

LIVIA GRAÇA POZZI

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA DOPAMINA COMO POTENCIAL ANTIVIRAL
CONTRA A INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2023**

Trabalho realizado no Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Doutora Luciana Jesus da Costa e co-orientação do Mestre Pedro Telles Calil.

FICHA CATALOGRÁFICA**CIP - Catalogação na Publicação**

P893a Pozzi, Livia Graça
Avaliação in vitro da dopamina como potencial
antiviral contra a infecção pelo vírus Chikungunya /
Livia Graça Pozzi. -- Rio de Janeiro, 2023.
84 f.

Orientadora: Luciana Jesus da Costa.
Coorientador: Pedro Telles Calil.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Chikungunya. 2. Antiviral. 3. Receptores para
Dopamina. 4. Receptores para Dopamina. 5. Estresse
Oxidativo. I. da Costa, Luciana Jesus, orient. II.
Calil, Pedro Telles, coorient. III. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): Livia Graça Pozzi

DRE: 120024009

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Irania Assunção Miranda (Presidente)
Dr. Sharton Vinicius Antunes Coelho
Dr. Gabriela Assis-de-Lemos
Prof. Dr. Maitê Vaslin de Freitas Silva (Suplente)

**Título da Monografia: "Avaliação *in vitro* da dopamina como potencial antiviral contra a
infecção pelo vírus Chikungunya"**

Local: Sala D-27 do IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 13 de dezembro de 2023 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi arguido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de Dezembro de 2023.

NOTA:

10

Banca Examinadora:




Prof. Dr. Irania Assunção Miranda (Presidente)

10



Dr. Sharton Vinicius Antunes Coelho

10



Dr. Gabriela Assis-de-Lemos

Prof. Dr. Maitê Vaslin de Freitas Silva (Suplente)

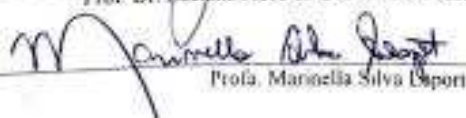
Aluno(a):

**Orientador(a)
(e coorientador):**


Livia Graça Pozzi

Prof. Dr. Luciana Jesus da Costa e Dr. Pedro Telles Cali

**Coordenadora de
TCC:**


Prof.ª Maricélia Silva Espert

AGRADECIMENTOS

Cheguei ao final da graduação e estou em um mix de sentimentos, mas o principal deles é gratidão. Eu não teria conseguido, primeiramente, entrar na UFRJ se não fosse o apoio de diversas pessoas. A minha mãe, Roseli, obrigada por me mostrar desde a infância a importância dos estudos e nunca cobrar nada de mim, mas sim incentivar. Sua força e perseverança me ensinaram a nunca desistir dos meus sonhos. Obrigada por ter feito o impossível por mim. Eu amo você. As minhas madrinhas, Rose e Beatriz, muito obrigada por terem acreditado em mim e investido em mim financeiramente. Se eu pude fazer um curso pré-vestibular e me manter na faculdade, foi graças a vocês. Minha irmã, Luma, estar com você desde pequena dividindo todos os momentos sempre me deixou mais feliz e segura. Obrigada por compartilhar as minhas conquistas e pelo apoio de sempre, que é essencial para mim. Aos meus familiares, que me viram crescer e me ajudaram a conquistar os meus sonhos, e amigos, que estudaram comigo e sempre torceram por mim, obrigada por todo incentivo e consideração.

Na UFRJ, fazer estágio no LAGIIVIR, reafirmou em mim o desejo de ser cientista. Em especial, agradeço a minha orientadora, Luciana. Academicamente, você foi e continua sendo a minha maior inspiração. Você foi muito mais do que uma simples chefe, você me incentivou a continuar tentando mesmo quando não estava dando certo. A sua empolgação com um simples resultado não me deixava desanimar e muito menos desistir. Você me inspira não só enquanto cientista, mas como uma pessoa que persiste nos seus objetivos. Faço experimentos longos porque quero, pelo menos, ser um pouco do que você é como profissional. Você me dá suporte e incentivo para isso, e sou extremamente grata. Obrigada por ter me aceitado no laboratório e pela dedicação em me supervisionar.

Ao meu co-orientador, Pedro, obrigada por me acolher no laboratório, além de me ensinar e falar da ciência com tanto amor. Espero um dia ter a mesma paixão pela pesquisa que você tem. Sara, a mente brilhante que pensou neste projeto, obrigada por toda disponibilidade e ajuda. Me sinto honrada em fazer parte de uma pesquisa que você desenvolveu inicialmente.

Ao Grupo Costa, não esperava participar de uma equipe tão boa. Todos os pós-docs, sem exceção, sempre estavam disponíveis para me ajudar de alguma forma. No final da graduação, espero levar comigo o entusiasmo do Romario, a paciência do Gustavo, a responsabilidade da Isa e o cuidado da Marcela. Aos pós-graduandos, Rafaela e Luísa, obrigada por todo apoio, principalmente Pedro Gomes, que foi um dos meus maiores incentivadores e sempre se preocupava com o meu bem-estar.

Aos meus colegas de Iniciação Científica, obrigada por todas as risadas. Suy, não esperava criar uma amizade tão forte e verdadeira em um ambiente de trabalho. Você me mostrou que eu sempre posso contar com você para conversar, desabafar e compartilhar bons momentos. Bia, você tem um dos corações mais generosos que eu conheço, sempre disposta a ajudar qualquer pessoa. Você deixa o laboratório mais divertido com as suas risadas e se tornou uma das minhas amigas mais especiais, sei que posso contar com você para qualquer coisa. Raphael, apesar de (sempre) me estressar com você, você está lá por mim e me ajuda em qualquer circunstância. E Raquel, uma das pessoas mais generosas que eu conheço, obrigada por me acalmar nos momentos de caos e por nunca se importar em me ajudar no laboratório. Os meus agradecimentos se estendem ao Grupo Arruda, pelo auxílio e pelas discussões muito enriquecedoras. Em especial, agradeço à Lana pela disponibilidade em me ajudar com experimentos nessa reta-final.

A faculdade, muitas vezes, é um ambiente cansativo que fez com que eu duvidasse da minha capacidade em diversos momentos, mas eu tive amigos que tornaram esse processo mais fácil. Mari, minha amiga da graduação, hoje uma das minhas melhores amigas, sempre te admirei pela sua dedicação e persistência. A sua amizade me incentivou a ser uma aluna e pessoa melhor, tentando alcançar os meus limites e confiando que eu posso conquistar o que quiser. Você acreditou em mim mesmo quando eu não tinha fé no meu potencial. Obrigada por tudo.

O congresso na Bahia formou laços de amizade que eu pretendo levar para a vida. Fabi, mesmo quando não éramos tão próximas, você me defendeu quando eu não conseguia fazer isso. Você tem um coração enorme e compartilhar momentos da faculdade com você é incrível. Gabi, obrigada pelos conselhos de ouro e por ter me acolhido nos meus momentos mais tristes. Você é a amiga que está sempre disponível para nos ouvir e te ter ao meu lado deixa os meus dias no laboratório mais felizes.

Aos meus amigos da graduação, estou feliz de ter dividido essa jornada com vocês. Viviane, não teve um dia que você deixou de acreditar em mim. A sua amizade foi muito especial durante a faculdade e sempre terei um carinho enorme por você. Carol, Crystal e Johari, obrigada por sempre arrancar risadas de mim e deixar tudo mais leve. Gabriel e Letícia, obrigada por todos os resumos trocados e por torcerem por mim.

Agradeço também à banca avaliadora por ter aceitado o convite e às agências de fomento FAPERJ, CAPES e CNPq.

RESUMO**LIVIA GRAÇA POZZI****AValiação *in vitro* da DOPAMINA COMO POTENCIAL ANTIVIRAL
CONTRA A INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA****Orientadora: Luciana Jesus da Costa****Co-orientador: Pedro Telles Calil**

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um arbovírus que ocasiona uma doença febril aguda com alta morbidade, que pode evoluir para a cronicidade e afetar a qualidade de vida dos pacientes. A dopamina (DA) é um neurotransmissor monoaminérgico que atua através da interação com os seus receptores (DRs), divididos em duas famílias: tipo 1 (DR1 e DR5) e tipo 2 (DR2, DR3 e DR4). Os DRs apresentam diversas funções metabólicas, como a redução do estresse oxidativo. A infecção por CHIKV induz o estresse oxidativo, o que tem sido associado com a ativação da autofagia, sendo benéfico para a replicação viral. A hipótese do trabalho apresentado é que a DA limitaria a infecção por CHIKV devido à capacidade de reduzir o estresse oxidativo. O objetivo é avaliar o impacto do tratamento com a DA sobre a infecção por CHIKV. Em mamíferos, a DA atua principalmente no sistema nervoso central (SNC). Portanto, o modelo ideal para o estudo *in vitro* são células de origem neuronal, a exemplo da linhagem celular SH-SY5Y, que são células não diferenciadas de neuroblastoma de origem humana. Inicialmente, foi caracterizada a infecção por CHIKV nessa linhagem. As células foram infectadas com a cepa brasileira BHI3745 isolada na Feira de Santana na Bahia e a RJ-IB1 isolada na epidemia de CHIKV de 2016 no Rio de Janeiro. A infecção foi realizada em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs), como 0.01, 0.05 e 0.1, e apresentaram produção de progênie viral, atingindo mais de 1×10^{10} PFU/mL. Além disso, ambos os isolados induziram inibição da síntese proteica global da célula hospedeira e morte celular, o que evidencia que a linhagem SH-SY5Y é altamente permissiva ao CHIKV. A expressão dos 5 DRs também foi confirmada nessas células através de RT-qPCR, tendo maior expressão de DR2 e DR4. Para avaliar o efeito da DA sobre a infecção, primeiro foi necessário saber se somente o composto pode afetar a viabilidade celular. Através do ensaio de MTT, até 200 μ M de DA, observa-se que a viabilidade celular permanece superior a 80%. Em seguida, foi analisado o impacto da DA sobre a replicação viral na linhagem SH-SY5Y. Essas células foram infectadas com o CHIKV na MOI 0.01 e tratadas antes ou depois da infecção com diferentes concentrações de DA. A produção de partículas virais infecciosas foi quantificada por ensaio de Plaque. Em 24 h.p.i., tanto o pós-tratamento por 24 horas, quanto o pré-tratamento por 5 minutos, com 10 μ M de DA, inibiu mais de 70% a replicação viral. A DA também apresentou efeito antiviral sobre a infecção por CHIKV na linhagem celular HEK293T, que são células renais humanas com alta permissividade ao CHIKV, além de serem um importante modelo para estudo sobre os DRs devido à presença do sistema dopaminérgico renal. Nessas células, o tratamento com 10 e 50 μ M de DA inibiu a replicação

viral em 24 h.p.i. em 86%, tendo indução da expressão dos DRs. Dessa forma, conclui-se que o aumento da expressão dos DRs possivelmente está associado com a redução da infecção na linhagem celular HEK293T. Ademais, a DA apresenta atividade antiviral em diferentes linhagens celulares humanas, mas ainda não se sabe quais vias estão relacionadas com esse efeito.

Palavras-chaves: Chikungunya; Dopamina; Antiviral; Receptores para Dopamina; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

LIVIA GRAÇA POZZI

**IN VITRO EVALUATION OF ANTI-CHIKUNGUNYA VIRUS ACTIVITY OF
DOPAMINE**

Orientadora: Luciana Jesus da Costa

Co-orientador: Pedro Telles Calil

***Abstract* da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

The Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that causes an acute febrile disease with high morbidity, which can lead to chronicity, affecting patients' quality of life. Dopamine is a monoaminergic neurotransmitter that acts through the interaction with its receptors, which are divided into two families: D1-like (DR1 and DR5) and D2-like (DR2, DR3 and DR4). The dopamine receptors (DRs) have many metabolic functions, including the reduction of oxidative stress in cells. CHIKV infection leads to oxidative stress, which has been associated with autophagy induction and a delay in caspase-dependent cell death being beneficial to virus replication. Because of that, we hypothesized that DA reduction of oxidative stress in infected cells could limit CHIKV replication. The objective was to evaluate the DA treatment impact on CHIKV infection. In mammalian organisms, DA acts specially in central nervous system. Thus, the best *in vitro* model is cell lineages of neuronal origin that express all DRs, as the cell line SH-SY5Y, that are undifferentiated human neuroblastoma cells. First of all, it was characterized the infection by CHIKV in this cell line. Cells were infected with the CHIKV ECSA BHI3745 and RJ-IB1 Brazilian isolate that was obtained during the CHIKV epidemic in Rio de Janeiro in 2016. The infection was performed in different multiplicities of infection (MOIs), 0.01, 0.05 and 0.1, and showed production of infectious viral particles, peaking at 24 hours post-infection (h.p.i.) for BHI3745 and 36 h.p.i. Both cell lines induced host-cell translation inhibition and apoptosis cell-death, which shows that are very permissive to CHIKV infection. Also, the expression of all 5 DRs was confirmed in those cells by RT-qPCR. DR2 and DR4 were the most expressed. To evaluate the effect of DA on viral replication, first it was necessary to characterize the DA effect in cell's viability. It was shown by MTT assays that cell viability was above 80% up to 300 μ M of DA. Next, the impact of DA on viral replication in SH-SY5Y cells was observed. These cells were infected with CHIKV at a MOI of 0.01 and treated for 5 minutes before or 24 hours after initial infection with different concentrations of DA. The production of infectious viral particles was quantified by Plaque assay. At 24 h.p.i., both DA pre- and post-treatment at 10 μ M inhibited 70% of viral replication. Moreover, DA showed anti-CHIKV activity in HEK293T cell line, which are a human embryonic kidney cell highly permissive to CHIKV infection and being an important model to study DRs for its role in the renal dopaminergic system. In these cells, the treatment with 10 and 50 μ M of DA reduced viral replication by 86% at 24 h.p.i. When compared to untreated infectious HEK293T cells, expression of DRs was increased by 2 to 4-fold upon DA treatment. In conclusion, the increase in DRs expression could be related to infection reduction in HEK293T cells. Also DA had antiviral

effect in different human cell lines, but the targets involved with this activity are still unknown.

Keywords: Chikungunya; Dopamine; Antiviral; Dopamine Receptors; Oxidative Stress.

RESUMO PARA LEIGOS

LIVIA GRAÇA POZZI

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA DOPAMINA COMO POTENCIAL ANTIVIRAL
CONTRA A INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Orientadora: Luciana Jesus da Costa

Co-orientador: Pedro Telles Calil

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus Chikungunya (CHIKV) causa uma doença em que, na maioria dos casos, os pacientes sentem uma dor no corpo muito forte a ponto de não conseguir fazer as suas atividades normalmente, como andar! A doença pode durar por meses e até mesmo anos, prejudicando ainda mais a vida do indivíduo. Outra coisa muito prejudicial é que não existem medicamentos para combater diretamente o vírus, então o nosso grupo buscou compostos que poderiam ter esse efeito, como a dopamina. A dopamina é uma molécula que tem a capacidade de enviar um sinal para as células. Ela faz isso ao se ligar com moléculas muito específicas e de grande afinidade, chamadas receptores. Para a dopamina, tem dois tipos de receptores: o tipo 1 (DR1 e DR5) e o tipo 2 (DR2, DR3 e DR4). Os dois tipos diminuem um processo fisiológico chamado de estresse oxidativo, que é um desequilíbrio no número de compostos oxidantes e não oxidantes nas células. O interessante é que o CHIKV faz o contrário: ele induz o estresse oxidativo e isso é benéfico para ele! Ou seja, talvez a dopamina, por interagir com os seus receptores, poderia prejudicar a ação do vírus por reduzir um processo importante para a infecção. Por isso, o objetivo é ver se a dopamina prejudica a infecção pelo CHIKV. Em seres humanos e animais, a dopamina tem uma grande atuação no sistema nervoso central, nos neurônios. Então primeiro foram utilizadas células de origem neuronal (células de neuroblastoma humano), que é o melhor modelo para estudar a dopamina. Um vírus não é capaz de infectar todos os tipos de célula e no caso do CHIKV, não se sabia se ele poderia infectar as células de neuroblastoma humano utilizadas no estudo. Por isso, nós fizemos um ensaio para observar se essas células, quando infectadas com o CHIKV, podem liberar vírus infeccioso. Ocorre liberação de vírus infeccioso e o CHIKV também leva a uma intensa morte das células. Outro fato interessante é que essas células expressam todos os 5 receptores para dopamina. Ao avaliar o efeito da adição dopamina antes ou após a infecção nessas células, foi observado que nessas duas condições, a dopamina impediu o estabelecimento do vírus, chegando a inibir a infecção em mais de 70%! Esse efeito pôde ser visto em outra célula também, como células renais. Nesse caso, a dopamina inibiu a infecção em 86%. Nessas células renais infectadas e tratadas com a dopamina, houve um aumento dos receptores para dopamina em comparação com células apenas infectadas, o que mostra uma grande possibilidade dos receptores contribuírem para a redução da infecção. Intrigantemente, a dopamina combateu o CHIKV em duas células diferentes! Mas ainda não se sabe como isso ocorre e o que estaria associado com a atividade do neurotransmissor.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Genoma do CHIKV..... | 21 |
| Figura 2 – Partícula do CHIKV..... | 22 |
| Figura 3 – Ciclo replicativo do CHIKV..... | 25 |
| Figura 4 - Sinalização dos receptores para dopamina..... | 33 |
| Figura 5 – Tratamento com a DA na linhagem celular SH-SY5Y..... | 47 |
| Figura 6 - A linhagem celular SH-SY5Y é permissível à infecção por CHIKV..... | 53 |
| Figura 7 - O CHIKV produz dsRNA e induz o <i>shutoff</i> traducional na linhagem celular SH-SY5Y..... | 54 |
| Figura 8 - O CHIKV induz morte celular na linhagem celular SH-SY5Y..... | 56 |
| Figura 9 - O CHIKV induz morte celular na linhagem celular SH-SY5Y..... | 57 |
| Figura 10 - Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular SH-SY5Y..... | 58 |
| Figura 11 - Impacto do tratamento com a DA sobre a replicação do CHIKV..... | 60 |
| Figura 12 - Expressão dos DRs na linhagem celular HEK 293T após o plaqueamento das células..... | 61 |
| Figura 13 - Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular HEK293T..... | 62 |
| Figura 14 - Impacto do pós-tratamento com a DA sobre a infecção pelo CHIKV..... | 63 |
| Figura 15 - Expressão dos DRs diante da infecção por CHIKV..... | 64 |
| Figura 16 - Expressão dos DRs diante do tratamento com 10 ou 50 μ M de DA..... | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGAS

| | |
|---------------|---|
| 6K..... | Peptídeo viral 6K |
| AADC..... | <i>Aromatic L-Amino Acid Descarboxylase</i> |
| AC..... | <i>Adenylate cyclase</i> |
| cAMP..... | Cyclic Adenosine Monophosphate |
| cDNA..... | complementary DNA |
| CHIKV..... | <i>Chikungunya Virus</i> |
| DA..... | Dopamina |
| DARPP-32..... | <i>Dopamine- and cAMP-Regulated Neuronal Phosphoprotein</i> |
| DBH..... | <i>β-hidroxiylase</i> |
| DDC..... | <i>DOPA Decarboxylase</i> |
| DMEM..... | <i>Dulbecco's modified Eagle médium</i> |
| DR1..... | <i>Dopamine Receptor 1</i> |
| DR2..... | <i>Dopamine Receptor 2</i> |
| DR3..... | <i>Dopamine Receptor 3</i> |
| DR4..... | <i>Dopamine Receptor 4</i> |
| DR5..... | <i>Dopamine Receptor 5</i> |
| E1..... | Proteína do envelope 1 |
| E2..... | Proteína do envelope 2 |
| E3..... | Proteína do envelope 3 |
| ECSA..... | <i>East/Central/South/Africa</i> |
| eIF2..... | <i>Eukaryotic Initiation Factor 2</i> |
| ERK..... | <i>Extracellular Signal-Regulated Kinase Quinase</i> |
| dsRNA..... | <i>Double-strand RNA</i> |

| | |
|---------------------------|--|
| GAPDH..... | <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> |
| GDP..... | <i>Guanosine Diphosphate</i> |
| GPCR..... | <i>G-Protein-Coupled Receptor</i> |
| gRNA..... | <i>RNA genômico</i> |
| GTP..... | <i>Guanosine Triphosphate</i> |
| HCV..... | <i>Hepatitis C Virus</i> |
| HEK293T..... | <i>Human Embryonic Kidney</i> |
| IFNAR..... | <i>Interferon-α/β Receptor</i> |
| IFN-I..... | <i>Interferon tipo 1</i> |
| IFN- α/β | <i>Interferon-α/β</i> |
| IL-17..... | <i>Interleucina 17</i> |
| IRF3..... | <i>Interferon Regulatory Factor 3</i> |
| ISG..... | <i>Interferon Stimulated Gene</i> |
| L-Dopa..... | <i>L-dihydroxyphenylalanine</i> |
| MDA5..... | <i>Melanoma Differentiation-Associated Protein 5</i> |
| MEF..... | <i>Mouse Embryonic Fibroblast</i> |
| mRNA..... | <i>Messenger RNA</i> |
| mTOR..... | <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> |
| mTORC1..... | <i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i> |
| mTORC2..... | <i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 2</i> |
| Mxra8..... | <i>Matrix Remodeling Associated 8</i> |
| NADPH..... | <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i> |
| NK..... | <i>Células Natural Killer</i> |
| nsP1..... | <i>Proteína não estrutural 1</i> |

| | |
|-------------------|---|
| nsP123/ 1234..... | Poliproteína não estrutural 123/ 1234 |
| nsP2..... | Proteína não estrutural 2 |
| nsP3..... | Proteína não estrutural 3 |
| nsP4..... | Proteína não estrutural 4 |
| PAMP..... | <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> |
| PBS..... | <i>Phosphate-Buffered Saline</i> |
| PC..... | Proteína do capsídeo |
| PCR..... | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PFU..... | <i>Plaque Forming Unit</i> |
| PKA..... | <i>Protein Kinase A</i> |
| PKR..... | <i>Protein Kinase R</i> |
| PP1..... | <i>Protein Phosphatase 1</i> |
| PRR..... | <i>Pattern Recognition Receptor</i> |
| Rbp1..... | <i>Retinol Binding Protein 1</i> |
| RIG..... | <i>Retinoid-Induced Gene</i> |
| ROS..... | <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| S6K1..... | <i>Ribosomal S6 Kinase 1</i> |
| SFB..... | Soro fetal bovino |
| sgRNA..... | RNA subgenômico |
| STEP..... | <i>Striatal-Enrichment Protein Tyrosine Phosphatase</i> |
| TH..... | <i>Tirosine-Hydroxylase</i> |
| tRNA..... | <i>Transfer RNA</i> |
| vgRNA..... | <i>Viral Genomic RNA</i> |

ÍNDICE

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 19 |
| | 1.1. Vírus Chikungunya (CHIKV)..... | 19 |
| | 1.1.1. Genoma e Partícula viral..... | 20 |
| | 1.1.2. Ciclo replicativo..... | 22 |
| | 1.1.3. Efeito da infecção por CHIKV na célula hospedeira..... | 26 |
| | 1.1.3.1. A infecção por CHIKV e o Estresse Oxidativo..... | 29 |
| | 1.2. Dopamina (DA)..... | 31 |
| | 1.2.1. Receptores para dopamina (DRs)..... | 32 |
| | 1.2.2. Atuação da dopamina sobre infecções virais..... | 35 |
| | 1.3. Modelo de infecção por CHIKV <i>in vitro</i>..... | 35 |
| 2. | JUSTIFICATIVA..... | 38 |
| 3. | OBJETIVO..... | 40 |
| | 3.1. Objetivo geral..... | 40 |
| | 3.2. Objetivos específicos..... | 40 |
| | 3.2.1. Caracterizar a infecção por CHIKV na linhagem celular SH-SY5Y..... | 40 |
| | 3.2.2. Avaliar a citotoxicidade da DA sobre linhagens celulares de interesse, como SH-SY5Y e HEK293T..... | 40 |
| | 3.2.3. Analisar a expressão dos DRs nas linhagens celulares de interesse..... | 40 |
| | 3.2.4. Avaliar a liberação de partículas virais infecciosas do CHIKV diante do tratamento com DA em SH-SY5Y e HEK293T..... | 40 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS..... | 41 |
| | 4.1. Cultura de células | 41 |
| | 4.2. Estoque viral | 41 |
| | 4.3. Dopamina..... | 41 |
| | 4.4. Cinética da infecção por CHIKV..... | 42 |
| | 4.5. Microscopia de Fluorescência..... | 42 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.6. | SUnSET..... | 43 |
| 4.7. | Citometria de Fluxo..... | 44 |
| 4.8. | Viabilidade celular..... | 44 |
| 4.9. | Cinética de expressão dos DRs | 45 |
| 4.10. | Tratamento com a DA sobre a infecção por CHIKV <i>in vitro</i> | 46 |
| 4.10.1. | Linhagem celular SH-SY5Y..... | 46 |
| 4.10.2. | Linhagem celular HEK293T..... | 47 |
| 4.11. | RT-qPCR..... | 47 |
| 4.12. | Ensaio de Plaque..... | 48 |
| 4.13. | Estatística..... | 49 |
| 5. | RESULTADOS..... | 50 |
| 5.1. | Caracterização da infecção por CHIKV na linhagem celular SH-SY5Y..... | 50 |
| 5.2. | Cinética de expressão dos DRs na linhagem celular SH-SY5Y após o plaqueamento..... | 56 |
| 5.3. | Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular SH-SY5Y..... | 57 |
| 5.4. | Efeito da DA sobre a infecção por CHIKV na linhagem celular SH-SY5Y..... | 58 |
| 5.5. | Cinética de expressão dos DRs na linhagem celular HEK293T após o plaqueamento..... | 60 |
| 5.6. | Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular HEK293T..... | 61 |
| 5.7. | Efeito da DA sobre a infecção por CHIKV em células HEK293T..... | 62 |
| 5.8. | Efeito da infecção por CHIKV e do tratamento com a DA sobre a expressão dos DRs em células HEK293T..... | 63 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 65 |
| 7. | CONCLUSÃO..... | 75 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 76 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Vírus Chikungunya (CHIKV)

O CHIKV, agente etiológico da Febre Chikungunya (CHIKVF) e da Doença Artralgia Incapacitante, pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* (Khan et al., 2002). A transmissão ocorre pela picada da fêmea do mosquito *Aedes spp* infectada (Maharaj et al., 2015). Após o período de incubação, que consiste em 2 a 4 dias, inicia-se a fase aguda da infecção, com duração de até 21 dias (Frutuoso et al., 2020). O paciente apresenta, principalmente, febre e dores articulares e musculares intensas; além de cefaleia, *rash* cutâneo e mialgia (Raghavendhar, 2019). A doença também pode evoluir para a cronicidade, sendo caracterizada por uma artralgia incapacitante, que perdura por meses ou anos (Medina-Citrón et al., 2021).

O vírus foi descrito pela primeira vez em 1952, durante um surto no sul da Tanzânia (Lumsden, 1955). Desde então, casos da infecção foram reportados em países da África, como a Uganda e a Nigéria, e no sudeste da Ásia, como a Índia (Carey et al., 1969; Moore et al., 1974). Contudo, em 2004 e 2005 houve um aumento do número de surtos de CHIKVF em Ilhas do Oceano Índico, afetando grande parte da população (Pfeffer et al., 2008; Sergon et al., 2008). Entre 2005 e 2006, a infecção atingiu a ilha La Reunion (Tsetsarkin et al., 2007). Neste surto, foi caracterizada pela primeira vez a presença de uma mutação na região gênica da proteína do envelope 1 (E1) na maior parte dos indivíduos infectados (Tsetsarkin et al., 2007). A mutação que acarretou a substituição A226V na E1, a qual levou ao aumento da infecciosidade, da transmissibilidade e da disseminação do CHIKV em mosquitos da espécie *Aedes albopictus*, contribuindo para o espalhamento do vírus para outras regiões do globo terrestre (Tsetsarkin et al., 2007).

Com os diversos surtos da CHIKVF relatados a partir de 2004, houve uma disseminação do vírus no ocidente e em áreas subtropicais (Petersen e Powers, 2016; OMS, 2022). Houve um aumento dos casos da doença em viajantes nas Américas, sendo documentados 28 casos por ano da infecção por CHIKV nos Estados Unidos entre 2006 e 2013 (Yactayo et al., 2016). A partir de dezembro de 2013, o CHIKV foi considerado emergente no continente americano, quando os primeiros relatos da CHIKVF foram feitos nas Ilhas do Caribe (Yactayo et al., 2016).

Entre 2013 e 2022, mais de 270 mil casos confirmados, em laboratório, da infecção por CHIKV foram notificados nas Américas, principalmente no Brasil (Fritsch et al., 2022). Os primeiros casos autóctones da CHIKVF notificados no Brasil foram em julho de 2014, nos estados de Amapá e Bahia (Frutuoso et al., 2020). O CHIKV, contudo, se disseminou pelo país, afetando aproximadamente 60% dos municípios nacionais e levando ao desenvolvimento de epidemias reportadas até 2022 (Souza et al., 2023).

Nos últimos anos, os surtos de CHIKVF foram relatados também na Europa, na África e nas Ilhas Pacíficas, o que configurou um grande problema à saúde pública (Petersen e Powers, 2016). Apesar da CHIKVF apresentar baixa taxa de mortalidade, os relatos de infecção por Chikungunya foram acompanhados por uma alta morbidade e pelo desenvolvimento de manifestações clínicas graves (Petersen e Powers, 2016; Vidal et al., 2020). Além disso, o tratamento e a prevenção contra a CHIKVF são muito limitados, consistindo na administração de anti-inflamatórios e no controle do inseto vetor (Jeengar et al., 2021; Millsapps, Underwood e Barr, 2022).

1.1.1. Genoma e Partícula Viral

O CHIKV possui genoma de RNA fita simples polaridade positiva não segmentado de 11,8 Kb de comprimento (Khan et al., 2002). O terminal 5' é modificado pela adição da 7-metilguanossina (Cap) e o terminal 3' é poliadenilado (Khan et al., 2022). O genoma possui duas *open Reading frame* (ORFs), ou seja, duas fases de leitura abertas que codificam para duas poliproteínas, e três regiões não traduzidas (UTRs), que se encontram entre as ORFs e nas extremidades 5' e 3' (Li et al., 2023). A primeira ORF, localizada em dois terços do genoma próximos à extremidade 5' codificam para proteínas não estruturais (Fig. 1) (Khan et al., 2002). Já a segunda ORF, localizada em um terço do genoma próximo à extremidade 3', que será sintetizado como um RNA subgenômico (sgRNA), codifica para as proteínas estruturais (Khan et al., 2002).

As proteínas não estruturais podem ser sintetizadas em duas poliproteínas: P123 e P1234 (Fig. 1) (Shirako e Strauss, 1994). No genoma viral, o códon de parada UGA encontra-se no c-terminal de nsP3, no local de clivagem entre nsP3 e nsP4 (Jones et al. 2017; Li et al., 2023). Dessa forma, ocorre a síntese da poliproteína nsP123 (Jones et al., 2017; Li et al., 2023). Entretanto, a síntese de nsP1234 ocorre a partir do mecanismo de *read-through*, no

qual o RNA transportador (tRNA) insere na região do códon de parada um nucleotídeo, não sendo formado o códon de parada UGA no local de nsP3 (Jones et al., 2017). Nesse contexto, síntese proteica continua até atingir o próximo códon de parada UGA localizado ao final de nsP4, permitindo a síntese da poliproteína nsP1234 (Jones et al., 2017; Li et al., 2023).

As proteínas estruturais correspondem à proteína do capsídeo (CP), proteína do envelope 3 (E3), proteína do envelope (E2), peptídeo viral 6K (6K) e E1; que serão traduzidas em uma única poliproteína (Fig. 1) (Khan et al., 2002). Contudo, no motivo presente na sequência que codifica para 6K, pode ocorrer o fenômeno de *Frameshift*, que consiste em uma mudança na fase de leitura do mRNA viral (Firth et al., 2008). Durante a síntese das proteínas estruturais, o ribossomo pode encontrar uma estrutura secundária no RNA complexa, tendo a interrupção da tradução para desfazer essa estrutura (Andreu-Sanchez et al., 2021). Após a resolução, a síntese proteica retorna, mas há a possibilidade do ribossomo voltar ou adiantar um nucleotídeo, alterando a fase de leitura (Andreu-Sanchez et al., 2021). Desse modo, ocorre a síntese de uma proteína estrutural adicional, o peptídeo *TransFame* (TF), que está fusionado à proteína 6K (Firth et al., 2008).

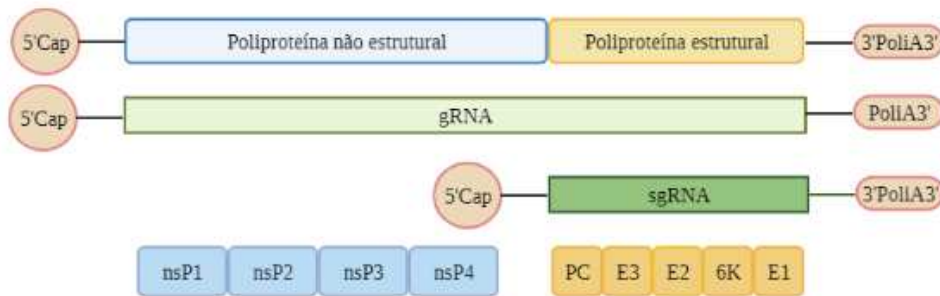


Figura 1. Genoma do CHIKV. O CHIKV apresenta uma fsRNA polaridade positiva como genoma. 2 terços próximos à extremidade 5' codificam para a poliproteína não estrutural, que será posteriormente processada em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4. 1 terço próximo à extremidade 3', que corresponde ao sgRNA, codifica para a poliproteína estrutural, que será posteriormente processada em PC, E3, E2, 6K e E1.

O RNA genômico viral é envolto pelo capsídeo, constituído de 240 cópias da proteína C em arranjo icosaédrico na simetria T4 (Fig. 2) (Metz et al., 2013). Delimitando o capsídeo, há o envelope, que é uma membrana fosfolipídica, formado pelas glicoproteínas E1 e E2 (Fig. 2) (Metz et al., 2013). As proteínas E1 e E2 formam um heterodímero e estão arranjadas em *spikes* triméricas (Metz et al., 2013). Apesar da proteína E3 não compor as partículas

virais maduras, ela é de grande importância para o ciclo viral (Simizu et al., 1984). A partícula viral é esférica e possui aproximadamente 70 nanômetros de diâmetro (Fig. 2) (Khan et al., 2002).

