epidemiology took a dramatic turn after 2004 when this new epidemic virus strain emerged from the ECSA enzootic lineage, leading to virus dispersal among different countries.

In Asia, the first CHIKV case was reported in 1961 in Cambodia, probably caused by the Asian genotype that was circulating in the region at that time [22]. Later the virus was detected in the Philippines in 1965, then in Vietnam in 1966 and 1967, reaching Indonesia in 1972. CHIKV then spread to many territories, including Thailand, Malaysia, Sri Lanka, Singapore, and others (please refer to Figure 1 for a complete description of CHIKV transmission), causing small outbreaks or only sporadic cases. However, after 40 years, CHIKV re-emerged in Sri Lanka in 2007 in an outbreak responsible for more than 37,000 suspected cases [23]. From the perspective of the genetic epidemiology of CHIKV in the Asian continent, the ECSA strain was the most prevalent genotype found in Thailand,

Malaysia, and Singapore during the 2006–2010 period, whereas from 2007 to 2014, the Asian genotype was the most prevalent strain circulating in Indonesia and the Philippines [8].

Small CHIKV outbreaks began being reported in the Americas in December 2013 when the French National Reference Centre for arboviruses confirmed autochthonous cases on Saint Martin Island (an island in the northeast Caribbean Sea); a few days later, about 50 confirmed cases were reported with additional evidence for autochthonous transmission on the island of Martinique. Then, in January 2014, autochthonous cases were also reported in Guadeloupe, Saint Barthelemy, Dominica, and the British Virgin Islands [24]. Interestingly, while in most parts of the Americas both *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes are commonly found, during the Caribbean outbreak *A. aegypti* was the unique potential vector locally reported [24]. From a discrete emergence in the Americas, CHIKV turned into a major public health problem and, by the end of December 2015, nearly one million cases had been notified in the Americas, resulting in 71 deaths, and autochthonous transmission had been confirmed in more than 50 territories. Sequence analysis confirmed that the CHIKV isolated from Saint Martin belonged to the Asian lineage [24]. Subsequent analysis of CHIKV sequences from the Caribbean [25], Trinidad [26], Colombia [27], Panama [28], and Brazil [29] also confirmed the circulation of the Asian lineage. However, in 2015, in Brazil, the ECSA genotype was found in an individual who traveled to Angola and returned to Brazil where he developed symptoms; thus, for the first time during an outbreak, the ECSA genotype was reported in the Americas [29]. In Brazil, *Ae. aegypti* is predominately found in the north, north-east and central regions and is more widespread, whereas *Ae. albopictus* is more common in the cooler Southern areas of the country [30]. Thus, in 2016, the first report of naturally infected *Ae. aegypti* with the chikungunya virus genotype ECSA in the Americas was made available, supporting the hypothesis that *Ae. aegypti* mosquitoes were acting as a vector involved in CHIKV outbreaks in the northeast of Brazil [31]. This is somehow expected since, in Brazil, *Ae. Aegypti* is well known as the main vector for DENV and ZIKV and, according to the Ministry of Health, *Ae. aegypti* is the only CHIKV vector so far reported in Brazilian territory.

In 2015, in the Americas, there were 37,480 CHIKV confirmed cases reported to the Pan American Health Organization (PAHO) regional office, then, in 2016, a total of 146,914 laboratory-confirmed cases were registered. American countries reporting most cases were Brazil, Bolivia, and Colombia. In Brazil, the CHIKV outbreak was aggravated by the concomitant circulation of the other arboviruses DENV and ZIKV, where many patients experienced a dual infection. In fact, initial surveillance studies of arboviral diseases among febrile patients in Brazil identified a significant proportion of patients with serological and molecular evidence of concomitant arbovirus infection [32]. Additionally, small cohort studies identified a few patients with CHIKV severe disease experiencing a dual infection, either coinfecting with ZIKV [33] or DENV [34]. It is of note that in a previous study of adults who had developed a new neurological condition following suspected ZIKV infection, at least four patients also had CNS infection with CHIKV [35]. In fact, the proportion of cases experiencing a dual infection is as high as 36%, as reported by others [36]. By the end of 2020, the Pan American Health Organization reported a total of 103,002 CHIKV cases in the Americas; these numbers were likely impaired by the SARS-CoV-2 pandemic that disorganized the entire health and surveillance systems in many countries.

To the present day, CHIKV continues to be responsible for significant outbreaks worldwide and no specific treatment or vaccines are available to prevent infection. The virus is now fully adapted to an urban transmission cycle, which represents a tremendous risk for many tropical and temperate regions. As demonstrated in Figure 1, many countries, from different parts of the world, have reported current and/or previous CHIKV transmission cases. Thus, the intensification and expansion of vector-borne diseases are likely to be a significant threat posed by climate change. In fact, although many other complicating factors (like mosquito range limits and viral evolution) exist, climate change will lead to a massive increase in exposure to *Aedes*-borne viruses, as predicted by several modeling studies [37,38], in which climate change will result in vector expansion toward temperate

zones. This scenario is of major concern since *Aedes*-borne virus expansion into regions that lack previous exposure is a serious risk for public health, given the potential for explosive outbreaks when arboviruses are first introduced into naïve populations. The threat is aggravated by the cocirculation of other arboviruses that cause similar symptoms in infected individuals, resulting in novel challenges for its diagnosis and treatment. Moreover, the introduction of new strains to a susceptible population may result in an explosive number of cases, saturating the already precarious health systems of developing countries. All the above is also aggravated by the lack of proper treatment and effective control measures (i.e., vaccines and vector control). In this review, we aim to provide an update concerning the epidemiology, pathogenesis, and current status of potential novel vaccines. Although this topic has already been addressed by others, in this review we aim to bring a novel perspective of still underexplored topics on CHIKV infection; these include the current status of vaccine development, which is worth being frequently updated upon, and also the potential of neurological complications on CHIKV infected patients and the potential pathogenic mechanisms of CHIKV.