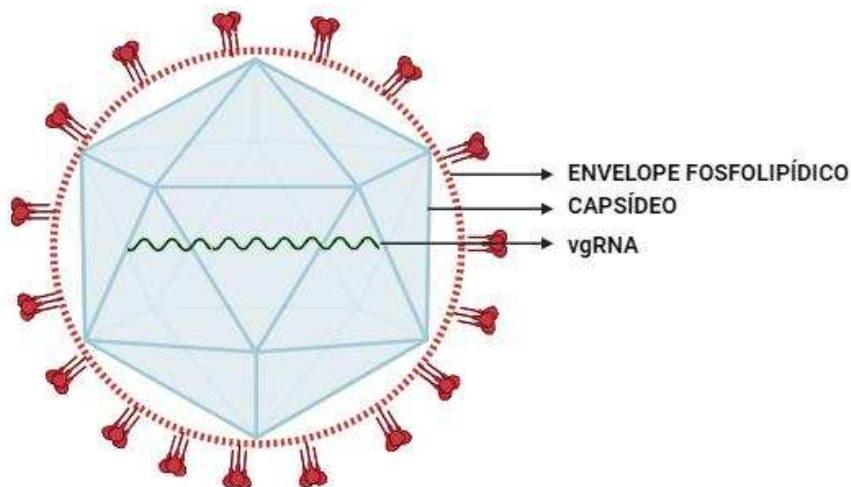


Figura 2. Partícula do CHIKV. O vgRNA é envolto por 240 cópias da PC, formando o nucleocapsídeo. O capsídeo é delimitado por uma membrana fosfolipídica constituída de heterodímeros das proteínas E1 e E2, formando uma partícula viral esférica.

1.1.2. Ciclo replicativo

No organismo humano, o CHIKV é capaz de exercer o seu ciclo replicativo em diversos tipos celulares, como células endoteliais, epiteliais e musculares; fibroblastos, queratinócitos e macrófagos (Sourisseau et al, 2007). A replicação é citopática, estando associada com a indução de apoptose em células infectadas (Sourisseau et al., 2007).

Inicialmente, o vírus realiza a adsorção na superfície de uma célula hospedeira susceptível à infecção (McAllister et al., 2020; Kiuri et al., 2021). O CHIKV interage com receptores de adesão, como os receptores de fosfatidilserina, a exemplo do domínio de mucina e imunoglobulina de células T (TIM-I), e os glicosaminoglicanos (McAllister et al., 2020; Kiuri et al., 2021) (Fig. 2). Em seguida, através do domínio B da proteína E2, o CHIKV se liga ao seu receptor de entrada presente na membrana celular (Silva et al., 2014). Em 2018, Zhang e colaboradores evidenciaram que a Proteína de Matriz associada a remodelamento 8 (Mxra8) atua como receptor de entrada para o CHIKV, já que na deficiência dessa molécula, houve redução da patogênese e dos níveis da infecção por CHIKV (Zhang et al., 2018).

Ao ocorrer a ligação da proteína E2 com o Mxra8, há o estímulo para a internalização da partícula viral na célula por endocitose mediada pela formação de vesículas revestidas de

clatrina (Fig. 3) (Hoornweg et al., 2016; Li et al., 2010; Zhang et al., 2018). O escape do capsídeo viral do interior do endossoma é dependente de pH. O pH ácido no interior do endossoma tardio leva a uma mudança conformacional irreversível na estrutura das proteínas do envelope viral, tendo a dissociação do heterodímero E1-E2 (Li et al., 2010). A proteína E1 forma heterotrímeros e induz a fusão da membrana do vírus com a membrana do endossoma, permitindo a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (Fig. 3) (Li et al., 2010). Em seguida, a CP interage com ribossomos da célula hospedeira, ocorrendo o desnudamento do vgRNA (Singh e Helenius, 1992).

Inicialmente, há a síntese de proteínas não estruturais em duas poliproteínas: P123 e P1234 (Fig. 3) (Shirako e Strauss, 1994). No RNA mensageiro (mRNA), o stop codon UGA está presente no c-terminal de nsP3 e determina a síntese da poliproteína P123 (Jones et al., 2017). No entanto, em uma frequência de 5 a 20% pode ocorrer o mecanismo *read-through*, tendo a síntese da poliproteína P1234 (Shirako e Strauss, 1994; Jones et al., 2017; Müller et al., 2023).

As poliproteínas são processadas pela protease viral, nsP2, e as proteínas individuais originadas consistem no complexo de replicação (Fig. 3) (Shirako e Strauss, 1994). O complexo de replicação é translocado para a membrana plasmática, formando as esférulas de replicação, que contém a fita simples negativa de RNA e o intermediário de replicação, a fita dupla de RNA (dsRNA) (Spuul et al., 2011). As esférulas de replicação protegem a síntese do RNA genômico viral do reconhecimento pela resposta imune inata do hospedeiro, uma vez que a dsRNA é reconhecida como padrão molecular de patógeno (PAMP) por sensores citosólicos do sistema imune (Meurs et al., 1990).

As proteínas do complexo de replicação são muito importantes para a síntese do RNA genômico (Fata et al., 2002). A nsP1 faz o ancoramento do complexo de replicação na membrana plasmática para a formação das esférulas, e também atua no capeamento da extremidade 5' do RNA viral através da sua atividade guanilil-metiltransferase na porção N-terminal (Jones et al., 2020). A nsP2, além de ser responsável pelo processamento das poliproteínas através da sua atividade cisteína protease na porção C-terminal, apresenta um domínio helicase na porção N-terminal (Law et al., 2021). A nsP3 induz o remodelamento na membrana necessário para a formação das esférulas e é essencial para o início da

replicação (Abraham et al., 2018). A nsP4 é a RNA polimerase viral e é o fator chave para a eficiência da síntese do genoma do CHIKV (Tomar et al., 2006).

A nsP4 sintetiza uma fita negativa de RNA a partir do RNA genômico ao reconhecer a extremidade 3'. A nsP4 pode reconhecer tanto a extremidade 3' do RNA negativo, quanto uma sequência interna, conhecida como sequência promotora do RNA subgenômico. Logo, o RNA negativo será utilizado como molde para a produção de novas fitas positivas de RNA, sintetizando tanto o mRNA genômico quanto o subgenômico, respectivamente (Fig. 3) (Li e Stollar, 2007). Em seguida, ocorre a síntese da poliproteína estrutural a partir do sgrRNA no citoplasma celular (Fig. 3) (Shin et al., 2012).

Após a tradução do sgmRNA, ocorre o processamento da poliproteína por proteases virais e celulares (Fig. 3) (Ou et al., 1982; Melton et al., 2002). A proteína estrutural C, responsável pelo empacotamento do genoma do CHIKV, apresenta um domínio serino-protease que possibilita a sua auto-clivagem. Essa proteína se ligará ao vgRNA para a formação do nucleocapsídeo (Fig. 3) (Thomas et al., 2010). A proteína E3 possui uma sequência sinal para a translocação da poliproteína viral do citoplasma celular para o retículo endoplasmático, onde é clivada por proteases celulares em E3-E2 (p62), 6K e E1 (Lobigs et al., 1990; Liu e Brown, 1993; Ren et al., 2021). A proteína 6K atua no brotamento da partícula viral da célula hospedeira (Melton et al., 2002). Destaca-se que durante a síntese da poliproteína estrutural, pode ocorrer o fenômeno de *frameshift* em uma frequência de 10 a 18%, resultando na síntese da proteína TF, que participa da montagem viral, substituindo a síntese da proteína E1 e 6K (Firth et al., 2008; Harrington et al., 2020).

No retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, as proteínas p62 e E1 serão glicosiladas, uma modificação pós-traducional (Fig. 3) (Ren et al., 2021). Essas duas proteínas formam um heterodímero dentro do retículo, sendo importante para o enovelamento e o transporte de E1 para a membrana plasmática durante a liberação da partícula viral (Curtis e Simon, 1988). A formação do dímero também é relevante porque protege a proteína E1 da fusão à membrana prematuramente, uma vez que, nesta conformação, apresenta maior estabilidade à variação do pH (Fields e Killian, 2015). No transporte para a membrana plasmática, p62 será clivada por uma protease da célula hospedeira, a furina, em proteína E2 e E3, que ainda permanecem associadas, protegendo a proteína E1 da fusão prematura (Fields e Killian, 2015). Essas proteínas são transportadas

para a membrana plasmática, finalizando a formação de novas partículas virais e tendo o brotamento do CHIKV (Fig. 4) (Lu e Kiellian, 2001). A liberação da proteína E3 ocorre somente no ambiente extracelular, onde o pH é neutro, completando o processo de maturação da partícula viral e permitindo que ela esteja pronta para infectar em uma nova célula hospedeira (Fields e Killian, 2015).

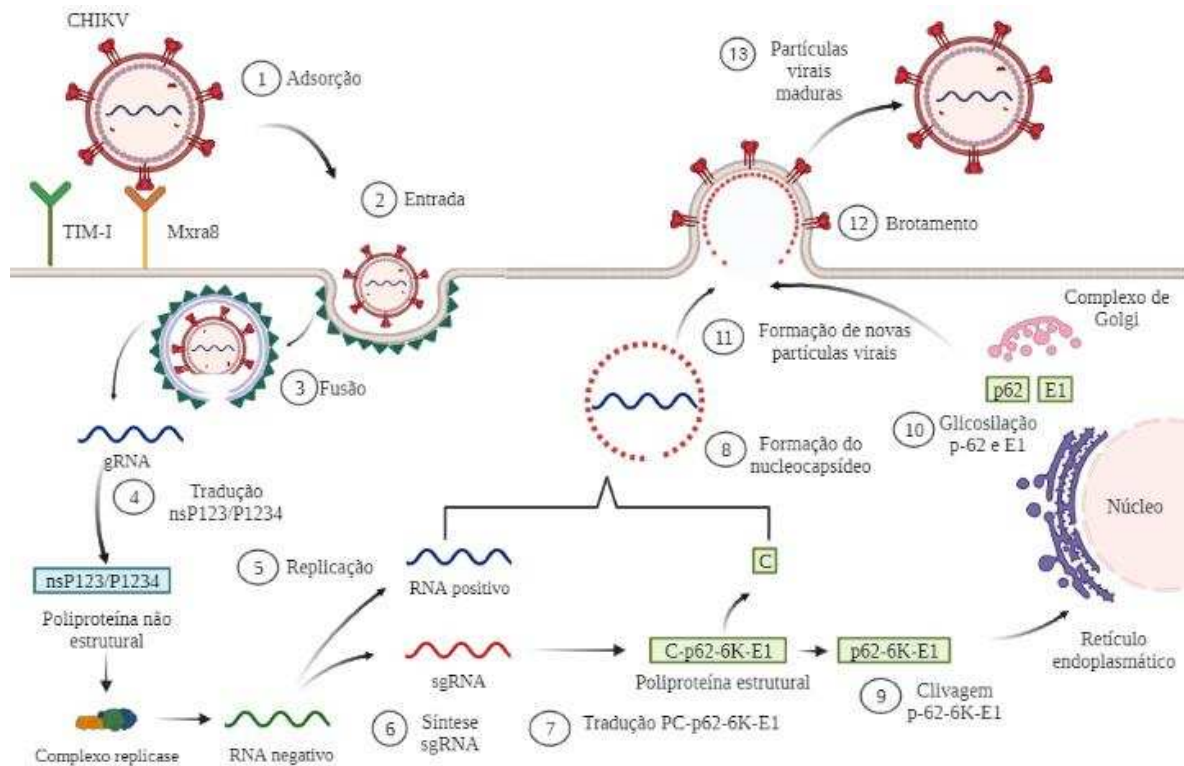


Figura 3. Ciclo replicativo do CHIKV. O CHIKV interage com seu receptor celular, o Mxra8, tendo a adsorção (1). Em seguida, ocorre uma sinalização para a entrada da partícula viral para a célula hospedeira mediada por vesículas revestidas de clatrina (2). Depois ocorre a fusão entre a membrana do endossomo e a membrana viral, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma (3). Com a liberação do nucleocapsídeo, o gRNA fica exposto no citoplasma, sendo traduzido e tendo primeiro a produção de proteínas não estruturais (4). Após a síntese das proteínas estruturais, é formado o complexo replicase, que se direciona até à fita de RNA positiva (5). Em seguida, ocorre produção de sgRNA (6). Posteriormente, há a tradução do sgRNA, tendo síntese da poliproteína estrutural (7). Com a síntese da poliproteína estrutural, há a dissociação de C da poliproteína, que se associa ao RNA positivo tendo a formação do nucleocapsídeo, restando p62-6K-E1, que modula a síntese de lipídeo (8). A poliproteína estrutural entra no retículo endoplasmático, permitindo a clivagem dessas proteínas (9). Posteriormente, p62 e E1 seguem para o complexo de Golgi, sofrendo glicosilação (10). Por fim, há a nova formação de partículas virais (11). Essas partículas irão brotar da célula (12) e serão liberadas de forma madura (13).

1.1.3. Efeito da infecção por CHIKV na célula hospedeira

A infecção pelo CHIKV modula a transcrição e a tradução na célula hospedeira com o intuito de favorecer a replicação do genoma e a síntese proteica viral, além de modular a resposta antiviral (Joubert et al., 2015). O vírus tem a capacidade de induzir o *shutoff* transcricional, ou seja, interrompe a transcrição do genoma, o que afeta a resposta imune celular à infecção (Akhrymuk et al., 2012). A nsP2 do CHIKV bloqueia a transcrição na célula hospedeira ao levar à degradação da Rbp1, que consiste em uma subunidade catalítica do complexo da RNA polimerase II, tendo efeito citopático evidente (Akhrymuk et al., 2012).

Com o *shutoff* transcricional, as células têm menos eficiência em ativar a resposta IFN, uma vez que a transcrição dos genes de proteínas intermediárias das diferentes vias celulares foi interrompida (Fros et al., 2010). Nesse contexto, a nsP2 bloqueia a ativação de IFN mediada por JAK/STAT, que por sua vez consiste em uma das vias de sinalização de IFN (Fros et al., 2010; Hu et al., 2021). Além disso, em tempos iniciais da infecção, a transcrição celular não é alterada pela presença do CHIKV (White et al., 2011). Contudo, em momentos tardios da infecção, como em 24 h.p.i., o RNA total da célula encontra-se em níveis muito baixos, praticamente nulos (White et al., 2011). Destaca-se que em 24 h.p.i., não há transcritos de IFN-I e ISGs (White et al., 2011).

O vírus também induz *shutoff* traducional, inibindo a maquinaria de tradução da célula hospedeira (Berglund et al., 2007). O CHIKV induz a fosforilação do fator de tradução EIF2 α devido à ativação de PKR pela síntese de fdRNA, desestruturando o complexo ternário (EIF2-GTP-tRNA^{iMet}) (Berglund et al., 2007). Este é essencial para a tradução dependente de CAP e leva ao desligamento da síntese de proteínas da célula hospedeira (Berglund et al., 2007). Nesse contexto, a infecção pelo CHIKV também bloqueia o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), que é um importante sensor envolvido na tradução dependente de CAP (Joubert et al., 2015).

mTOR é uma proteína que regula processos celulares de síntese e degradação, estando associada com a proliferação celular, a síntese proteica e a autofagia (Hara et al., 1997; Nishiuma et al., 1998; Hosoi et al., 1999). mTOR possui dois complexos: mTORC1 e mTORC2 (Toschi et al., 2009). De modo geral, mTORC1 é composto por mTOR e a proteína regulatória associada a mTOR (Raptor) (Toschi et al., 2009). Já mTORC2 é composto por mTOR e a proteína associada a mTOR insensível à rapamicina (Rictor) (Toschi et al., 2009).

mTORC1 está associado com a regulação do metabolismo e do crescimento celular, enquanto mTORC2 está associado principalmente com a sobrevivência e a proliferação celular, além de ter uma resistência menor à rapamicina quando comparado com mTORC1 (Unni e Arteaga, 2019).

Em tempos iniciais da infecção, o CHIKV inibe mTORC1, o que contribui para o estabelecimento da infecção (Joubert et al., 2015). Diante da inibição desse complexo, a produção de proteínas não estruturais e o número de fibroblastos murinos infectados são maiores (Joubert et al., 2015). Além disso, em tempos tardios da infecção, como 24 h.p.i., ocorre redução do nível global de proteína quando diferentes tipos celulares (fibroblastos murinos e células epiteliais humanas) são tratados com inibidor de mTOR (Joubert et al., 2015). Contudo, a síntese de proteínas virais estruturais permanece (Joubert et al., 2015).

Ademais, a inibição de mTOR também impacta na replicação do vgRNA, uma vez que fibroblastos murinos tratados com um inibidor de mTOR apresentaram aumento nos níveis de vgRNA e vsgRNA (Joubert et al., 2015). Diferentemente do observado com a inibição de mTORC1, a inibição de mTORC2 não teve impacto na infecção por CHIKV (Joubert et al., 2015).

mTORC1 está relacionado à iniciação da tradução dependente de CAP (Joubert et al., 2015). A tradução CAP-dependente consiste na associação do ribossomo 40S aos fatores de iniciação da tradução eIF3 e eIF1A (Merrick, 2003). Este complexo formado se liga ao tRNA iniciador, que carrega uma molécula de metionina (Met-tRNA_i) e está associado ao eIF2 e GTP (Merrick, 2003). Em seguida, ocorre a ligação do ribossomo 40S ao mRNA, o que é regulado pela formação do complexo de iniciação da tradução eIF4F (eIF4E-eIF4A-eIF4G) e a associação com a estrutura CAP na extremidade 5' (Merrick, 2003). Assim, a tradução é iniciada (Merrick, 2003).

Além disso, mTORC1 regula eIF4E, que é a proteína do complexo de iniciação da tradução que vai se ligar ao CAP e iniciar a tradução do mRNA (Tcherkezian et al., 2014). Apesar do CHIKV inibir mTORC1, a tradução viral ocorre dependente de CAP (Joubert et al., 2015). Um mecanismo presente em muitas células tumorais para contornar a inibição de mTORC1 é induzir a fosforilação da serina na posição 209 no eIF4E, aumentando a afinidade dessa proteína ao mRNA (Joubert et al., 2015). Nesse contexto, diante da infecção por CHIKV, fibroblastos murinos tratados com um inibidor de mTOR, apresentaram aumento de

eIF4E fosforilado em comparação com células não tratadas (Joubert et al., 2015). Sendo assim, a fosforilação de eIF4E em altos níveis diante da inibição de mTORC1 é de grande importância para o estabelecimento da infecção viral (Joubert et al., 2015). Outrossim, como a síntese proteica global é reduzida diante da infecção por CHIKV, conclui-se que a fosforilação de eIF4E está sendo direcionada para a síntese proteica viral (Joubert et al., 2015).

Sabe-se que mTORC1 está associada com a regulação de diversos processos celulares, como a autofagia, que consiste na degradação e na reciclagem dos componentes do citoplasma, como proteínas e organelas, a fim de garantir a sobrevivência da célula em condições de estresse (Mizushima et al., 2010; Georgila et al., 2020). Existem diferentes fatores relacionados com a ativação da autofagia e um deles é a indisponibilidade de nutrientes e a redução da síntese proteica celular (Georgila et al., 2020). mTORC1 está associado à tradução da célula hospedeira, levando à fosforilação de quinases e moléculas efetoras envolvidas na síntese proteica (Georgila et al., 2020). Ademais, mTORC1 inibe a autofagia diretamente pela ação em determinadas moléculas, como a inibição de ULK1, o que impede a ativação da autofagia (Wang et al., 2018; Georgila et al., 2020). Dessa maneira, em um contexto em que ocorre inibição de mTORC1, a ativação da autofagia é estimulada (Georgila et al., 2020).

Durante a replicação do CHIKV, ocorre formação de dsRNA, que é reconhecido como padrão molecular de patógeno (PAMP) por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), levando à ativação do sistema imune inato celular (Choi et al., 2010). Ocorre a ativação de sensores citoplasmáticos, como RIG-1 e MDA-5, que reconhecem o RNA viral e vão levar à ativação do fator de transcrição IRF-3 e IRF-7 (White et al., 2011). Dessa forma, ocorre um estímulo para a transcrição de IFN-I (White et al., 2011). Apesar da ocorrência da transcrição desses genes, o CHIKV induz o *shutoff* tradicional da célula hospedeira e não ocorre a tradução do transcrito de IFN-I, evidenciando mais uma vez que a infecção prejudica o estabelecimento da resposta antiviral (White et al., 2011).

Na resposta imune, o CHIKV leva à redução da produção de quimiocinas e citocinas, de genes estimuladores de Interferon (ISGs) e dos níveis de Interferon do tipo I (IFN- I) (Florova et al., 2002). O IFN-I consiste em uma das principais respostas do sistema imune contra a infecção por CHIKV (Schilte et al., 2010). Schilte e colaboradores evidenciaram que

camundongos com deficiência em receptores para IFN-I (IFNAR) apresentaram maiores taxas de mortalidade em comparação com animais selvagens (Schilte et al., 2010).

1.1.3.1. A infecção por CHIKV e o Estresse Oxidativo

Um dos efeitos do CHIKV na célula hospedeira é a indução do estresse oxidativo, o que está associado com o sucesso da infecção (Joubert et al., 2012; Kumar, Shrinet e Sunil, 2023). O estresse oxidativo consiste em um desbalanço no controle redox da célula causado pelo excesso de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (ROS) (Harman, 1956). O estresse do retículo endoplasmático ou da mitocôndria contribuem para a acentuação do estresse oxidativo (Jensen, 1966; Haynes, Titus e Cooper, 2004). Durante o enovelamento de proteínas no retículo endoplasmático, pode ocorrer acúmulo de proteínas mal enoveladas, prejudicando diversos processos celulares (Haynes, Titus e Cooper, 2004). Um dos impactos é o desequilíbrio nos níveis de compostos oxidantes e anti-oxidantes, gerando ROS (Haynes, Titus e Cooper, 2004). A mitocôndria, por sua vez, é uma das maiores geradoras de ROS, contribuindo para o dano mitocondrial (Jensen, 1966; Hoeks et al., 2008).

O estresse oxidativo em mosquitos do gênero *Aedes* pode ser induzido por uma série de fatores, como a geração de ROS em resposta a infecções virais (Kumar, Shrinet e Sunil, 2023). O inseto responde a esse processo pela indução de moléculas com funções anti-oxidantes, como as Glutathione-S-Transferases, que reduzem a geração de radicais livres (Kumar, Shrinet e Sunil, 2023).

O CHIKV é capaz de induzir o estresse oxidativo em mosquitos *A. aegypti* (Kumar, Shrinet e Sunil, 2023). Em 6 e 24 h.p.i., ocorre aumento nos níveis de proteínas carboniladas, que são estimuladas pelo estresse oxidativo, em comparação com mosquitos não infectados (Kumar, Shrinet e Sunil, 2023). Ademais, ao tratar mosquitos *A. aegypti* com L-cisteína, uma importante molécula do metabolismo da glutathione que regula negativamente a infecção por CHIKV, ocorre redução da carbonilação de proteínas (Kumar, Shrinet e Sunil, 2023). Isso está associado à diminuição do estresse oxidativo, indicando que se correlaciona com a inibição da infecção (Kumar, Shrinet e Sunil, 2023).

O estresse oxidativo também pode induzir a autofagia (Mizushima et al., 2010). Em células renais e de adenocarcinoma humano, além de fibroblastos murinos, a infecção por CHIKV induz a autofagia (Joubert et al., 2012). Em fibroblastos murinos infectados com

CHIKV, houve aumento da lipidação da proteína LC3 (conversão LC3-I para LC3-II), que está associada à membrana interna do autofagossomo, vesícula que posteriormente irá se fundir ao lisossoma (autofagolisossomo) para a degradação dos componentes citoplasmáticos (Joubert et al., 2012). Dessa forma, o CHIKV induz a formação do autofagossoma, evidenciando que ocorre ativação de vias autofágicas (Joubert et al., 2012). Essa ativação é corroborada pelo fato do vírus estimular tanto a formação do autofagossomo quanto do autofagolisossomo (Joubert et al., 2012).

Diante da infecção em fibroblastos murinos, há fosforilação de IRE1 α , que é uma proteína quinase transmembranar que responde ao mal enovelamento de proteínas (Joubert et al., 2012). Essa fosforilação é um marcador para a ativação da via de IRE1 α , que está associada com o estresse do retículo endoplasmático (Joubert et al., 2012). Este contribui para a ativação da autofagia, uma vez que diante do silenciamento de IRE1 α , há redução nos níveis de LC3-II e na formação de autofagossomo (Joubert et al., 2012).

A indução da autofagia diante da infecção por CHIKV também tem sido associada negativamente com a apoptose, que consiste em um dos mecanismos ativados em resposta à infecção por CHIKV (Joubert et al., 2012). Na deficiência de importantes proteínas envolvidas na autofagia, como Atg5, que participa da formação da membrana do autofagossomo, fibroblastos murinos infectados com CHIKV apresentaram maior morte celular em comparação com fibroblastos não deficientes de Atg5 (Joubert et al., 2015). Tal fator pode ser observado nos dois primeiros dias após a infecção, mas no terceiro dia, a morte celular tanto em células selvagens quanto em células deficientes de Atg5 é igualada (Joubert et al., 2015). Além disso, os níveis de LC3-II em fibroblastos murinos não deficientes de nenhum componente envolvido em vias autofágicas foram reduzidos no terceiro dia após a infecção, o mesmo momento no qual os níveis de apoptose, que é a morte celular dependente de caspase, aumentam (Joubert et al., 2012). Nesse contexto, a autofagia está associada com o atraso na morte celular dependente de caspase (Joubert et al., 2012).

O CHIKV também induziu o estresse oxidativo na célula hospedeira, tendo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), ao mesmo tempo em que inibiu mTORC1, um dos complexos de mTOR, que por sua vez bloqueia a autofagia (Joubert et al., 2012). Outrossim, Krejbich-Trotot e colaboradores evidenciaram que a autofagia é induzida pelo CHIKV e está associada com o sucesso da infecção na linhagem celular HEK293T

(Krejbich-Trotot et al., 2011). O trabalho mostrou que ao bloquear a autofagia através de um inibidor, tanto o número de células infectadas quanto a quantidade de RNA viral no sobrenadante foram reduzidos (Krejbich-Trotot et al., 2011). Ademais, ao tratar as células com rapamicina, que inibe a via de mTOR e ativa a autofagia, há um aumento do número de células infectadas (Krejbich-Trotot et al., 2011).

1.2. Dopamina (DA)

A dopamina (3-hidroxitiramina) é um neurotransmissor monoaminérgico pertencente à família da catecolamina (Burn e Rand, 1958). As inervações dopaminérgicas são encontradas, sobretudo, no cérebro, tendo destaque para 4 vias de sinalização: mesolímbica, mesocortical, nigroestriatal e tuberoinfundibular (Demarest e Moore, 1979).

Tanto a via mesolímbica, relacionada ao prazer e recompensa, quanto a mesocortical, associada à cognição e memória, se iniciam na área tegmental ventral, que contém neurônios dopaminérgicos e irão transmitir a ação da DA para diversas áreas do cérebro (Elliot et al., 1986; Legault et al., 2002). A via nigroestriatal está envolvida com o movimento, e a projeção dopaminérgica começa na substância negra, seguindo para regiões dos gânglios da base (Korf, Grasdijk e Westerink 1976). Por fim, a via tuberoinfundibular é iniciada no núcleo arqueado e envia projeções dopaminérgicas para a região tuberal do hipotálamo, sendo relacionada à regulação da prolactina (Habibi, 2010).

A DA pode ser encontrada em uma variedade de neurônios do sistema nervoso central (McLennan e York, 1966; Andén et al., 1966). Contudo, também está envolvida na regulação de uma série de processos na periferia, como sistema imune, olfato e funções hormonais, cardiovasculares e renais (Clark, 1981; Bernardo, Baldus, Maher, 1970; Yan et al., 2015).

Classicamente, a biossíntese da DA se inicia no citosol de neurônios catecolaminérgicos, tendo primeiro a hidroxilação da L-tirosina em seu anel aromático pela Tirosina Hidroxilase (TH), produzindo a L-dihidroxfenilalanina (L-Dopa) (Goldstein e Weiss, 1965). Em seguida, a L-Dopa é descarboxilada pela L-aminoácido aromático descarboxilase (AADC/ dopa descarboxilase), sendo convertida em dopamina (Euler e Helner, 1951; Wassenberg et al., 2011).

Durante a sua biossíntese, a DA possui capacidade auto-oxidante e esse processo ocorre em ambiente aquoso, tendo primeiro a reação do composto com moléculas de

oxigênio, gerando espécies de quinona e superóxido, que por sua vez origina uma série de ROS, podendo contribuir para a ocorrência do estresse oxidativo (Umek et al., 2018).

1.2.1. Receptores para dopamina (DRs)

A DA atua através da ligação com os seus receptores, que são transmembranares e acoplados à proteína G (GPCRs) – sítio de ligação a nucleotídeos de guanina, podendo ser tanto GDP quanto GTP (Hoffman et al., 1983). A proteína G é composta por subunidades α , β e γ , sendo heterotrimétrica (Li et al., 2002). A subunidade α interage com o GDP, quando a proteína G está inativa, ou com o GTP, quando a proteína G está ativa (Li et al., 2002). No momento em que ocorre a ligação de uma molécula sinalizadora ao GPCR, ele sofre uma mudança conformacional, ativando a proteína G na membrana plasmática (Li et al., 2002). Com isso, a subunidade α passa a interagir com o GTP e não com o GDP (Li et al., 2002). Assim, a subunidade α ligada ao GTP se dissocia do heterotrímero, resultando na formação de um dímero β/γ (Li et al., 2002). Após a ativação da proteína G, diferentes vias celulares podem ser sinalizadas, dependendo de qual sítio da proteína interagiu com o GPCR (Li et al., 2002).

Os DRs estão distribuídos em duas famílias, D1 e D2, de acordo com a interação com a proteína G, que pode ser estimulatória ou inibitória (Grandy et al., 1989). A família do tipo D1 é composta por DR1 e DR5, e interage com a proteína G estimulatória (Gas/olf) (Fig. 4) (Qu et al., 1989). Dessa forma, há ativação da adenil ciclase (AC), estimulando a sinalização de AMP-cíclico (cAMP) e fosfatidil cinase A (PKA) (Fig. 4) (Qu et al., 1989). Muitos substratos da PKA podem afetar a ativação dos DRs, como a fosfoproteína DARPP-32, que está relacionada com a regulação da sinalização celular em resposta à DA e a demais neurotransmissores (Fienberg et al., 1998). Com a ativação dos receptores do tipo D1, os níveis de PKA são maiores e, conseqüentemente, a fosforilação de DARPP-32 aumenta (Fig. 4) (Hemmings et al., 1984). DARPP-32 inibe a proteína fosfatase 1 (PP1), contribuindo para a eficácia da sinalização por PKA (Fig. 4) (Hemmings et al., 1984). Com a inibição de PP1, não ocorre a fosforilação, em resíduos de tirosina, da proteína fosfatase enriquecida no estriado (STEP), que por sua vez não vai ativar ERK, que é uma das vias de sinalização de MAPK e contribui para a ativação de uma resposta imune pró-inflamatória (Fig. 4) (Valjent et al., 2005).

A família do tipo D2 é composta por DR2, DR3 e DR4 (Montmayeur e Borrelli, 1991). Quando a DA se liga a esses receptores, eles interagem com a proteína G inibitória (Gai/o), levando à inibição da AC e à regulação negativa de cAMP, o que reduz os níveis de PKA e a fosforilação de DARPP-32 (Fig. 4) (Montmayeur e Borrelli, 1991). Assim, ocorre ativação de PP1, tendo fosforilação de STEP e indução de ERK (Fig. 4) (Valjent et al., 2005).

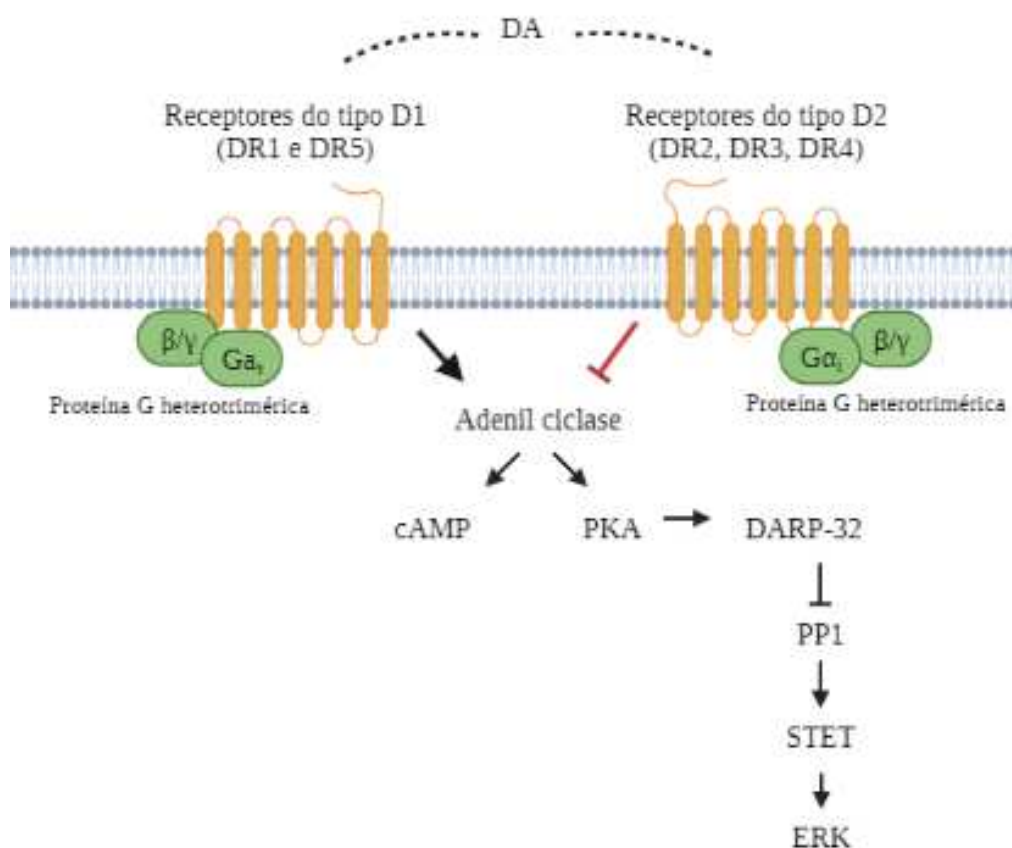


Figura 4. Sinalização dos receptores para dopamina. A DA pode interagir com receptores da família do tipo D1 (DR1 e DR5), tendo a interação dos DRs com sítios estimulatórios da proteína G. Dessa forma, há ativação da AC, sinalizando para cAMP e PKA. A ativação de PKA leva ao aumento dos níveis de DARPP-32, inibindo PP1. Dessa forma, não há ativação de STEP, impedindo a ativação de ERK. Quando a DA interage com receptores da família do tipo D2, ocorre interação dos DRs com sítios inibitórios da proteína G, tendo inibição da AC, reduzindo os níveis de cAMP e PKA. Assim, há diminuição de DARPP-32, não tendo inibição de PP1. Consequentemente, STEP e ERK são ativadas.