## 2. Pathogenesis

CHIKV is an alphavirus of the *Togaviridae* family, the virus belongs to the “new world” group of alphaviruses that includes Eastern and Western equine encephalitis, as well as the Venezuelan equine encephalitis (VEE), viruses. The virus has an approximately 12 kb positive-sense RNA genome that encodes two polyproteins, subdivided into four non-structural proteins (nsP1–4) and five structural proteins (C, E3, E2, 6K, and E1). Medically important alphaviruses that cause inflammatory musculoskeletal disease in humans with debilitating symptoms, such as arthralgia, arthritis, and myalgia are classified as “Arthritogenic viruses”; these include chikungunya virus, Ross River virus (RRV), Barmah Forest virus (BFV), O’nyong-nyong virus, the Sindbis group of viruses, and Mayaro virus (MAYV) [39,40]. CHIKV infects multiple cell types, including dendritic cells, macrophages, synovial fibroblasts, endothelial cells, and myocytes. In humans, it also infects osteoblasts, contributing to the joint pathology and erosive disease seen in chronic arthritis patients [41].

In the virion surface, heterodimers of the structural proteins E1 and E2 proteins trimerize to form the “viral spikes”, the glycoprotein E2 is responsible for receptor binding, and E1 for membrane fusion [42]. Given that CHIKV infects a wide range of cell types, cellular proteins interacting with the virus are diverse. Thus, multiple attachment factors and putative receptors for CHIKV and other alphaviruses have been documented [43]. Already known CHIKV mammalian cell receptors include prohibitin (PHB) [44], the phosphatidylserine receptor TIM-1 [45], MXRA8 [46], CD147 protein complex [47], C-type calcium-dependent lectin DC-SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) [48], and, more recently, the four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1) [49]. In mosquitoes, the ATP synthase  $\beta$  subunit was reported as a receptor for CHIKV [50]. Additionally, other phosphatidylserine binding proteins, such as Axl and TIM-4, have also been demonstrated to facilitate CHIKV infection [51]. However, a recent independent study showed that only TIM-1, unlike Axl, is functional as an entry factor for CHIKV infection [52].

Alphaviruses enter host cells by a process dependent on clathrin-mediated endocytosis [53]. More recently, micropinocytosis (which are large uncoated vesicles involved in the unspecific uptake of extracellular material) was identified as an entry pathway for CHIKV into human muscle cells. In this study, CHIKV particles were observed to colocalize with a macropinosome marker. Moreover, cell treatment with various inhibitors of endocytosis, including monodansylcadaverine (receptor-mediated endocytic inhibitor), dynasore (clathrin-mediated endocytic inhibitor), as well as filipin (caveolin-mediated endocytosis inhibitor), resulted in the minimal inhibition of CHIKV infection *in vitro*, whereas the treatment with a macropinocytosis inhibitor, as well as the knockdown of a protein involved in macropinosome formation, resulted in a significant reduction in viral titers [54]. In addition to this, other non-specific entry pathways were also described. It seems that the engulfment of apoptotic blebs is an important infectious mechanism. It was demonstrated that in

HeLa cells, as well as primary fibroblasts, CHIKV triggered apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways, resulting in the formation of apoptotic cell blebs (an irregular bulge in the plasma membrane that eventually blebs off). By hiding inside these apoptotic blebs, CHIKV was able to infect the neighboring cells. Thus, these apoptotic blebs act like Trojan horses, being capable of infecting macrophages and, interestingly, this process of viral replication in macrophages originating from cell blebs did not yield a proinflammatory response, constituting a mechanism by which CHIKV invades host cells and escapes the host response [55].

After infection, the incubation period ranges from three to seven days. Laboratory diagnosis is achieved by IgM-capture ELISA and/or reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assays from blood samples. During the acute phase, the most commonly reported symptoms are high fever, rigors, headache, photophobia, and a petechial rash or maculopapular rash. In comparison to the other well-studied arboviruses DENV and ZIKV, CHIKV infected patients experience a much higher viremia, in which the peak of viremia coincides with the fever onset [56,57]. In addition, the viral load seems to be a good predictor of disease severity, since hospitalized cases had higher viremia than those who did not require hospitalization [56]. It is roughly estimated that 30 to 40% of the infected individuals experience some long-term sequelae; these include persistent arthralgia and/or arthritis, in which severe pain is present in about 37% of individuals with persistent arthralgia [58]. Factors associated with persistence of arthralgia in CHIKV infected patients have not been fully explored, and, from the few available studies, patients aged >40 years, of female sex, and with higher levels of CXCL8 detected during the acute phase of the disease were shown to be associated with CHIKV persistent arthralgia [59–61]. It was shown that human synovial fibroblasts were susceptible and permissive to CHIKV ex vivo experimental infection, and single-cell analysis evidenced a strong upregulation of arthritis-associated genes RANTES/CCL5 and IL-8 from infected cells [62]. In macaques, long-term CHIKV viral RNA expression was associated with mononuclear cell infiltration of the synovial tissue. In this model, the CHIKV infection chronic phase was characterized by the persistence of activated macrophages and presence of viral RNA and viral antigens for up to 2 months in lymphoid organs and liver. Additionally, at high doses of CHIKV, primarily inoculated, features of arthritis, meningoencephalitis, and death of infected animals was observed [63]. Interestingly, the inability of aged rhesus macaques to clear CHIKV experimental infection was found to be correlated with reduced innate and adaptive immune responses compared to adult animals. More precisely, the plasma from aged CHIKV-infected rhesus macaques have lower levels of bioactive type-I IFN (reflected in the diminished activation of type-I IFN stimulated genes Mx1 and ISG56), in addition to reduced anti-CHIKV IgG titers and impaired T cells, as well as B cell responses [64]. In mice, impaired type-I IFN response leads to mild disease, where, after a burst of viral replication in the liver, the virus targets muscle, joint, and skin fibroblasts; a cell and tissue tropism similar to that observed in biopsy samples of CHIKV-infected humans. In a study of neonatal mice, as well as of the adult mouse with a totally abrogated type-I IFN signaling ( $IFN-\alpha/\beta R^{-/-}$ ), CHIKV-associated disease was particularly severe, and this severity correlates with higher viral loads and dissemination to the CNS [65]. Clearly, altogether these data demonstrate that CHIKV disease severity is critically dependent on at least two host factors: age and functionality of type-I IFN signaling.

Although advances have been achieved regarding a better understanding of CHIKV infection, a precise understanding of the immunopathogenic mechanisms of CHIKV induced arthralgia remains unclear. During the acute phase, CHIKV viremia can reach a maximum of  $10^6$  in adults [66] to  $10^9$  RNA copies/mL in children [67], showing a direct correlation with plasma levels of certain cytokines. Thus, as for other infectious diseases, viral load might have a direct influence on the expression levels of proinflammatory cytokines and chemokines, which in turn might influence the presentation of different clinical symptoms. In another study, CHIKV viral load ranged from  $2.91 \times 10^4$  to  $8.55 \times 10^8$  RNA copies/mL, mainly observed when blood was collected within the first 3 days after the symptoms

appeared [68]. These variations among independent studies may be a consequence of the different protocols applied, in which correct assumptions between viral load and disease severity may not be possible across different outbreaks. Although pathogenesis and virulence variation among CHIKV lineages and sublineages have not been fully investigated, there are a few reports in the literature. In one study, performed on suckling mice, both strains (Asian and East/Central/South African) replicated similarly; however, the Asian strain generated higher mortality and upregulation of proapoptotic genes, whereas the East/Central/South African strain caused lower mortality and higher upregulation of antiviral and antiapoptotic genes [69]. Another study demonstrated that the West African (WA) strain produced significantly higher viremia than ECSA, Indian Ocean lineage (IOL), and Asian/American strains in AG129 mice at two days post-infection [70]. In rhesus macaques, comparisons between the WA and ECSA strains found no pathophysiological differences, although the WA strain induced a modestly nonsignificant higher viremia [71]. Based on all the above we may assume that distinct CHIKV lineages vary in virulence, at least when assessed in animal experimental models.

Intriguingly, a few studies showed the presence of IgM against chikungunya virus for an extended period after infection [72,73]. Chopra et al. (2010) reported high levels of CHIKV IgM in a cohort of Indian patients with post-CHIKV rheumatoid arthritis; in this same study, a large percentage of the patients were also IgM+ for a prolonged period of 30 to 180 days post-infection [74]. In a cohort of 57 patients with confirmed infection, CHIKV-IgM was detectable in 7/57 (12.3%) patients after 28.3 months of infection [75]. Based on these findings, we can suggest that prolonged detection of CHIKV specific IgM is linked to virus persistence and although it has not been directly proven, some data from animal experimental models support this hypothesis, as discussed next.

It has been found that CHIKV chronic disease manifestation, resulting in persistent arthralgia disease with arthritis-like symptoms, is more likely to occur in elderly patients (>60 years) with much higher viral loads (up to  $10^{10}$  viruses per milliliter of blood) during the acute phase of the disease; additionally, the IFN- $\alpha$  antiviral immune response and IL-12 levels persisted for months in the chronic group. Higher viral loads in the acute phase were accompanied by higher production of proinflammatory cytokines IFN- $\alpha$  and IL-6, and, as the disease progressed to the chronic phase, IL-17 became detectable. However, persistent arthralgia was associated with higher levels of IL-6 and GM-CSF, whereas patients who fully recovered presented higher levels of eotaxin and HGF [76]. CHIKV chronic disease was also associated with the persistence of CHIKV antigens in synovial macrophages, which was accompanied by a polarized local inflammatory response [77]. More recently, CHIKV RNA and antigens were detected up to 90 days post-infection in the spleen, lymph nodes, liver, and muscle tissue of experimentally infected macaques [63]. In Rag-1<sup>-/-</sup> experimentally infected mice (which lack T and B cells) CHIKV RNA persisted in joint-associated tissues up to at least 16 weeks post-inoculation. The persistence of viral RNA in joint-associated tissues was associated with histopathological evidence of arthritis, synovitis, and tendonitis [78]. Hawman et al. (2016) demonstrated that virus persistence is also linked to a specific CHIKV pathogenic strain. The amino acid at position 82 of the CHIKV E2 glycoprotein, which varies between the strains 181/25 (attenuated) and AF15561 (pathogenic), results in viral persistence in joint tissues of animals infected with the AF15561, while the strain 181/25 is rapidly cleared. These findings suggest that pathogenic CHIKV strains evade E2 domain-B-neutralizing antibodies to establish persistence [79]. Based on all the above we can then add, virus feature variables that could result in a more aggressive infection phenotype to the host factors disease severity, of which viral persistence and viral load seem to be key players. Although these findings from animal models helped to elucidate some aspects of the molecular mechanisms of CHIKV chronic disease pathogenesis, including immune evasion mechanisms, in humans, data about CHIKV virus persistence are not clear. Thus, although the CHIKV-induced prolonged inflammation may be related to virus persistence, this has not yet been fully explored. On the other hand, assumptions can be extrapolated from the closest alphavirus, Ross River virus (RRV). From some in vitro studies, it was

observed that macrophages infected with RRV were capable of producing virions for over 170 days [80,81]. Thus, the development of chronic arthritis in alphavirus infections may result from an inability of the induced immune response to completely clear the virus.

In addition to the persistence mechanism, it was demonstrated that the engulfment of CHIKV-apoptotic cell blebs (apoptotic bodies derived from infected cells) promotes the infection of neighboring cells and macrophages in a noninflammatory (or dormant) manner [55]. In another study, whole blood purified monocytes were experimentally infected with CHIKV, showing sustained virus growth, and since infected monocyte/macrophage cells have been detected in the synovial tissues of chronically CHIKV-infected patients, these cells may behave as the vehicles for virus dissemination [82]. Clearly, this process contributes to a robust and uncontrolled adaptive immune response, leading to autoimmunity against self-antigens present in apoptotic bodies. Additionally, infected macrophages may behave as Trojan horses, helping to disseminate the virus to particular sites, and some of these sites could become “virus reservoirs”, supporting persistent viral replication.