Em organismos mamíferos, os DRs estão altamente expressos no sistema nervoso central e na periferia, como no coração, nos rins e no trato gastrointestinal (Hartman et al., 1972; Adam, Danks e Goland, 1980; Cavallotti et al., 2010). Uma das funções dos DRs na

periferia executada por ambas as famílias de receptores é o controle da pressão arterial, uma vez que alterações no sistema dopaminérgico, de modo geral, contribui para o desenvolvimento de hipertensão (Staudacher et al., 2007). Camundongos deficientes de DR3 e DR5, por exemplo, apresentaram aumento da pressão arterial (Staudacher et al., 2007; Lu et al., 2013).

Outro efeito dos DRs na periferia é a redução do estresse oxidativo no rim através da inibição de receptores relacionados ao estresse oxidativo, e do estímulo da expressão de receptores relacionados ao bloqueio do estresse oxidativo (Qaddumi e Jose, 2021). É importante destacar que ambas as famílias de receptores estão associadas com a regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo a redução do estresse oxidativo, apesar da DA ser um composto com capacidade auto-oxidante (Yang et al., 2014; Yang et al., 2015; Umek et al., 2018). A diminuição do estresse oxidativo pelos DRs ocorre através da inibição de NADPH oxidase (NOX), que consiste em um dos maiores reguladores positivos de ROS (Yang et al., 2005; Lu et al., 2013; Liu et al., 2021).

Agonistas de DR1, por exemplo, bloqueia a atividade de NOX na linhagem celular HEK293T (Yu et al., 2011). Tal fato tem sido associado com a ativação de PKA, uma vez que diante do tratamento com inibidores de PKA, não houve redução da atividade da oxidase (Yu et al., 2011). Além disso, há uma relação negativa entre o DR1 e o estresse oxidativo, já que ao tratar células renais com um pró-oxidante, ocorre redução da expressão de DR1 na superfície celular (Banday e Lokhandwala, 2015). DR5, outro receptor da família do tipo 1, também levou à redução de NOX através do aumento dos níveis da enzima heme-oxigenase 1, que possui propriedades antioxidantes (Lu et al., 2013).

Ademais, os receptores da família do tipo D2 também foram relacionados negativamente com a produção de NOX (Armando et al., 2007; Liu et al., 2021). A deficiência de DR2 foi associada ao aumento da produção de NOX e do estresse oxidativo no rim; e o aumento dos níveis de DR3 e DR4 levaram à redução da produção de ROS (Armando et al., 2007; Liu et al., 2021). Além disso, a ativação de DR4 regulou negativamente a expressão de receptores pró-oxidantes (Liu et al., 2021).

1.2.2. Atuação da DA sobre infecções virais

Na literatura, é possível encontrar, embora sejam limitados, relatos da atuação aparentemente promissora da DA contra infecções virais (Frakolaki et al., 2019; Limanaqi et al., 2022). Na infecção por SARS-CoV-2, a administração de diferentes doses de DA diminui a replicação viral (Limanaqi et al., 2022). Células epiteliais pulmonares humanas infectadas com SARS-CoV-2 apresentaram menores níveis de liberação de vRNA em comparação com células não infectadas, especialmente nas concentrações de 50 e 100 μM (Limanaqi et al., 2022). A inibição de pelo menos 50% da replicação viral foi observada não só diante do tratamento com 50 μM de DA, mas também com 10 μM de agonistas de DR1 e DR2 (Limanaqi et al., 2022). Destaca-se ainda que na combinação de 50 μM de DA e 10 μM de DR2, a inibição da replicação viral foi superior a 80% (Limanaqi et al., 2022).

Há também uma relação da DA com os vírus da Dengue (DENV) e da Hepatite C (HCV), ambos capazes de infectar os hepatócitos; e uma das regiões periféricas na qual a dopamina está presente é o fígado, onde desempenha funções ainda não conhecidas (Frakolaki et al., 2019). A L-Dopa Descarboxilase é regulada de forma negativa na infecção por DENV e HCV, já que foi evidenciado que tanto o RNA mensageiro viral quanto a L-Dopa Descarboxilase apresentam níveis inversamente proporcionais aos níveis do genoma do HCV nos hepatócitos (Frakolaki et al., 2019). A superexpressão da L-Dopa Descarboxilase reduziu a propagação do DENV e do HCV, enquanto menores níveis dessa enzima aumentaram a disseminação viral (Frakolaki et al., 2019).

1.3. Modelo de infecção por CHIKV *in vitro*

De modo geral, células neuronais configuram uma importante ferramenta para estudos sobre a DA porque as funções exercidas pelo neurotransmissor estão relacionadas majoritariamente ao sistema nervoso central (McLennan e York, 1966; Andén et al., 1966). Com o intuito de avaliar a ação da DA sobre a infecção por CHIKV, uma das principais maneiras é utilizar linhagens de origem neuronal caracterizadas para estudos sobre o neurotransmissor, como a linhagem celular SH-SY5Y (McMillan et al., 2007; Bondi et al., 2006).

A SH-SY5Y, células não diferenciadas de neuroblastoma humano, expressa todos os cinco DRs, que são necessários para que a DA exerça a sua função sobre a célula (Zhou et al., 2022). Nesse contexto, células SH-SY5Y poderiam ser utilizadas para avaliar se a

infecção por CHIKV e os DRs poderiam apresentar uma correlação. Ademais, essas células podem ser diferenciadas por ácido retinóico a neurônio maduro com fenótipo dopaminérgico, apresentando aumento de genes associados ao transportador de DA e à síntese e degradação de DA (Cheung et al., 2009; Lopes et al., 2017). Assim, diante do aumento de características dopaminérgicas, seria possível analisar melhor o impacto da DA sobre a infecção por CHIKV.

Um ponto negativo para o uso das SH-SY5Y nesse cenário é a ausência de caracterização da infecção por CHIKV nas células. A infecção por CHIKV foi evidenciada somente em células diferenciadas, mas não em células não diferenciadas (Dhanwani et al., 2012). Células SH-SY5Y diferenciadas e infectadas com CHIKV apresentaram efeito citopático (Dhanwani et al., 2012). Contudo, importantes etapas do ciclo replicativo não foram avaliadas nessas células, como a quantificação de partículas virais totais no interior da célula e a liberação de partículas virais infecciosas, tornando esse modelo muito limitado para estudos sobre o CHIKV (Dhanwani et al., 2012).

Utilizar células permissíveis ao CHIKV também são de grande importância, sendo possível avaliar o efeito da DA em um modelo no qual a infecção é estabelecida com sucesso. Células de rim embrionário humano (HEK293T) são altamente permissíveis à infecção por CHIKV, uma vez que em 24 h.p.i., a infecção dessas células é superior a 60% e em 72 h.p.i., atinge 100% (Wikan et al., 2012). Krejbich-Trotot e colaboradores evidenciaram que em 48 h.p.i., a porcentagem de células em que foi identificada a proteína E1 do CHIKV foi de 80%, evidenciando também o sucesso da infecção nessas células (Krebjich-Trotot et al., 2011).

Além disso, as células HEK foram utilizadas como modelo para avaliar a relação da infecção por CHIKV com a autofagia e o estresse oxidativo (Joubert et al., 2012). Considerando que o estresse oxidativo favorece a replicação viral e os DRs inibem esse mecanismo, seria possível avaliar o impacto da DA e dos DRs sobre a infecção por CHIKV, avaliando se o estresse oxidativo é importante nesse processo. Destaca-se que células renais expressam os DRs, o que corrobora para a relevância dessa linhagem celular para estudos sobre o efeito da DA sobre o CHIKV (Armando et al., 2007; Yu et al., 2011). Entretanto, as vias dopaminérgicas não são caracterizadas na linhagem celular HEK293T, além dessas células não serem utilizadas como modelo de estudo sobre DA, o que traz uma limitação para o estudo.

Ademais, o impacto da DA sobre o vírus também pode ser avaliado em modelos celulares relevantes para a infecção, como células fibroblásticas e células musculares (Wichit et al., 2017; Liu et al., 2022). Os fibroblastos consistem no primeiro sítio de replicação do CHIKV, evidenciando a importância de utilizar linhagens de fibroblastos, como fibroblastos embrionários de murinos (MEF), como ferramenta *in vitro* (Wichit et al., 2017). Ademais, a MEF foi utilizada para estudos sobre a indução de autofagia pela infecção por CHIKV, podendo também ser utilizados como ferramenta para compreender a relação do estresse oxidativo com o efeito da DA sobre o CHIKV (Joubert et al., 2012).

Os músculos configuram um dos principais sítios de estabelecimento do CHIKV durante a fase crônica da infecção, atuando possivelmente como um reservatório viral (Liu et al., 2022; Jaquet et al., 2023). Portanto, estudos futuros sobre o impacto da DA sobre a infecção crônica por CHIKV em modelos *in vivo*, como camundongos, um dos sítios de maior relevância são os músculos. Nesse contexto, estudos *in vitro* em células musculares precisam ser desenvolvidos inicialmente. Uma relevante linhagem celular que poderia ser utilizada é a C2C12, que são fibras musculares imaturas de murinos. Essas células também são pouco caracterizadas para a infecção por CHIKV. Contudo, Chatterjee e colaboradores evidenciaram que em 15 h.p.i., há uma robusta expressão de nsP2 na C2C12, evidenciando a permissividade dessas células à infecção (Chatterjee et al., 2022). Assim, seria possível analisar o efeito da DA sobre o CHIKV em diferentes e importantes modelos celulares.

2. JUSTIFICATIVA

A emergência e a disseminação do CHIKV para diversas regiões do mundo levaram à ocorrência de novos surtos. Isso configurou um problema à saúde pública, pois os relatos de infecção foram acompanhados por uma alta morbidade e pelo desenvolvimento de manifestações clínicas graves.

A fase aguda da doença é caracterizada por febre, dores articulares e musculares, cefaleia e diarreia. Cerca de 4 a 6 dias depois do início dos sintomas, há uma alta viremia, através da qual o vírus pode atingir diferentes sítios. A doença ainda pode evoluir para a cronicidade, tendo destaque para a artralgia, que está presente em mais da metade dos casos de infecção crônica. Portanto, é de grande importância avaliar a patogênese do vírus, o que pode ser feito através da utilização de modelos *in vitro* de infecção e buscar formas de combatê-lo.

Embora os surtos mais relevantes de infecção por CHIKV foram relatados há quase duas décadas, o tratamento contra a doença é genérico. Ele é configurado na ingestão de fluidos, no descanso e na administração de medicamentos para tratar os sintomas. Na fase crônica há a administração de anti-inflamatórios. Desse modo, não há um antiviral que poderia agir contra o CHIKV. Assim, faz-se necessário buscar novos compostos ou redirecionar fármacos já formulados que estão sendo empregados no tratamento de outras doenças.

Sabe-se que a DA impactou negativamente o curso de infecções virais, então seria de grande importância explorar a ação desse neurotransmissor. Foi evidenciado que os DRs estão relacionados com a regulação de diversas funções fisiológicas, inclusive na redução do estresse oxidativo, que por sua vez configura um dos processos celulares envolvidos com o curso da infecção por CHIKV. O CHIKV é capaz de levar ao estresse oxidativo na célula através da indução de ROS, podendo ativar a autofagia. Portanto, como o estresse oxidativo é inibido pelos DRs, mas relacionado com o sucesso da infecção, é preciso avaliar o efeito da dopamina sobre o CHIKV pode apresentar resultados promissores.

Além disso, os DRs estão presentes em diversas linhagens celulares, incluindo aquelas que podem ser susceptíveis e permissíveis à infecção por CHIKV, o que também poderia favorecer o combate à infecção pela ação do neurotransmissor. Ademais, resultados prévios do nosso grupo mostraram a redução da infecção por CHIKV na linhagem celular

HBMEC após o tratamento com a DA (dados não publicados). Tal resultado pode ser correlacionado com o efeito antiviral da dopamina na infecção por SARS-CoV-2, como evidenciado nos dados apresentados pelo grupo de pesquisa italiano (Limanaqi et al., 2022). Ambos os resultados, juntamente à evidência de que os níveis da DDC foram reduzidos diante da presença de flavivírus, mostram que a dopamina possivelmente apresenta um papel inibitório diante de infecções virais (Frakolaki et al., 2017). Investigar o papel da DA diante da presença do CHIKV pode ser de suma importância para o desenvolvimento de um antiviral.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

Estabelecer um modelo *in vitro* para o estudo sobre a relação entre a dopamina e a infecção pelo vírus Chikungunya e, portanto, avaliar a ação antiviral deste composto.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Caracterizar a infecção pelos isolados BHI3745 e RJ-IB1 do genótipo ECSA do CHIKV na linhagem celular SH-SY5Y.
- 3.2.2. Avaliar a citotoxicidade da DA sobre linhagens celulares de interesse, como SH-SY5Y e HEK293T.
- 3.2.3. Analisar a expressão dos DRs nas linhagens celulares de interesse.
- 3.2.4. Avaliar a liberação de partículas virais infecciosas do CHIKV diante do tratamento com DA em SH-SY5Y e HEK293T.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de células

A linhagem celular SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) foi cultivada em Dulbecco's Modified Eagle *Medium* (Gibco): *Nutrient Mixture F12* (DMEM F12) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina a 37°C atmosfera 5% CO₂. As linhagens celulares HEK293T/17 (ATCC CRL-11268) e Vero E6 (ATCC CRL-1586) foram cultivadas em *Dulbecco's modified Eagle medium* (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de Penicilina/Estreptomicina a 37°C atm 5% CO₂.

4.2. Estoque viral

Os isolados brasileiros utilizados do CHIKV foram BHI3745/H804709 (acesso GenBank #KP164570.1) e RJ-IB1 (acesso GenBank #KY124328.1), ambos oriundos da linhagem ECSA e foram propagados na linhagem celular Vero E6. A cultura das células foi realizada em *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) não suplementado com SFB. A linhagem celular foi infectada com o CHIKV em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0.05 e incubada a 37°C atmosfera 5% CO₂ por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, a monocamada de células foi lavada com PBS 1x e foi adicionado DMEM suplementado com 2% de SFB. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO₂ por 36 horas. Realizou-se a coleta do sobrenadante celular, que foi centrifugado a 400 RCF por 10 minutos e depois passado em um filtro para membrana PES 0,22 µm, 30 MM. Os vírus produzidos foram armazenados a -80°C. Para saber o título do vírus, foi realizado um ensaio de Plaque na linhagem celular Vero E6. O título do isolado BHI3745 foi 1,3x10⁸ PFU/mL e do RJ-IB1 foi 6,2x 10⁷ PFU/mL.

4.3. Dopamina

No estudo, utilizou-se o Hidrocloridrato de dopamina (SKU H8502-5G Sigma-Aldrich), que foi armazenado a 4°C. Na ausência de luz, 3.8 mg do composto foi diluído em 5 mL de H₂O ultrapura livre de DNase e RNase, sendo então a concentração estoque de 10 mM. A diluição foi realizada no momento do experimento com a DA para evitar os riscos de auto-oxidação. A DA diluída é descartada logo após o uso.

4.4. Cinética da infecção por CHIKV

Em uma placa de 12 poços, a linhagem celular SH-SY5Y foi cultivada com 3×10^5 células por poço em DMEM F12 suplementado com 10% de SFB, adicionando 1000 μL por poço. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 24 horas. As células foram infectadas com os isolados BHI3745 e RJ-IB1 nas MOIs 0.01, 0.05 e 0.1 em 200 μL por poço de DMEM F12 não suplementado por 1 hora e 30 minutos a 37°C atmosfera 5% CO_2 . O meio da infecção foi substituído por 1000 μL por poço de DMEM F12 suplementado com 10% de SFB. Em 0, 6, 12, 24 e 36 h.p.i., o sobrenadante celular foi coletado para avaliar a produção de partículas virais infecciosas por ensaio de Plaque.

4.5. Microscopia de Fluorescência

Em uma placa de 24 poços, células SH-SY5Y cultivadas com 8×10^4 células por poço sobre uma lamínula foram infectadas com os isolados BHI3745 e RJ-IB1 na MOI 0.5 em 200 μL de F12 não suplementado. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% de CO_2 por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, o meio da infecção foi descartado e adicionou-se 1000 μL de F12 suplementado com 10% de SFB. Após 6, 12 e 24 h.p.i., o sobrenadante celular foi descartado e as células foram fixadas com formaldeído 4% por 15 minutos. As células foram lavadas com PBS 1x. Fez-se o bloqueio com uma solução de Albumina Sérica Bovina (BSA) 3% (A7906 Sigma-Aldrich) e Triton (108603 MERCK) 0,1% diluída em PBS 1x por 30 minutos a temperatura ambiente. Depois as células foram novamente lavadas com PBS 1x e marcadas com o anticorpo primário monoclonal (IgG) de camundongo J2 (10010200 Scicons - 1:1000), diluído em PBS 1x com BSA 3%. A incubação foi o anticorpo foi de 1 hora na ausência de luz a 4°C . As células foram lavadas e posteriormente incubadas com o anticorpo (IgG) secundário anti-IgG, que é anti-camundongo (A21202 Sigma Aldrich - 1:1000), e com o marcador fluorescente DAPI (711509 Invitrogen - 1:10000). Os reagentes foram diluídos em PBS 1x com BSA 3%. A incubação ocorreu por 1 hora na ausência de luz a 4°C . Em seguida, as lamínulas foram seladas às lâminas e então direcionadas ao Microscópio de Fluorescência (OLYMPUS IX81) para observação da emissão de fluorescência. 2 campos de cada condição experimental foram selecionados para a análise dos resultados e todos os campos possuíam um número de células superior a 100 células. O número de células positivas

para a marcação de J2 foi calculado no software ImageJ (ImageJ, U. S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, v 1.8.0 4.1). A barra de escala corresponde a 30 μm .

4.6. SUnSET

Em uma placa de 12 poços, células SH-SY5Y cultivadas com $3,5 \times 10^5$ células por poço foram infectadas com os isolados BHI3745 e RJ-IB1 no MOI de 0.5 em 200 μL de F12 não suplementado. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% de CO₂ por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, o meio da infecção foi descartado e adicionou-se 1000 μL de F12 suplementado com 10% de SFB. Após 6, 12 e 24 h.p.i., o sobrenadante celular foi descartado e as células foram tratadas com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina (P9620 Sigma Aldrich) por 1 hora. As células foram lisadas com 100 μL de RIPA por poço e o lisado celular foi armazenado a -20°C. A detecção da puromicina foi avaliada por Western Blotting.

Inicialmente, fez-se o preparo das amostras em tampão de amostra, contendo Azul de Bromofenol 0.1% (Isofar, Indústria de Comércio e Produtos Químico, LTDA), 50 mM Tris-HCl pH 6,8 (BioRad, EUA), 100 mM β -mercaptoetanol (Isofar, Indústria de Comércio e Produtos Químico, LTDA), 2% SDS (Sigma-Aldrich, EUA) e 10% glicerol (Isofar, Indústria de Comércio e Produtos Químico, LTDA). Foram adicionados 8 μL do tampão de amostra em 30 μL de amostra. As amostras foram incubadas a 98°C por 5 minutos.

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida, em que as proteínas foram separadas por tamanho. O gel separador utilizado foi o SDS-PAGE 10%, consistindo em SDS 0,1% (Sigma-Aldrich, EUA); acrilamida 10% (BioRad, EUA); bis-acrilamida 0,04 - 0,05% (BioRad, EUA); Tris-HCl 0,38M, pH 8,8; TEMED 0,02% (Sigma-Aldrich, EUA) e persulfato de amônio 0,5% (BioRad, EUA). Em cima do gel separador, foi adicionado um gel de empilhamento, que fazer com que as proteínas estejam alinhadas. Esse gel é composto por SDS 0,1%; acrilamida 5%; bis-acrilamida 0,25%; Tris-HCl 0,22 M pH 6,8; TEMED 0,04% e persulfato de amônio 0,08%). Na cuba de eletroforese contendo o Tris-Glicina pH 8,8, foi adicionado o volume total das amostras. Em seguida, iniciou-se a eletroforese no gel SDS-PAGE, sendo conduzida a voltagem constante de 90V por 90 minutos.

Após a eletroforese em gel SDS-PAGE, foi realizada a transferência das amostras do gel para a membrana de nitrocelulose (AmershamTM ProtranTM 10600002) com o auxílio de

uma corrente elétrica a 15V por 16 horas no tampão de transferência Tris-Glicina pH 8 com 20% de metanol (Isofar, Indústria de Comercio e Produtos Químico, LTDA).

Fez-se uma solução de bloqueio contendo 10% de leite desnatado (Molico Desnatado, Nestlé) em TBS com Tween 20 0.1% (TBS-T), sendo adicionada à membrana por 30 minutos a temperatura ambiente no shake e para evitar ligações específicas. A membrana foi incubada com o anticorpo (IgG) primário anti-puromicina de camundongo (#MABE343 MERCK – 1:20000) a 4°C por 16 horas. Em seguida, após a lavagem de 3 vezes de 5 minutos com TBS-T, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-camundongo (Sigma Aldrich – 1:10000), que é conjugado à enzima peroxidase HRP, por 1 hora à temperatura ambiente no *shaker*. Como controle de *loading*, a membrana posteriormente foi marcada com o anticorpo primário anti- β -Actina de camundongo (Sigma Aldrich – 1:30000) e com o anticorpo secundário anti-camundongo (Sigma Aldrich – 1:10000). Depois, a revelação do perfil proteico foi realizada por detecção de quimiluminescência, utilizando Peróxido de Hidrogênio e Luminol (Pierce™ ECL Western Blot Substrate, Thermo Scientific, EUA).

4.7. Citometria de Fluxo

Em uma placa de 12 poços, células SH-SY5Y cultivadas com $3,5 \times 10^5$ células poço foram infectadas com os isolados BHI3745 e RJ-IB1 nos MOIs de 0.01, 0.05 e 0.1 em 200 μ L de F12 não suplementado. As células foram incubadas a 37° C atmosfera 5% de CO₂ por 1 hora e 30 minutos. Em seguida, o meio da infecção foi descartado e adicionou-se 1000 μ L de F12 suplementado com 10% de SFB. 24 horas depois, o sobrenadante celular foi descartado e as células foram ressuspendidas em *binding buffer* 1x caseiro. Em seguida, as células foram marcadas com PI (556547 BD PHARMINGEN) e Anexina V conjugada a FITC (556547 PHARMINGEN), adicionando 5 μ L de cada reagente por amostra. As células foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos e posteriormente foi avaliada a detecção de PI e Anexina através de citometria de fluxo no citômetro (FACSCalibur). O programa utilizado para análise dos resultados foi o FlowJo (v.10.7.1; Becton Dickson Immunocytometry System; LCC, Ashland, USA).

4.8. Ensaio de viabilidade celular

Em uma placa de 96 poços, as linhagens celulares SH-SY5Y e HEK293T foram cultivadas com, respectivamente, $3,5 \times 10^4$ e 3×10^4 células por poço em 100 μL de DMEM F12 ou DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 24 horas. As células foram tratadas com a DA em diferentes concentrações. O composto foi diluído em DMEM F12 ou DMEM suplementado com 10% de SFB, adicionando 100 μL do meio do tratamento por poço. O meio da cultura celular foi substituído pelo meio do tratamento. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 24 e 48 horas. Após os respectivos tempos de incubação, células não tratadas foram lisadas com Triton 0,1%, sendo consideradas o controle de morte. Os poços não tratados que não foram lisados foram utilizados como controle de vida. Adicionou-se 20 μL do reagente CellTiter Blue (Promega) por poço, tanto para células tratadas quanto para células não tratadas. As placas foram incubadas a 37°C no leitor de placas GlowMax Explorer (GM3500 Promega).

4.9. Cinética de expressão dos DRs

As linhagens celulares SH-SY5Y e HEK293T foram mantidas em cultura, respectivamente, por 72 e 96 horas. Em seguida, fez-se a passagem dessas células, que logo depois foram cultivadas em placas de 6 com 5×10^5 células por poço em DMEM F12 suplementado com 10% SFB para a SH-SY5Y e DMEM suplementado com 10% SFB para a HEK293T, adicionando 2000 μL por poço. As placas foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 . Em 6, 12 e 24 horas após o plaqueamento, as células foram lisadas em 500 μL de trizol para RT-qPCR e as amostras foram armazenadas a -20°C .

Além disso, após 24 horas do plaqueamento das células, a linhagem celular HEK293T foi infectada com o isolado RJ-IB1 na MOI 0.01 em 1000 μL por poço de DMEM não suplementado por 1 hora e 30 minutos a 37°C atmosfera 5% CO_2 . Após o tempo de adsorção do vírus, o meio da infecção foi substituído pelo respectivo meio suplementado com 10% de SFB. Em 0, 6, 12 e 24 horas após a infecção, as células foram lisadas em 500 μL de trizol para RT-qPCR e as amostras foram armazenadas a -20°C .

A linhagem HEK293T também foi tratada, após 24 horas do plaqueamento, com a DA nas concentrações de 10 e 50 μM . Em 0, 6, 12 e 24 horas após o tratamento, as células foram lisadas em 500 μL de trizol e as amostras foram armazenadas a -20°C .

4.10. Tratamento com a DA sobre a infecção por CHIKV *in vitro*

4.10.1. Linhagem celular SH-SY5Y

Em uma placa de 12 poços, a linhagem celular SH-SY5Y foi cultivada com 3×10^5 células por poço em DMEM F12 suplementado com 10% de SFB, adicionando 1000 μL por poço. As placas foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 24 horas. O tratamento com a DA na linhagem celular SH-SY5Y foi realizado em duas condições distintas (Fig. 5). Primeiramente, as células foram infectadas com RJ-IB1 na MOI 0.01 em 200 μL de DMEM F12 não suplementado por 1 hora e 30 minutos a 37°C atmosfera 5% CO_2 . Após o tempo de adsorção viral, o meio da infecção foi substituído por DMEM F12 suplementado com 10% de SFB com adição da DA nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 μM . Em 24 horas após a infecção, o sobrenadante celular foi coletado para ensaio de Plaque e as amostras foram armazenadas a -80°C .

Em segundo lugar, 24 horas após o plaqueamento, foi realizado o tratamento com a DA nas concentrações de 1 e 10 μM por 2 horas ou nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 μM por 5 minutos em DMEM F12 suplementado com 10% de SFB. Imediatamente após os respectivos tempos de tratamento, a linhagem celular SH-SY5Y foi infectada com RJ-IB1 na MOI 0.01 em 200 μL de DMEM F12 não suplementado por 1 hora e 30 minutos a 37°C atmosfera 5% CO_2 . Após o tempo de adsorção viral, o meio da infecção foi substituído por DMEM F12 suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 . Em 6 e 24 horas após a infecção, o sobrenadante celular foi coletado para ensaio de Plaque e as amostras foram armazenadas a -80°C .

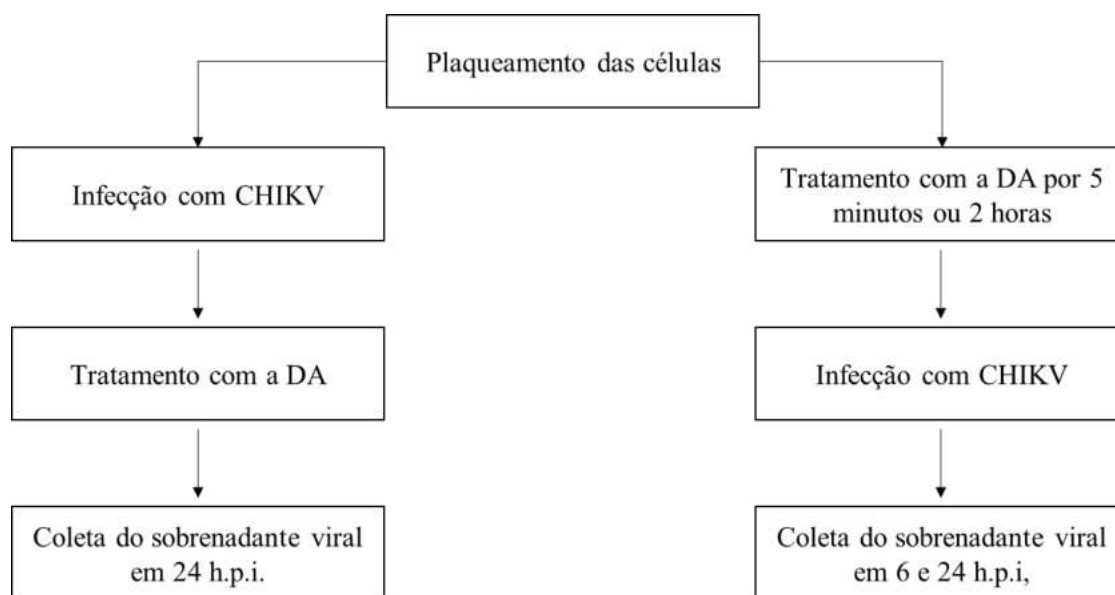


Figura 5. Tratamento com a DA na linhagem celular SH-SY5Y. Após o plaqueamento das células, a linhagem celular SH-SY5Y foi infectada com CHIKV e posteriormente tratada com a DA em diferentes concentrações. A coleta do sobrenadante viral no pós-tratamento foi realizada em 24 horas após a infecção enquanto no pré-tratamento foi realizada em 6 e 24 horas após a infecção.

4.10.2. Linhagem celular HEK293T

Em uma placa de 6 poços, a linhagem celular HEK293T foi cultivada com $6,5 \times 10^5$ células por placa em DMEM suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 24 horas. Fez-se a infecção com RJ-IB1 na MOI de 0.01 em DMEM não suplementado. O meio da cultura foi substituído pelo meio da infecção e as células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 1 hora e 30 minutos. Após o tempo de adsorção do vírus, o meio da infecção foi substituído por DMEM suplementado com 10% de SFB com adição da DA nas concentrações de 10 e 50 μM . Depois as células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 . Em 24 horas após a infecção, o sobrenadante celular foi coletado para ensaio de Plaque e o lisado celular foi coletado em 500 μL de trizol para RT-qPCR. As amostras de sobrenadante e lisado foram armazenadas a -80°C e -20°C , respectivamente.

4.11. Dosagem de ROS

Em uma placa de 96 poços, a linhagem celular SH-SY5Y e HEK293T foram plaqueadas com $3,5 \times 10^4$ e 3×10^4 células por poço, respectivamente, e incubadas a 37°C

atmosfera 5% CO₂ por 24 horas. As células foram tratadas com 1, 10, 50 e 100 µM de DA em 100 µL de meio suplementado com 10% de SFB por 24 horas ou infectadas com o RJ-IB1 na MOI 0.01 em 30 µL meio não suplementado com SFB por 1 hora e 30 minutos. Após o tempo de adsorção viral, o meio da infecção foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio suplementado com 10% de SFB.

Os poços de SH-SY5Y infectados com o RJ-IB1 foram pré-tratados com 10 µM de DA por 5 minutos ou 1 µM por 2 horas; ou não foram pré-tratados, e sim tratados após a adsorção viral com 100 µM de DA por 24 horas. Os poços de HEK293T infectados com o RJ-IB1 foram tratados após a adsorção viral com 10 e 50 µM de DA por 24 horas.

24 horas após a infecção, os poços foram lavados com 100 µL de PBS 1x e foram tratados ou não com Heme diluído em NaOH 0,1 M por 30 minutos como controle positivo da produção de ROS. Em seguida, as células foram incubadas com 2 µM da sonda fluorescente CM-H2DCFDA (C6827 ThermoFisher) diluída em PBS 1x para 1x10⁶ células por 30 minutos. A intensidade de fluorescência foi avaliada no fluorímetro.

4.12. RT-qPCR

Fez-se a extração de RNA total por TRIzol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante, e em seguida, o RNA foi armazenado a -80°C. Utilizando o kit de transcrição reversa de DNA complementar (cDNA) de alta capacidade (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizado o PCR quantitativo em tempo real (qPCR) das amostras de cDNA para avaliar os níveis dos transcritos dos DRs (DRs). As análises foram realizadas no sistema de qPCR AriaMx (Agilent).