As for other viral infections, cytokines and chemokines are key players in CHIKV immunopathology. During the early acute phase, serum proinflammatory cytokines IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , CXCL10/IP-10, and IL-1 $\beta$  show a strong upregulation. IFN- $\alpha$  is detected early during infection (e.g., on the first day), and its concentration correlates with viral load, which is significantly higher in elderly patients [83]. The elevation of MCP-1, IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , and MIP-1 $\beta$  was most prominent in the chronic phase [84]. Among the initial analysis, IL-1 $\beta$ , IL-6, and RANTES were found to be specific biomarkers associated with severe CHIKV disease in patients from the 2007 Singapore CHIKV outbreak [85]. In another study, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10 levels, and high concentrations of IgG were found to be associated with severe symptoms manifesting in CHIKV patients [86]. TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ -secreting NK-like T cells were high in patients presenting CHIKV persistent arthralgia [87]. In addition to this, a systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya infection showed an association between increased proinflammatory cytokines and arthralgia [88]. However, even though cytokines and chemokines profiles play an important role in viral immunopathology, one limitation of these studies is the fact that they were based on small cohorts and the disease classification did not include patients who developed neurologic or hemorrhagic complications.

Genetic host factors also influence the progression of the infectious disease and its clinical outcome. It has been shown that Toll-like receptor (TLR) polymorphisms may influence human CHIKV-susceptibility and disease progression. More precisely, certain genotypes of TLR-7 (rs3853839) and TLR-8 (rs376487) were significantly associated with CHIKV susceptibility [89]. In a previous study, it was demonstrated that TLR3 polymorphisms rs3775290 and rs6552950 correlated to chikungunya susceptibility and disease severity, respectively [90]. Chikungunya disease was also associated with polymorphism in DC-SIGN (a c-type lectin receptor present on the surface of macrophages and dendritic cells) and TLR3 genes [91]. Taken together, these results substantiate a role for TLRs in the control of CHIKV replication, immunity, and pathology. This can be explained by the fact that CHIKV triggers a strong local type-I IFN response, and the magnitude of this response is crucial to limiting virus replication, thus an altered type-I IFN response may result in enhanced virus replication and persistence. One reasonable explanation is that, just as recently reported for SARS-CoV-2, inborn errors of immunity (IEI) are genetic determinants of severe CHIKV disease. As reviewed by Zhang et al., 2022 inborn errors of the type-I IFN response, including Toll-like receptors (TLR3, TLR7, and TLR8) as well as its downstream signaling molecules (i.e., interferon regulatory factors (IRF)), are implicated in disease exacerbation in COVID-19 patients [92]. In fact, rare IEIs have been related to disease aggravation in several different types of viral, bacterial, fungal, and parasitic infections. In a simplified way, individuals with a “not optimal” type-I IFN response, whatever the underlying determinants, may be unable to prevent virus spread to other organs during the first few days of infection, resulting in virus persistence and chronic inflammation. However, at present, a major challenge is to better understand specific IEIs

and their role in Chikungunya disease. To achieve this, large cohort studies are necessary, and given the short life of the most recent outbreaks, the recruitment of patients may not be feasible. Based on the reduced number of studies focused on CHIKV neuropathogenesis some important questions remain; for example, what is the percentage of neurological complications in CHIKV-infected patients?

Even though CHIKV is not considered a true neurotropic virus (able to invade the neural tissue and replicate in the neurons), sporadic cases of neurological manifestations have been reported from different outbreaks. Clearly, the lack of a more detailed understanding of CHIKV neuropathogenesis may be a direct reflection of the occurrence of the minor outbreaks, limited to well-defined territories and small populations, that have been documented so far. In other words, since the neurological complications of CHIKV infection are rare, small outbreaks often result in a low number of neurological cases that are commonly missed by health professionals. Thus, given that CHIKV neurological complications are infrequent, this aspect of CHIKV infection started to be reported only recently. In a previous study, CHIKV neurological complications were found to be diverse and the most commonly reported neurological complications included encephalitis, myelopathy, peripheral neuropathy, myeloneuropathy, and myopathy [93]. Interestingly, in the La Réunion 2005–2006 outbreak, of the 33 patients admitted to the intensive care unit with confirmed acute chikungunya virus infection, 14 were diagnosed with encephalopathy. Laboratory analysis found the presence of CHIKV specific IgM antibodies in the cerebrospinal fluid (CSF) samples from the vast majority of these patients and also positive virus detection in the CNS from at least two cases [94]. A prospective investigation of suspected Chikungunya cases in hospitalized patients from two large cities (Ahmedabad and Pune) in India, in 2006, registered 99 cases with neurological manifestations, neurological complications included encephalitis (57 patients), encephalopathy (42), and myelopathy (14), or myeloneuropathy (12 patients) [95]. More recently, from a large cohort study from Brazil, CHIKV infection was more often associated with a central nervous system disease (CNS), mainly myelitis, while ZIKV infection (a highly neurotropic arbovirus) was more commonly associated with peripheral nervous system (PNS) disease, particularly Guillain-Barré syndrome. Viral RNA detection in CSF samples of patients presenting a neurological disease reinforced the findings that CHIKV disease is not so rarely associated with CNS infection [96]. A major challenge to correctly diagnose a CHIKV neurological case lies in the fact that often CHIKV cocirculates with other arboviruses, and, clearly, one of the substantial limitations to better studying CHIKV neuropathogenesis resides in the fact that large cohort studies are necessary to capture a sufficient number of patients presenting neurological symptoms. This is also complicated by the fact that CHIKV outbreaks are usually short-lived, often showing seasonality, which does not allow adequate time to conduct new studies.

Explorations of the pathogenic mechanism of CHIKV infection in the brain are scarce. It has been shown that SH-SY5Y cells, a human neuroblastoma cell line widely applied to model neuroinflammation *in vitro*, are susceptible to CHIKV infection. Following infection with a CHIKV virus belonging to east/central/south African genotypes isolated from the 2006 Indian epidemic, these cells showed features of apoptosis, such as caspase-3 activation, cleavage of PARP, and cytochrome-c release, suggesting the implication of virus-induced apoptosis in disease pathogenesis [97]. In young mice, CHIKV viral antigens and RNA were present in the cortex of experimentally infected animals at two days post-infection, resulting in an expressive host proteome modification in the brain [98]. In another study, CHIKV infection resulted in the upregulation of several interferon-regulated genes in mouse brain tissues and a human neuronal cell line IMR-32 [99]. In BALB/c mice, CHIKV virus was found to replicate in the brain with a peak titer of  $10^4$  at 6 days post-infection, infecting, preferentially, neuronal cells of the cerebellum [100]. Interestingly, CHIKV infection does not result in altered blood–brain barrier (BBB) permeability. It seems that CHIKV targets primarily the choroid plexus epithelial cells, which are highly susceptible to infection via the apical route and, to a lesser extent, via the basal route, suggesting that CHIKV accesses the CNS through the choroid plexuses. The virus exhibits

a marked tropism for the meninges, whereas it does not infect the brain microvessels and parenchyma and does not induce tissue alteration at the brain parenchyma level. Thus, in contrast to other well-known encephalitogenic alphaviruses, CHIKV infection is associated with reversible CNS symptoms, as a result of its inability to infect the brain parenchyma and neurons [65]. Clearly, these studies are valuable and shed some light on neurological CHIKV pathogenesis; however, they run into the lack of a more suitable animal model for CHIKV experimental infection, since they were based on neonatal and/or type-I deficient mouse infection models.

### 3. Vaccines and Treatment

Although CHIKV is now endemic in many regions, at the moment no vaccines are available, and the treatment of CHIKV infected patients is mainly based on the use of anti-inflammatory drugs for symptomatic relief. Importantly, a CHIKV vaccine needs to be economical, easy to handle, and easy to transport, thus enabling developing countries to be able to afford a mass vaccination campaign. At present, there are several preclinical vaccines in development and a limited number of clinical trials are currently being carried out across the globe. Since CHIKV persistent arthralgia disease shares some clinical similarities with rheumatoid arthritis (RA), some widely employed disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), such as methotrexate, sulfasalazine, leflunomide and hydroxychloroquine, have been utilized but with limited efficacy [101]. Many different antivirals have been investigated as potential therapeutics against CHIKV. Different approaches were employed by several research groups to identify novel potential CHIKV antiviral drugs and drug candidates that have been repurposed to inhibit CHIKV replication; however, none of them are currently under clinical evaluation. An up-to-date and complete review of these findings is presented by Hucke and Burget (2020) [102] and Battisti et al. (2021) [103].

CHIKV preclinical candidate vaccines under preclinical development are diverse; these include a whole-virus inactivated vaccine [104], a VEE/CHIKV chimeric vaccine [105], a recombinant adenovirus vectored vaccine [106], a DNA-based CHIKV vaccine [107], a virus-like particle (VLP) vaccine [108], and a live-attenuated vaccine that has a stronger and longer-term immune response [109]. More recently, mRNA-based vaccines became available due to their emergency use authorization during the SARS-CoV-2 pandemic; thus, as for CHIKV, pharmaceutical companies are now developing immunization strategies based on mRNA vaccines and some clinical trials are under evaluation. Although vaccination strategies against CHIKV are diverse, currently only a few vaccine candidates are under clinical trial evaluation (please refer to Table 1 for a complete list of vaccines currently under clinical trial evaluation). Since these vaccines are in a late stage of development, we will focus on discussing their preliminary results, when available, and the potential for large-scale use in the general population.

**Table 1.** Summary of all the current vaccines under a clinical trial evaluation, either Phase I/II or Phase III. These vaccines are discussed in more detail below.

Vaccine	Technology	Virus Strain	CHIKV Immunogen	Number of Doses	Development Stage	Developer	Reference
VLA1553	Live attenuated	LR2006 OPY1	A5nsP3	Single-dose	Phase III	Valneva Austria GmbH	NCT0483844 [110,111]
BBV87	Inactivated whole virus	ECSA genotype	Whole virus	Two doses	Phase II and Phase III	International Vaccine Institute/Bharat Biotech International	NCT04566484 and CTRI/2017/02/007755
MV-CHIK-202	Measles-vectored	pTM-MVschw-CE3E26KE1	C-E3-E2-6K-E1	One or Two doses	Phase II	Themis Bioscience	[112]
VRC-CHKVLP059-00-VP/PXVX0317	VLP	West African strain/37997	E1, E2 and C	Two doses	Phase II and Phase III	US National Institutes of Health and PaxVax	NCT03483961, NCT02562482, and NCT05072080 and [113]

Table 1. Cont.

Vaccine	Technology	Virus Strain	CHIKV Immunogen	Number of Doses	Development Stage	Developer	Reference
CHIKV TSI-GSD-218	Live attenuated	Southeast Asian strain/AF15561	Whole Virus	Single-dose	Phase II	US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases and University of Maryland	[114,115]
VAL-181388	mRNA-based	-	mRNA encoding C, E3, E2, 6k, E1	Two doses	Phase I	ModernaTX, Inc	NCT03325075
CHIKV001 (ChAdOx1-Chik)	Adenoviral vector	Multiple	C, E3, E2, 6k, E1	Single-dose	Phase I	Jenner Institute, University of Oxford	[116]
mRNA-1944	mLNP-mRNA-based	-	mRNA encoding CHKV-24 IgG (monoclonal)	One or Two doses	Phase I	ModernaTX, Inc	[117]

Abbreviations: MV measles virus; VLP virus-like particle;  $\Delta$ 5nsP3 five viruses with deletions in the nsP3 protein region ( $\Delta$ 5nsP3 mutants); LNP lipid nanoparticle encapsulated.