Na quantificação dos transcritos dos DRs, foram utilizadas sequências específicas como iniciadores para DR1, DR2, DR3, DR4 e DR5. Como controle interno para normalização das amostras, foram utilizados como iniciadores sequências específicas para o Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) humano em uma reação de qPCR com Sybr Green, utilizando o MasterMix PCR Tempo Real - Sybr Green/Rox (quatroG), seguindo as instruções do fabricante.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a reação de qPCR

| | Iniciador senso | Iniciador Antisenso |
|-------|--------------------------|------------------------|
| DR1 | GACCACCACAGGTAATGGAAAG | AAGAAAGGTAGCCAACAGCACA |
| DR2 | CGAGCATCCTGAACTTGTGTG | GCGTTATTGAGTCCGAAGAGG |
| DR3 | GTACAGCCAGCATCCTTAATCTCT | ACAGAAGAGGGCAGGACACA |
| DR4 | GACGCCCTTCTTCGTGGT | GACAGTGTAGATGACGGGGTTG |
| DR5 | CTGGGCTAACTCCTCACTCAAC | ATTGCTGATGTTACCGTCTC |
| GAPDH | AATCCCATCACCATCTTCCA | AAATGAGCCCCAGCCTCC |

4.13. Ensaio de Plaque

Em uma placa de 24 poços, a linhagem celular Vero E6 foi cultivada com 8×10^4 células por poço em 500 μL de DMEM High suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 24 horas e depois fez-se a diluição seriada das amostras na base 10. Em seguida, o meio da cultura foi substituído por 200 μL do meio da infecção por poço. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 1 hora e 30 minutos. Após o tempo de adsorção, o meio da infecção foi substituído por 500 μL do meio semissólido por poço, consistindo em DMEM High 1X, CMC 2% + 1% SFB + 0.5% Penicilina-Estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C atmosfera 5% CO_2 por 48 horas. Após a incubação, as células foram fixadas com 1000 μL de formol 10% por 2 horas. Posteriormente, o formol foi descartado e adicionou-se 500 μL de cristal violeta 1% por 5 minutos. O cristal foi descartado e, por fim, fez-se a contagem dos plaques, utilizando a fórmula: número de plaques x diluição x 5.

4.14. Estatística

As análises foram realizadas com o software GraphPrism, versão 8.0, com o teste de T não pareado para comparações duplas e teste de T múltiplos para múltiplas comparações. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0.05.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização da infecção por CHIKV na linhagem celular SH-SY5Y

Para compreender o papel da DA *in vitro* sobre a infecção por CHIKV, o melhor modelo para o estudo é utilizar células de origem neuronal, uma vez que as funções do neurotransmissor estão relacionadas, sobretudo, ao sistema nervoso central (Demarest e Moore, 1979). Uma linhagem celular muito bem caracterizada para análises sobre DA e seus receptores é a SH-SY5Y, que é uma linhagem de células epiteliais neuronais não diferenciadas derivadas de neuroblastoma humano (Kovalevich e Langford, 2013).

Entretanto, não há evidências na literatura dessa linhagem celular não diferenciada ser permissiva à infecção por CHIKV. Sendo assim, foi necessário avaliar primeiramente se o CHIKV é capaz de infectar com sucesso essas células. Nesse contexto, as células foram infectadas com os isolados BHI3745 e RJ-IB1 nas MOIs de 0.01, 0.05 e 0.1. Em diferentes tempos após a infecção, o sobrenadante foi coletado para avaliar a liberação de partícula viral infecciosa por ensaio de Plaque.

Observou-se que o CHIKV foi capaz de infectar com sucesso a linhagem SH-SY5Y, produzindo altos títulos (Fig. 6). Para a menor MOI, o RJ-IB1 produz maior número de partículas virais infecciosas em comparação com o BHI3745 em 6 e 24 h.p.i., tendo 10,8 vezes maior produção em 24 h.p.i (Fig. 6A), porém ambos atingem o mesmo nível de produção de progênie infecciosa em 36 horas, o qual para esta MOI é o pico de infecção (Fig. 6A). Já nas MOIs de 0.05 e 0.1, no tempo inicial de 6 h.p.i., o isolado BHI3745 apresenta uma liberação de partículas virais infecciosas maior do que o isolado RJ-IB1 (Fig. 6B, 6C). Contudo, para essas duas MOIs, a partir de 12 h.p.i., o RJ-IB1 supera o BHI3745 nos níveis de produção de partículas virais infecciosas, tendo o pico em 24 h.p.i. (Fig. 6B, 6C).

Em 24 h.p.i., o RJ-IB1 atinge 10^{10} partículas virais infecciosas em todas as MOIs, enquanto o BHI3745 atinge 10^9 , evidenciando uma diferença de cerca de 10 vezes na liberação de partículas virais infecciosas entre os isolados neste tempo (Fig. 6A, 6B, 6C). Nesse contexto, o isolado RJ-IB1 apresenta uma infecciosidade maior nas células SH-SY5Y quando comparado com o isolado BHI3745, independente do MOI (Fig. 6A, 6B, 6C).

A infecção é diferente de acordo com a MOI. Houve produção de níveis mais elevados de partículas virais infecciosas na MOI 0.01 a partir de 12 h.p.i. na infecção pelo BHI3745 em comparação com os demais isolados, sendo 7,3 vezes maior em relação à MOI

0.05 e 4,4 vezes maior em relação à MOI 0.1 neste ponto (Fig. 6F, 6G, 6H). Em 24 h.p.i., esse aumento é de 2,1 vezes em comparação com a MOI 0.05, mas em relação à MOI 0.1, a diferença é de 20,66 vezes (Fig. 6G). Em 36 h.p.i., a produção de partículas virais infecciosas continua mais elevada na MOI 0.01, sendo 290,9 vezes maior em comparação com a MOI 0.05 e 228,57 vezes maior em relação à MOI 0.1 (Fig. 6H).

Para o RJ-IB1, a diferença observada entre as MOIs ocorre em 6 h.p.i. (Fig. 6H). Na MOI 0.01, a produção de partículas virais infecciosas é 3 vezes maior em relação à MOI 0.05 (Fig. 6H). E na maior MOI, a produção de partículas virais infecciosas é 3,9 vezes maior também em relação à MOI 0.05 (Fig. 6H). Em 12 h.p.i., a produção de progênie infecciosa é significativamente maior na maior MOI em comparação com as demais, estando em uma diferença de 16,6 vezes para a MOI 0.01 e de 13,6 vezes para a MOI 0.05 (Fig. 6I). Entretanto, em 24 h.p.i., a produção de partículas virais infecciosas é diferente entre as MOIs 0.05 e 0.1, tendo uma produção de 1,55 vezes maior na MOI 0.05 (Fig. 6J). Em 36 h.p.i., a produção de partículas virais infecciosas entre as 3 MOIs é diferente, sendo mais elevada na menor MOI (Fig. 6K).

Para ambos os isolados, o momento no qual houve maior produção de partículas virais infecciosas também foi diferente de acordo com a MOI (Fig. 6). Na MOI de 0.01, a produção de progênie infecciosa pelo BHI3745 foi maior em 36 h.p.i., o tempo máximo analisado, sendo de 3×10^{10} partículas virais infecciosas (Fig. 6G). Neste mesmo isolado, mas na MOI de 0.05, houve produção de $7,3 \times 10^8$ partículas virais infecciosas em 24 h.p.i., atingindo o pico da infecção (Fig. 6F). Em 36 h.p.i., a produção de progênie infecciosa reduz para $5,5 \times 10^7$ na MOI de 0.05 (Fig. 6G). Na maior MOI (0.1), a produção de progênie infecciosa é de $7,5 \times 10^7$ e 7×10^7 partículas virais infecciosas em 24 e 36 h.p.i., respectivamente, na infecção pelo BHI3745 (Fig. 6F, 6G).

Na infecção pelo RJ-IB1 na menor MOI, 0.01, a produção de progênie infecciosa foi de $1,55 \times 10^{10}$ partículas virais infecciosas em 24 h.p.i. e 3×10^{10} partículas virais infecciosas em 36 h.p.i. (Fig. 6J, 6K). Na MOI de 0.05, foram produzidos $2,25 \times 10^{10}$ partículas virais infecciosas em 24 h.p.i., tendo uma queda em 36 h.p.i. para $8,5 \times 10^9$ partículas virais infecciosas produzidas pelo RJ-IB1 (Fig. 6J, 6K). Na infecção por este mesmo isolado, mas na MOI de 0.1, os maiores níveis de partículas virais infecciosas são detectados em 24 h.p.i., sendo de $1,45 \times 10^{10}$ partículas virais infecciosas (Fig. 6J). Em 36 h.p.i., há uma produção de

$5,5 \times 10^8$ partículas virais na MOI de 0.1, sendo 26,36 vezes menor quando comparado a 24 h.p.i. (Fig. 6J, 6K).

Dessa forma, ao evidenciar a alta permissividade da linhagem SH-SY5Y à infecção por CHIKV, é possível utilizá-la como modelo de estudo para compreender o efeito da DA sobre a infecção até 24 h.p.i.

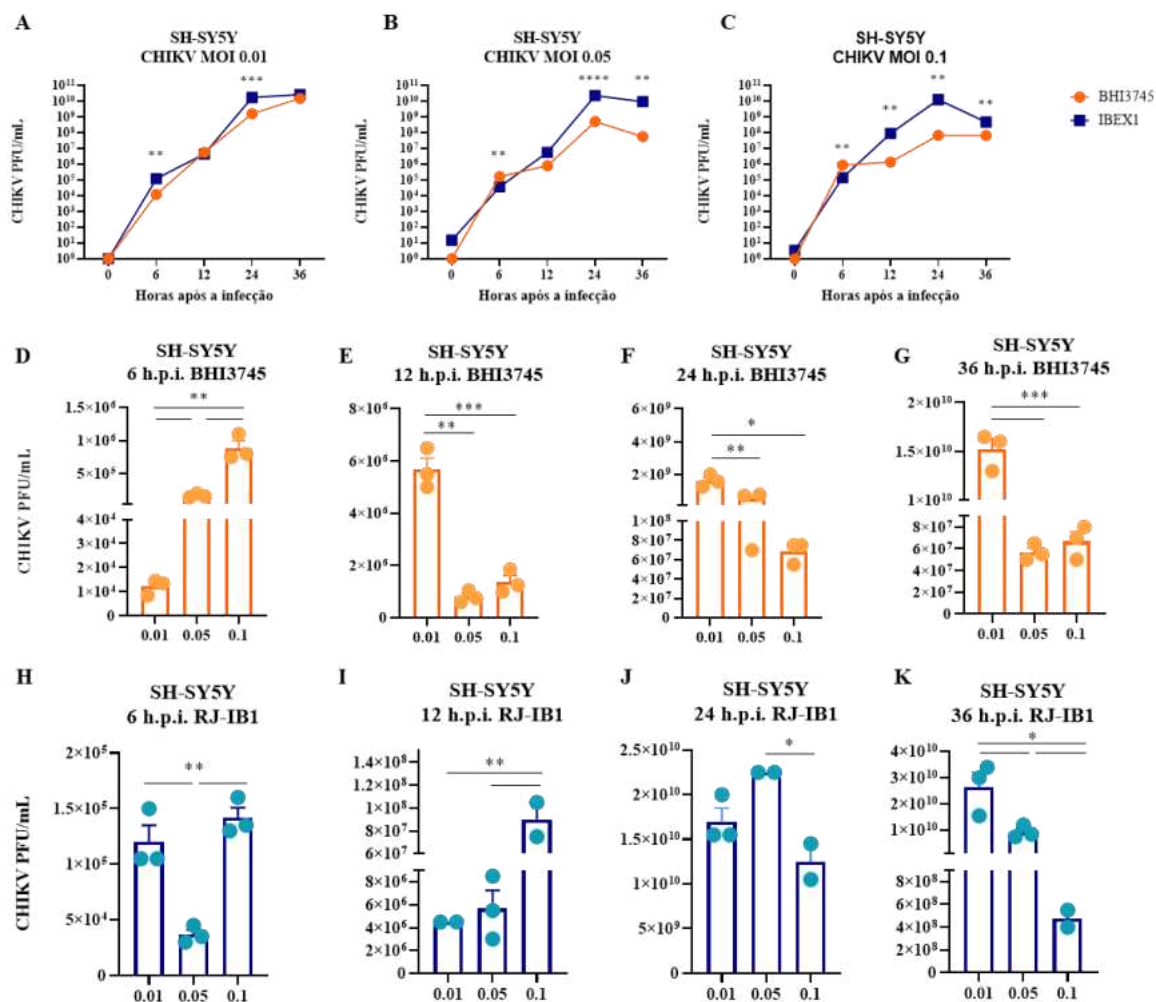


Figura 6. A linhagem celular SH-SY5Y é permissível à infecção por CHIKV. Células SH-SY5Y foram infectadas com os isolados brasileiros BHI3745 e RJ-IB1 do CHIKV no MOI de 0.01, 0.05 e 0.1 e após diferentes tempos, o sobrenadante celular foi coletado para avaliar a liberação de partículas virais infecciosas por ensaio de plaque. A liberação de partículas virais infecciosas foi analisada comparando os isolados entre si (A, B, C) ou entre as MOIs de cada isolado por tempo (D, E, F, G, H, I, J, K). Os dados indicam a média \pm SEM de 2 replicatas biológicas com 3 replicatas técnicas. Múltiplo teste-t. p-valor < 0.05 (*), < 0.01 (**), < 0.001 (***), < 0.0001 (****).

Em seguida, foram avaliadas outras etapas da infecção por CHIKV, analisando as diferenças entre os isolados virais. Durante a replicação do mRNA genômico do CHIKV, é

produzido o intermediário de replicação, o RNA dupla-fita (dsRNA) (Spuul et al., 2011). Ademais, a literatura já mostrou que o CHIKV inibe a síntese proteica global da célula hospedeira (*shutoff* traducional). E isso poderia ser um mecanismo de evasão do sistema imune, uma vez que a tradução de mRNAs envolvidos em uma resposta antiviral, por exemplo, estaria inibida (White et al., 2021).

Nesse contexto, células SH-SY5Y infectadas com ambos os isolados do CHIKV na MOI 0.5 foram marcadas com um anticorpo específico que reconhece dsRNA (anticorpo J2), e fez-se a análise da produção de sRNA por Microscopia de Fluorescência (Fig. 7A, 7B, 7C, 7D). Além disso, as células infectadas nessa mesma MOI também foram tratadas com puromicina, um análogo do tRNA com capacidade de ser incorporada na cadeia polipeptídica nascente (Schmidt et al., 2009). Dessa maneira, a puromicina é incorporada em toda a cadeia polipeptídica nascente enquanto estiver presente no meio (Schmidt et al., 2009). Assim, após a searação das proteínas totais por SDS-PAGE e transferência para a membrana de nitrocelulose, esta foi incubada com anticorpo anti-puromicina para avaliar a síntese proteica global da célula hospedeira diante da infecção por CHIKV (Fig. 7E).

Células SH-SY5Y infectadas com ambos os isolados do CHIKV apresentam dsRNA a partir de 12 h.p.i. (Fig. 7B, 7D). Em 24 h.p.i., aproximadamente 100% das células estão positivas para a detecção de dsRNA (Fig. 7C, 7D). Não há diferença estatística significativa na produção de dsRNA entre os isolados (Fig. 7D). Também em 12 h.p.i., é possível observar uma diminuição da síntese proteica celular global diante da infecção pelos dois isolados do CHIKV quando comparado com o MOCK, o que permanece em 24 h.p.i. (Fig. 7E).

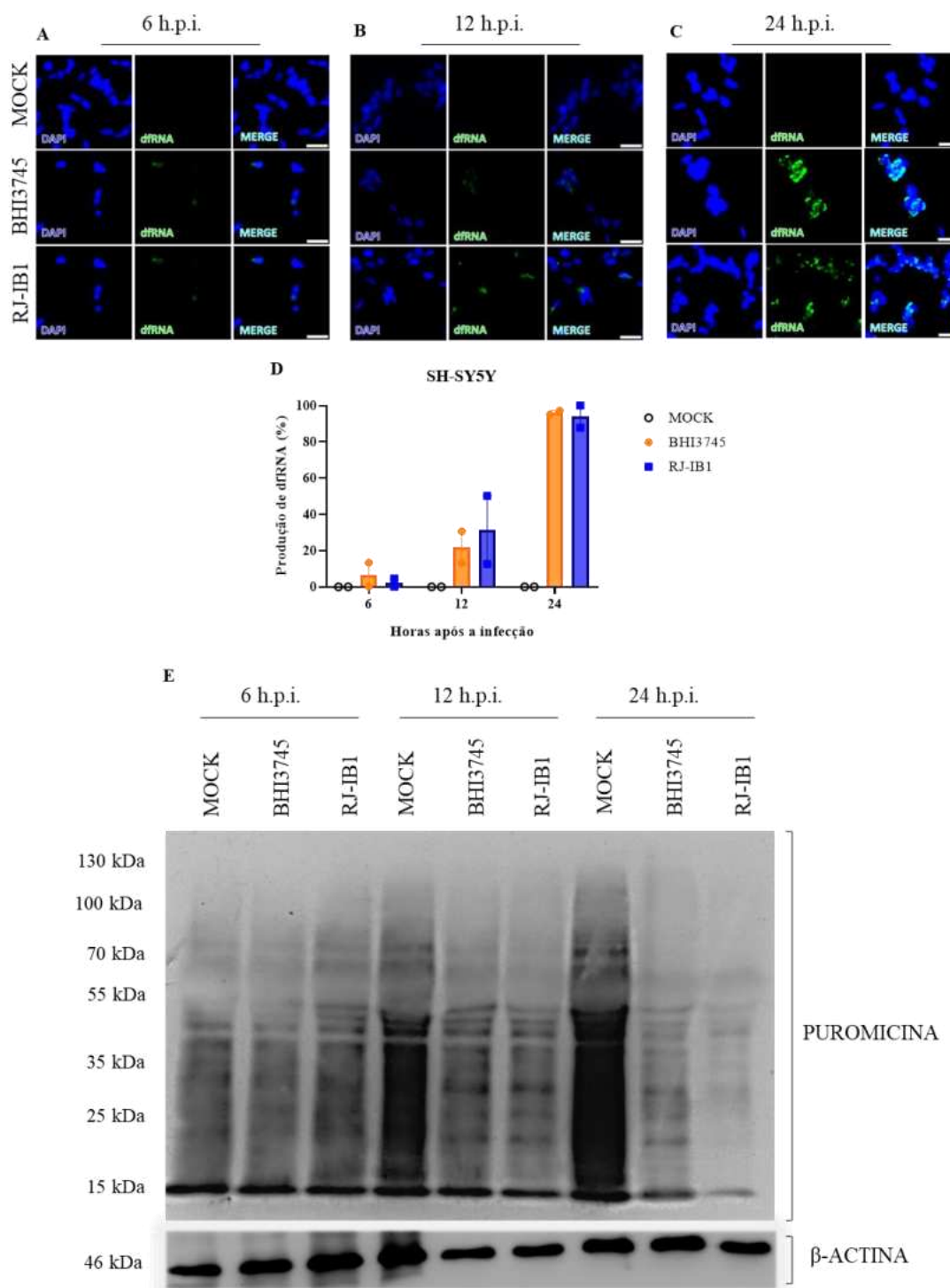


Figura 7. O CHIKV produz dRNA e induz o *shutoff* traducional na linhagem celular SH-SY5Y. Células SH-SY5Y foram infectadas com os isolados brasileiros BHI3745 e RJ-IB1 do CHIKV no MOI de 0.5 e após diferentes tempos, avaliou-se a produção de dRNA e a síntese proteica global da célula hospedeira por Microscopia de Fluorescência (A, B, C, D) e ensaio de SUnSET (E), respectivamente. Barra de escala: 30 μ M. Os dados indicam a média \pm SEM de 1 replicata biológica com 2 replicatas técnicas. Múltiplo teste-t. p-valor > ns.