Recently, Kose et al. (2019) reported the results of a preclinical evaluation of a lipid nanoparticle (LNP)-encapsulated mRNA, encoding the light and heavy chains of a human monoclonal antibody (named CHKV-24 IgG) and targeting the CHIKV E2 glycoprotein, which elicited high levels of biologically active CHIKV-neutralizing antibodies when administered into mice or cynomolgus macaques [118]. The authors employed a strategy based on antibody therapy from previously known neutralizing antibodies, encoding their sequences into mRNA molecules that were delivered by infusion with very promising results. This study concluded a now phase 1 clinical trial, where the safety and pharmacology of mRNA-1944 (lipid nanoparticle-encapsulated mRNA, encoding the heavy and light chains of the CHIKV monoclonal-neutralizing antibody CHKV-24) in humans was evaluated; results showed both detectable *in vivo* expression and detectable *ex vivo* neutralizing activity of this formulation, representing a treatment option for CHIKV infection [117]. This strategy is supported by the recent large-scale testing of mRNA vaccines in phase 3 clinical trials that demonstrated protective efficacy against symptomatic SARS-CoV-2 infection, leading to the licensing of SARS-CoV-2 mRNA based vaccines in many countries. However, these data have some limitations since the duration of the neutralizing antibody response was assessed only up to 48 h after mRNA-1944 intravenous infusion; thus, longer-term studies are needed. Clearly, the use of this strategy is limited to therapeutic use only; therefore, we can speculate that the mRNA-1944 vaccine will not be available to low and middle-income countries, as was observed for SARS-CoV-2 mRNA vaccines. Another point that deserves discussion is that the mRNA-1944 vaccine requires intravenous administration, limiting its use to hospitals or specialized health care centers.

An early developed CHIKV vaccine, named TSI-GSD-218, was also evaluated in a clinical trial study. This is a live attenuated vaccine obtained from a serially passaged, plaque-purified live CHIKV strain derived from a serum isolate (CHIK strain 15561), obtained from an infected patient during the 1962 outbreak of CHIK disease in Thailand. Fifty-nine volunteers were immunized one time subcutaneously with TSI-GSD-218 and fourteen were immunized with a placebo formulation. Except for transient arthralgia in five vaccine recipients, the number and severity of local and systemic reactions and abnormal laboratory tests after immunization were similar in TSI-GSD-218 and placebo recipients. Induction of neutralizing antibodies was observed from a high percentage (98%) of TSI-GSD-218 vaccinees at 28 days after immunization, and 85% of these remained seropositive at one year after immunization [115]. Despite the promising results, this vaccine never advanced to a phase III clinical trial, and, given that this vaccine was developed in the year 2000, we may consider it now abandoned and it will not be available on the market.

A live attenuated vaccine based on the infectious clone of the La Réunion strain, CHIKVLR2006-OPY1, was developed [110]. This virus strain was genetically modified in the gene encoding the nonstructural replicase complex protein nsP3, which resulted in the attenuation of the virus *in vivo*; this vaccine was named VLA1553 and was designed

by Valneva, a French pharmaceutical company. The immunization strategy was designed to protect against all circulating CHIKV genotypes and even, eventually, against other alphaviruses that are closely related to CHIKV [111,119]. In a phase I clinical trial study of VLA1553, the factors evaluated and determined were the safety and immunogenicity of the three escalating doses in adults, including revaccination after 6 or 12 months of the last dose administered. Phase I results of this study were promising, as the vaccination induced high titers of neutralizing antibodies after a single dose. The achieved seroconversion rate of 100% was maintained over one year after dosing at months 6 and 12. Vaccinees were protected from vaccine-induced viremia, which indicates its efficacy. By providing protection only after a single dose, this vaccine is promising, especially in regions that have outbreaks of CHIKV infection. Reported adverse events were predominantly headache, fever, and fatigue, followed by muscle and joint pain after immunization; however, these symptoms are commonly reported after vaccination with other vaccines in the general population and are not a major concern [120]. This vaccine is now under a phase III clinical trial in Brazil and results concerning its efficacy should be available soon.

A phase III clinical trial of a virus-like particle (VLP) CHIKV based vaccine is currently recruiting participants. This vaccine, named PXVX0317, was developed by PaxVax, a USA vaccine manufacturing company that worked in collaboration with the National Institute of Health and the Department of Defense, USA. This is a multi-center, randomized, double blind, placebo controlled phase III clinical trial study to evaluate the safety and immunogenicity of PXVX0317 in healthy adult and adolescent subjects. The primary outcome is to assess the induction of anti-Chikungunya virus (CHIKV) neutralizing antibody geometric mean titers by different formulations and schedules. Immunization strategy was designed in a two dose regimen administered in a 30 day (approximately) interval. Some adverse effects reported included nausea, injection site pain, fatigue, malaise, myalgia, arthralgia, and headache, but no serious adverse effects were reported. These effects were more frequently reported from groups who received a higher dose antigen of 20 micrograms of aluminum hydroxide gel (Alhydrogel) adjuvanted CHIKV VLP PXVX0317 on days 1 and 29, followed by 400 micrograms of aluminum hydroxide gel (Alhydrogel) adjuvanted CHIKV VLP PXVX0317 on day 547 ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03483961), Identifier: NCT03483961).

Results from a phase I clinical trial of the candidate recombinant chimpanzee adenovirus-vectored vaccine ChAdOx1-Chik were recently made available. ChAdOx1-Chik contains the full-length polyprotein of CHIKV, including capsid, 6k, and envelope E3, E2, and E1. Vaccine construction was based on the analysis of the full-length structural polyprotein sequences for CHIKV from all lineages, which were collected from the NCBI protein database, sequences were aligned, and the structural cassette CHIKV sequence derived from various CHIKV lineages was codon-optimized and rescued in vitro to generate the recombinant chimpanzee adenovirus-vectored vaccine [106]. Clinical trial participants received a single intramuscular injection of ChAdOx1-Chik at one of the three preestablished dosages ( $5 \times 10^9$ ,  $2.5 \times 10^{10}$  and  $5 \times 10^{10}$ ) and were followed up for 6 months. ChAdOx1-Chik was safe at all doses tested with no serious adverse reactions documented. Adverse events were self-limited with mild or moderate intensity. Broadly neutralizing antibodies against the four CHIKV lineages were found in all participants as early as 2 weeks after vaccination [116]. An advantage of this strategy resides in the fact that adenoviruses represent the most widely used viral-vectored platform for vaccine design, showing great potential for use in the general population. Moreover, novel adenoviral vectors including nonhuman adenoviral vectors have emerged to be the further improved vectors for vaccine design and are now being increasingly explored for vaccine development. However, given the wide use of the SARS-CoV-2 vaccine ChAdOx1-S, significant adverse effects started to be reported, these include thrombocytopenia and major arterial and venous thrombosis [121] that were associated with a rare development of immune thrombotic thrombocytopenia mediated by platelet-activating antibodies against platelet factor 4 (PF4) [122], raising concerns about the safety of adenovirus vectored vaccines.

A recombinant live Schwarz strain measles-vectored CHIKV vaccine, which was designed to express CHIKV virus structural proteins, is currently under clinical evaluation. This strategy was based on the insertion of the entire subgenomic open reading frame (ORF) encoding the CHIKV structural genes (C-E3-E2-6K-E1); CHIKV structural genes were inserted in the intergenomic region of phosphoprotein (P) and matrix protein (M) as additional transcription units into the infectious cDNA of the Schwarz measles vaccine (MV). Measles vaccination has the advantage of being safely used for more than 40 years in over 1 billion children, representing a powerful vaccine platform that has been extensively evaluated in the general population [123]. Moreover, measles vaccine strains are genetically stable and, given it is a negative-stranded RNA genome, reversion to pathogenicity or integration into the host cell genome is virtually impossible and has never been documented [124]. In preclinical trials, the MV was showed to be an effective and safe carrier for CHIKV antigens and may enhance pre-existing measles immunity [125]. In phase II, a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial, the vaccine candidate showed great promise in preventing Chikungunya infection; this is attributed to its safety and immunogenicity in healthy adults. Vaccine schedule consisted of a lyophilized MV-CHIKV-202 formulation administered in two different concentrations as follows:  $5 \times 10^4$  and  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> per dose in an injectable volume of 0.3 mL water, MV-CHIKV was administered in three intramuscular injections on days 0, 28, and 196. A control group, defined by the administration of a live virus formulation containing the attenuated Schwarz measles virus strain (Priorix), was also evaluated. Study participants were randomly assigned to receive Priorix or the MV-CHIKV vaccine candidate. Preliminary data demonstrated that the high dose groups ( $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>) presented significantly higher concentrations of neutralizing antibodies than lower dose regimen ( $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>) immunization, although CHIKV neutralizing antibodies were detected in all MV-CHIK immunized groups, either after one or two immunizations. Seroconversion rate at 28 days after the second immunization ranged from 50% to 96% [112].

Another vaccine which is also showing promise in its clinical trial phases is the BBV87 vaccine, formulated with an inactivated whole virus, based on the east/central/south African genotype strain. This type of strategy uses whole virus nonreplicant particles that cannot convert to their virulent form. The inactivation of CHIKV can be performed by means of some components, such as: 1,5-iodonapil azide [126], ultraviolet (UV) [127], formalin, and  $\beta$ -propiolactone [104]. In the case of the BBV87 vaccine, the method of viral inactivation is formalin, which is commonly used for the production of inactivated viral vaccines and has also been evaluated in preclinical trials with CHIKV. These assays revealed that viral inactivation with formalin induced high titers of neutralizing antibodies and presented immunogenic potential to neutralize the viral infection, making it a promising method for the development of new vaccines against CHIKV [128]. In a phase I study of the BBV87 vaccine carried out in India, the vaccine was found to have the potential to generate a satisfactory immune response against CHIKV. The study was registered in 2017 by Bharat Biotech International Ltd. in the Clinical Trial Registry—India. Based on these results, this study has advanced and is in phase II and III clinical trials in Costa Rica. The study is recruiting healthy individuals aged between 12 and 65 years in Panama and Costa Rica and has a strategy of administering two doses of the vaccine. Phase II, blinded observer, is divided into parts A and B and will use the BBV87 vaccine (20  $\mu$ g/40  $\mu$ g), formulated with 0.25 mg of aluminum hydroxide, to select the dose. Phase III, represented by part C, will use a placebo comparator, saline solution, which will confirm the selected dose and analyze the immunogenicity. The geometric mean of neutralizing antibody titers and seroconversion rates will be measured 28 days after the first dose of BBV87/placebo and 28 days after the second dose. At 6 months after the second dose, only parts B and C will be analyzed (Clinical Trials Registry—India (CTRI), Number CTRI/2017/02/007755).

Overall, CHIKV vaccine development aims at the induction of neutralizing antibodies. Although antibodies are crucial for protection against many infectious diseases, for some infectious diseases suboptimal levels of antigen-specific antibodies or non-neutralizing

antigen-specific antibodies may enhance infectivity and disease severity through a phenomenon known as antibody-dependent enhancement (ADE). This phenomenon has been observed in vitro for the closely related alphavirus RRV [80] and, although CHIKV ADE has not been reported to date, care must be taken.

#### 4. Concluding Remarks

As CHIKV is rapidly spreading through many countries, vaccination of the susceptible population is the most powerful method to control infection. The present review highlights important considerations concerning aspects of pathogenesis, immunology, and clinical manifestations resulting from CHIKV infection. A better understanding of the mechanisms of CHIKV disease, its different clinical manifestations, and the constant interest of the scientific community in the search for a method that prevents the infection resulted in significant advances in the development of a safe and effective vaccine. In this way, in this review we emphasized a discussion of the more recent updates of the more advanced vaccine clinical trials, some of them moving to their final phase; these trials are now showing encouraging results and we may expect to have a CHIKV vaccine available to the general population very soon. As CHIKV is rapidly spreading through many countries, vaccination of the susceptible population is a powerful method to control infection. On the premise of making vaccines available to middle- and low-income countries, usually the most CHIKV affected countries so far, an ideal vaccine should be thermo stable and easy to produce, transport, and store. In addition, their administration should be convenient and long-term protection is highly desirable. Regarding pathogenesis, crucial questions to be addressed still remain; for example, the role of the immune system in the development of chronic and or neurologic diseases has yet to be deciphered. We have recently started to see an increase in neurological associated arboviruses diseases; this is, in part, because of the recent introduction of the virus to the South American population and associated large outbreaks. Based on the data presented here, we recommend that in endemic areas, CHIKV should be tested for in all patients presenting with acute neurological symptoms. Therefore, novel laboratory algorithms must be established to catch the real impact of arboviral infections.

**Author Contributions:** Writing original draft preparation T.Y.V.d.L.C.; writing, review and editing M.R.P.; review and editing S.O.d.P., writing, review, supervision, funding acquisition and conceptualization R.F.d.O.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Franca, R.F.O. received funding from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco/FACEPE, grant agreement nos. APQ-0055.2.11/16 and APQ-0044.2.11/16 and JBS—Fazer o Bem faz Bem.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Ross, R.W. The Newala epidemic. III. The virus: Isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J. Hyg.* **1956**, *54*, 177–191. [[CrossRef](#)]
2. Robinson, M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. I. Clinical features. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1955**, *49*, 28–32. [[CrossRef](#)]
3. Silva, L.A.; Dermody, T.S. Chikungunya virus: Epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 737–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Cunha, R.V.D.; Trinta, K.S. Chikungunya virus: Clinical aspects and treatment—A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2017**, *112*, 523–531. [[CrossRef](#)]
5. Appassakij, H.; Khuntikij, P.; Kemapunmanus, M.; Wutthananarungsan, R.; Silpapojakul, K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: A blood transfusion threat? *Transfusion* **2013**, *53*, 2567–2574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tritsch, S.R.; Encinales, L.; Pacheco, N.; Cadena, A.; Cure, C.; McMahon, E.; Watson, H.; Porras Ramirez, A.; Mendoza, A.R.; Li, G.; et al. Chronic Joint Pain 3 Years after Chikungunya Virus Infection Largely Characterized by Relapsing-remitting Symptoms. *J. Rheumatol.* **2020**, *47*, 1267–1274. [[CrossRef](#)]

# APÊNDICE B- IDENTIFICATION OF A VIRULENT NEWCASTLE DISEASE VIRUS STRAIN ISOLATED FROM PIGEONS (*COLUMBIA LIVIA*) IN NORTHEASTERN BRAZIL USING NEXT-GENERATION GENOME SEQUENCING



Case Report

## Identification of a Virulent Newcastle Disease Virus Strain Isolated from Pigeons (*Columbia livia*) in Northeastern Brazil Using Next-Generation Genome Sequencing

Mylena Ribeiro Pereira<sup>1,2</sup>, Lais Ceschini Machado<sup>3</sup>, Rodrigo Dias de Oliveira Carvalho<sup>3</sup>, Thaise Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti<sup>2</sup>, Givaldo Bom da Silva Filho<sup>1</sup>, Telma de Sousa Lima<sup>1</sup>, Sílvio Miguel Castillo Fonseca<sup>1</sup>, Francisco de Assis Leite Souza<sup>1</sup>, Gabriel da Luz Wallau<sup>3</sup>, Fábio de Souza Mendonça<sup>1,\*</sup> and Rafael Freitas de Oliveira Franca<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Animal Diagnosis, Federal Rural University of Pernambuco, Recife 52171-900, PE, Brazil; myribeiro@gmail.com (M.R.P.); givaldo.bom@ufrpe.br (G.B.d.S.F.); telma.sousa@ufrpe.br (T.d.S.L.); silvio.castillo@ufrpe.br (S.M.C.F.); chicoleite@hotmail.com (F.d.A.L.S.)

<sup>2</sup> Department of Virology and Experimental Therapy, Oswaldo Cruz Foundation—Fiocruz, Recife 54740-465, PE, Brazil; thaiseyasmine@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Entomology, Oswaldo Cruz Foundation—Fiocruz, Recife 54740-465, PE, Brazil; lais.machado@fiocruz.br (L.C.M.); odrigodoc2@gmail.com (R.D.d.O.C.); gabriel.wallau@cpqam.fiocruz.br (G.d.L.W.)

\* Correspondence: fabio.mendonca@pq.cnpq.br (F.d.S.M.); rafael.franca@fiocruz.br (R.F.d.O.F.)

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Pereira, M.R.; Machado, L.C.; de Oliveira Carvalho, R.D.; de Lima Cavalcanti, T.Y.V.; da Silva Filho, G.B.; de Sousa Lima, T.; Fonseca, S.M.C.; de Assis Leite Souza, F.; da Luz Wallau, G.; de Souza Mendonça, F.; et al. Identification of a Virulent Newcastle Disease Virus Strain Isolated from Pigeons (*Columbia livia*) in Northeastern Brazil Using Next-Generation Genome Sequencing. *Viruses* **2022**, *14*, 1579. <https://doi.org/10.3390/v14071579>

Academic Editor: Kiril M. Dimitrov

Received: 13 May 2022

Accepted: 15 July 2022

Published: 21 July 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Abstract:** Newcastle disease virus (NDV), also known as avian paramyxoviruses 1 (APMV-1) is among the most important viruses infecting avian species. Given its widespread circulation, there is a high risk for the reintroduction of virulent strains into the domestic poultry industry, making the surveillance of wild and domestic birds a crucial process to appropriately respond to novel outbreaks. In the present study, we investigated an outbreak characterized by the identification of sick pigeons in a large municipality in Northeastern Brazil in 2018. The affected pigeons presented neurological signs, including motor incoordination, torticollis, and lethargy. Moribund birds were collected, and through a detailed histopathological analysis we identified severe lymphoplasmacytic meningoencephalitis with perivascular cuffs and gliosis in the central nervous system, and lymphoplasmacytic inflammation in the liver, kidney, and intestine. A total of five pigeons tested positive for NDV, as assessed by rRT-PCR targeted to the M gene. Laboratory virus isolation on Vero E6 cells confirmed infection, after the recovery of infectious NVD from brain and kidney tissues. We next characterized the isolated NDV/pigeon/PE-Brazil/MP003/2018 by next-generation sequencing (NGS). Phylogenetic analysis grouped the virus with other NDV class II isolates from subgenotype VI.2.1.2, including two previous NDV isolates from Brazil in 2014 and 2019. The diversity of aminoacid residues at the fusion F protein cleavage site was analyzed identifying the motif RRQKR↓F, typical of virulent strains. Our results all highlight the importance of virus surveillance in wild and domestic birds, especially given the risk of zoonotic NDV.

**Keywords:** avian paramyxovirus 1; Newcastle disease virus; pigeons; domestic birds