A replicação do CHIKV é citopática, estando associada com a morte celular (Sourisseau et al., 2007). Um mecanismo de morte celular muito relacionado à infecção por CHIKV é a apoptose (Sourisseau et al., 2007; Joubert et al., 2012). Nesse contexto, foram avaliados os níveis de morte celular em 24 h.p.i. (Fig. 8). Utilizou-se PI, uma molécula fluorescente que se liga ao DNA, sendo capaz de passar pela membrana plasmática apenas diante da perda de integridade da mesma (Sawai e Damae, 2009). Também foi utilizada a Anexina conjugada a FITC, que se liga à fosfatidilserina, um marcador de apoptose (Sawai e Damae, 2009).

Em todas as MOIs avaliadas, é possível observar morte celular superior a 30% (Fig. 8). Essa morte celular é ainda mais evidente na maior MOI na infecção por ambos os isolados, estando acima de 70% (Fig. 8G, 8H, 8I). Na MOI 0.1, a morte celular é de 75,6% para isolado BHI3745 e 71% para o isolado RJ-IB1 (Fig. 8G, 8H, 8I).

Apesar de ambos os isolados do CHIKV apresentarem produção de dsRNA, inibição da síntese proteica celular global e indução de morte celular, a infecção pelo isolado RJ-IB1 produziu maiores níveis de partículas virais infecciosas. Portanto, decidimos utilizar esse isolado para as análises do efeito da DA sobre o CHIKV.

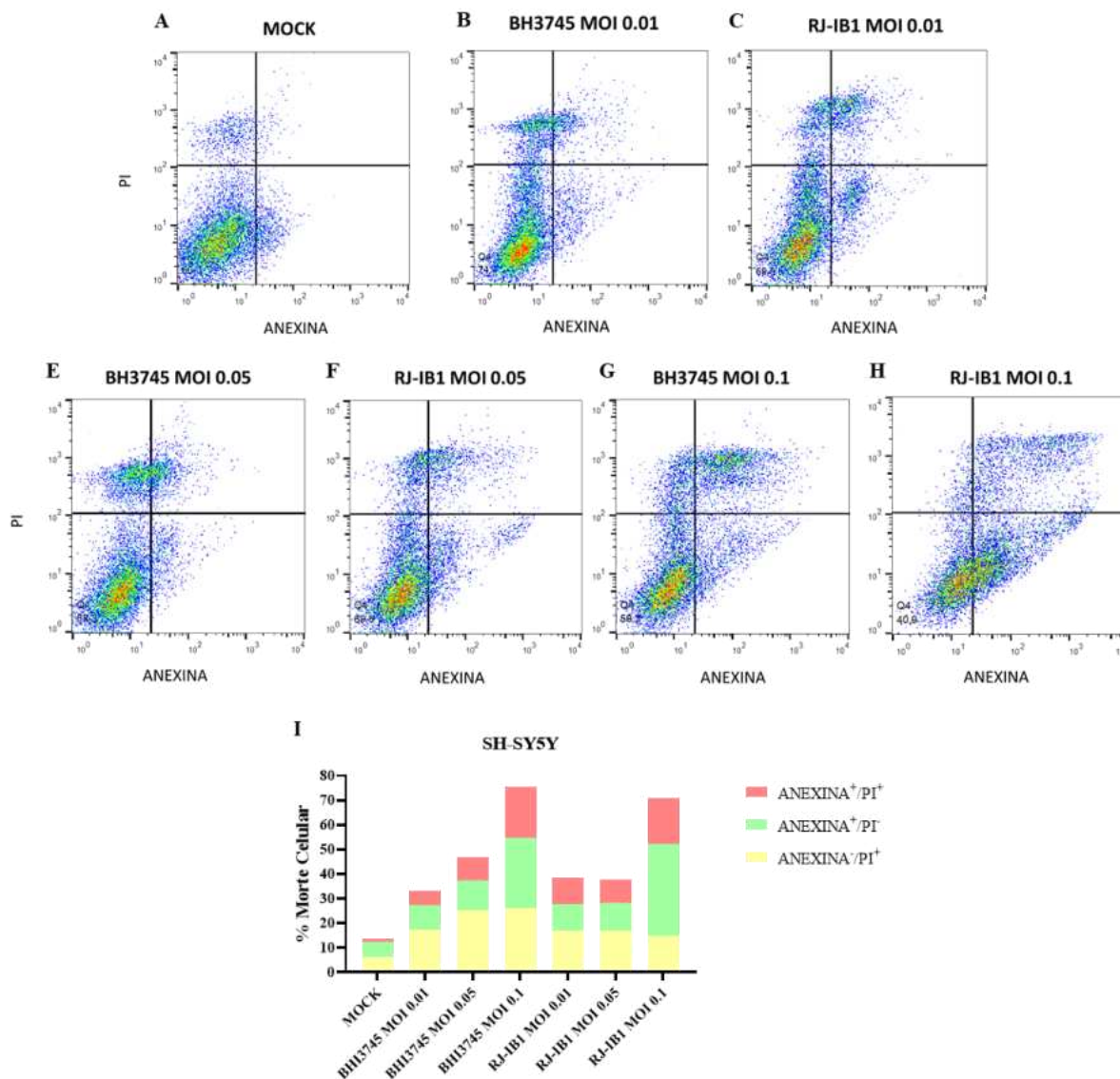


Figura 8. O CHIKV induz morte celular na linhagem celular SH-SY5Y. Células SH-SY5Y foram infectadas com os isolados brasileiros BH13745 e RJ-IB1 do CHIKV nos MOIs de 0.01, 0.05 ou 0.1 e após diferentes tempos, avaliou-se a morte celular por Citometria de Fluxo, utilizando os marcadores de morte celular Anexina e PI. Os dados mostram 1 replicata biológica com 1 replicata técnica. Não foi possível realizar análise estatística.

5.2. Cinética de expressão dos DRs na linhagem celular SH-SY5Y após o plaqueamento

A DA exerce o seu papel sobre a célula através de uma sinalização mediada por seus receptores presentes na membrana plasmática (Hoffman et al., 1983). Esse neurotransmissor é capaz de induzir a ativação de vias de sinalização distintas dependendo do receptor no qual se ligou, uma vez que os receptores da família do tipo D1 (DR1 e DR5) estão acoplados à

proteína G estimulatória, enquanto os da família do tipo 2, à proteína G inibitória (Grandy et al., 1989). Inicialmente, caracterizamos a expressão dos diferentes DRs sobre a linhagem celular SH-SY5Y.

Para isso, após diferentes tempos do plaqueamento das células SH-SY5Y, fez-se a coleta do lisado celular para avaliar, por RT-qPCR, a expressão relativa dos DRs utilizando o gene GAPDH como normalizador através do método ΔC_t (Fig. 9). Observa-se que a SH-SY5Y expressa todos os DRs e em altos níveis (Fig. 9A, 9B, 9C, 9D, 9E), tendo maior expressão de DR2 e DR4 (Fig. 9B, 9D).

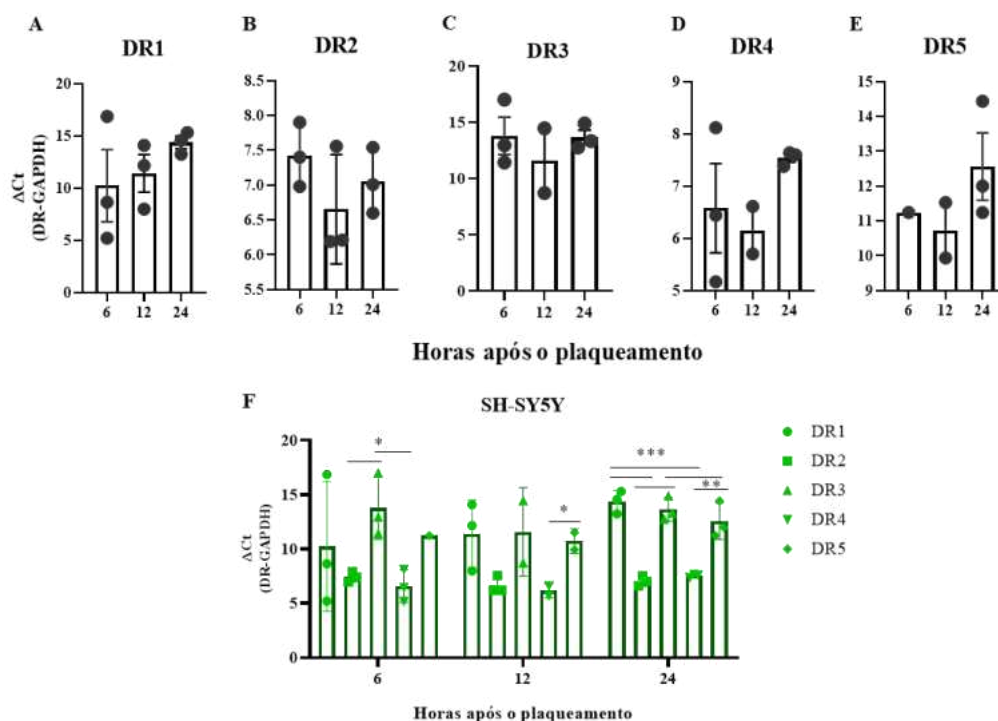


Figura 9. Expressão dos DRs na linhagem SH-SY5Y após o plaqueamento das células. Após o plaqueamento da linhagem SH-SY5Y, o lisado celular foi coletado em 6, 12 e 24 horas para avaliar, por RT-qPCR, a expressão relativa dos receptores (A, B, C, D, E), comparando os níveis dos DRs entre si (F). Os dados indicam a Média \pm SEM de 2 replicatas biológicas com 3 replicatas técnicas. Teste de t não pareado, p-valor < 0.05 (*), < 0.01 (**), < 0.001 (***)

5.3. Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular SH-SY5Y

Para avaliar o efeito do tratamento com a DA sobre a infecção por CHIKV na linhagem celular SH-SY5Y, avaliou-se a citotoxicidade do composto sobre essas células com o intuito de determinar uma faixa de concentração segura para os estudos com o composto.

As células foram tratadas com diferentes concentrações de DA e a viabilidade celular se manteve superior à 80% mesmo na maior concentração analisada, independente do tempo (Fig. 10). Em 150 e 200 μM de DA no ponto de 48 horas pós-tratamento, a viabilidade celular estava muito próxima a 80% (Fig. 10). Desse modo, considera-se até 100 μM uma faixa de concentração segura para o uso do composto. Como nenhuma das concentrações analisadas levou à alta perda da viabilidade celular, não atingindo nem mesmo valores próximos à viabilidade de 50%, não foi possível estabelecer o CC_{50} . O CC_{50} consiste na redução de 50% da viabilidade celular diante do tratamento com o composto (Indrayanto, Putra e Suhud, 2021).

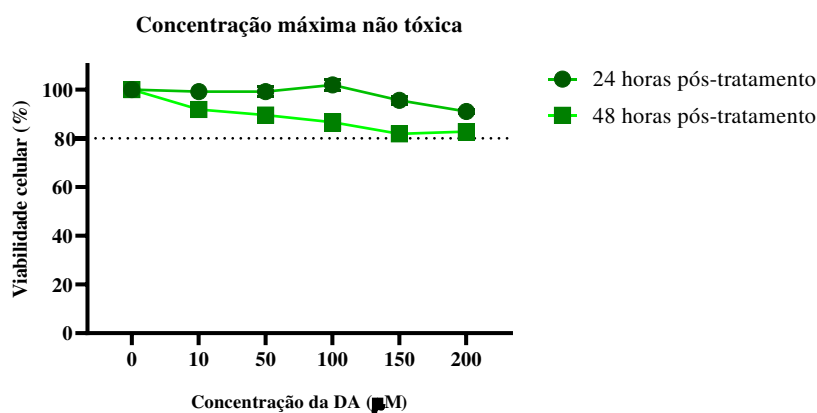


Figura 10. Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular SH-SY5Y. A linhagem SH-SY5Y foi tratada com diferentes concentrações de DA e depois de 24 e 48 horas, fez-se a análise da viabilidade celular por CellTiter-Blue para avaliar o efeito citotóxico do composto sobre as células. A partir disso, foi possível identificar a concentração máxima não tóxica do composto, que seria da manutenção da viabilidade celular de 80%. Os dados indicam a Média \pm SEM de 1 replicata biológica com 4 replicatas técnicas. A análise estatística não foi realizada.

5.4. Efeito da DA sobre a infecção por CHIKV na linhagem celular SH-SY5Y

Uma vez que as células de neuroblastoma humano são permissíveis ao CHIKV e expressam todos os DRs constitutivamente, o próximo objetivo foi avaliar o impacto do tratamento com a DA sobre a cinética de infecção.

No pós-tratamento, em que as células foram primeiramente infectadas com CHIKV e tratadas com diferentes concentrações de DA após o tempo da adsorção viral, a DA teve um efeito dose-dependente na inibição da liberação de partículas virais infecciosas, tendo a menor concentração reduzido a produção viral em 70%, e atingido 92% em 100 μM , na maior

concentração, (Fig 11A). Ademais, no pós-tratamento foi avaliada a concentração inibitória de 50% (IC_{50}), que consiste na concentração do composto que inibe a replicação viral em 50% (Swiney, 2011). O IC_{50} no pós-tratamento foi de 0.028 μ M, evidenciando que mesmo em baixas concentrações, ocorrerá inibição de pelo menos 50% da infecção (Fig. 11A). Como em 100 μ M houve maior potencial de inibição, avaliou-se a indução de ROS, a fim de compreender se o estresse oxidativo está associado com o efeito antiviral da DA. Não houve produção de ROS diante da infecção por CHIKV em comparação com o MOCK (Fig. 11B). Diante do tratamento com 100 μ M de DA em células infectadas, houve uma indução de 1,5 vezes na produção de ROS em comparação com células infectadas e com o MOCK (Fig. 11C).

Outrossim, no pré-tratamento com 5 minutos, em que as células foram tratadas com diferentes concentrações de DA por 5 minutos e em seguida infectadas com CHIKV, a menor concentração de DA levou a uma baixa redução da replicação viral em 6 h.p.i., mas em 24 h.p.i., a faixa de inibição foi de 50%; assim como na maior concentração, na qual a redução da infecção foi de aproximadamente 50% tanto em 6 quanto em 24 h.p.i. (Fig. 11D). Contudo, com 10 μ M de DA, é notória uma significativa diminuição da infecção por CHIKV em ambos os tempos analisados, principalmente em 24 h.p.i., em que a inibição é acima de 80% (Fig. 11D). O mesmo efeito é observado diante do tratamento com 50 μ M, em que apesar da inibição ser relativamente baixa em 6 h.p.i., ela alcança 80% em 24 h.p.i. (Fig. 11D). Não houve alteração nos níveis de ROS em células infectadas e células infectadas e pré-tratadas com 10 μ M (Fig. 11E, 11F).

Por fim, com 2 horas de pré-tratamento, tanto na concentração de 1 quanto de 10 μ M de DA, houve uma inibição da replicação viral superior a 40% em 24 h.p.i. (Fig. 11G). Nessas condições, a inibição da infecção é observada principalmente na menor concentração de DA (1 μ M), sendo acima de 90% em 24 h.p.i. (Fig 11G). Células infectadas e pré-tratadas com 1 μ M apresentaram um aumento de 1,5 vezes nos níveis de ROS em comparação com o mock e com células somente infectadas (Fig, 11G, 11I).

Dessa maneira, os resultados evidenciam que a DA apresenta um efeito antiviral contra a infecção pelo CHIKV, independente do momento no qual o tratamento é realizado. No entanto, para o pré-tratamento, as maiores inibições são atingidas com as menores concentrações de DA, ao contrário do que acontece no pós-tratamento.

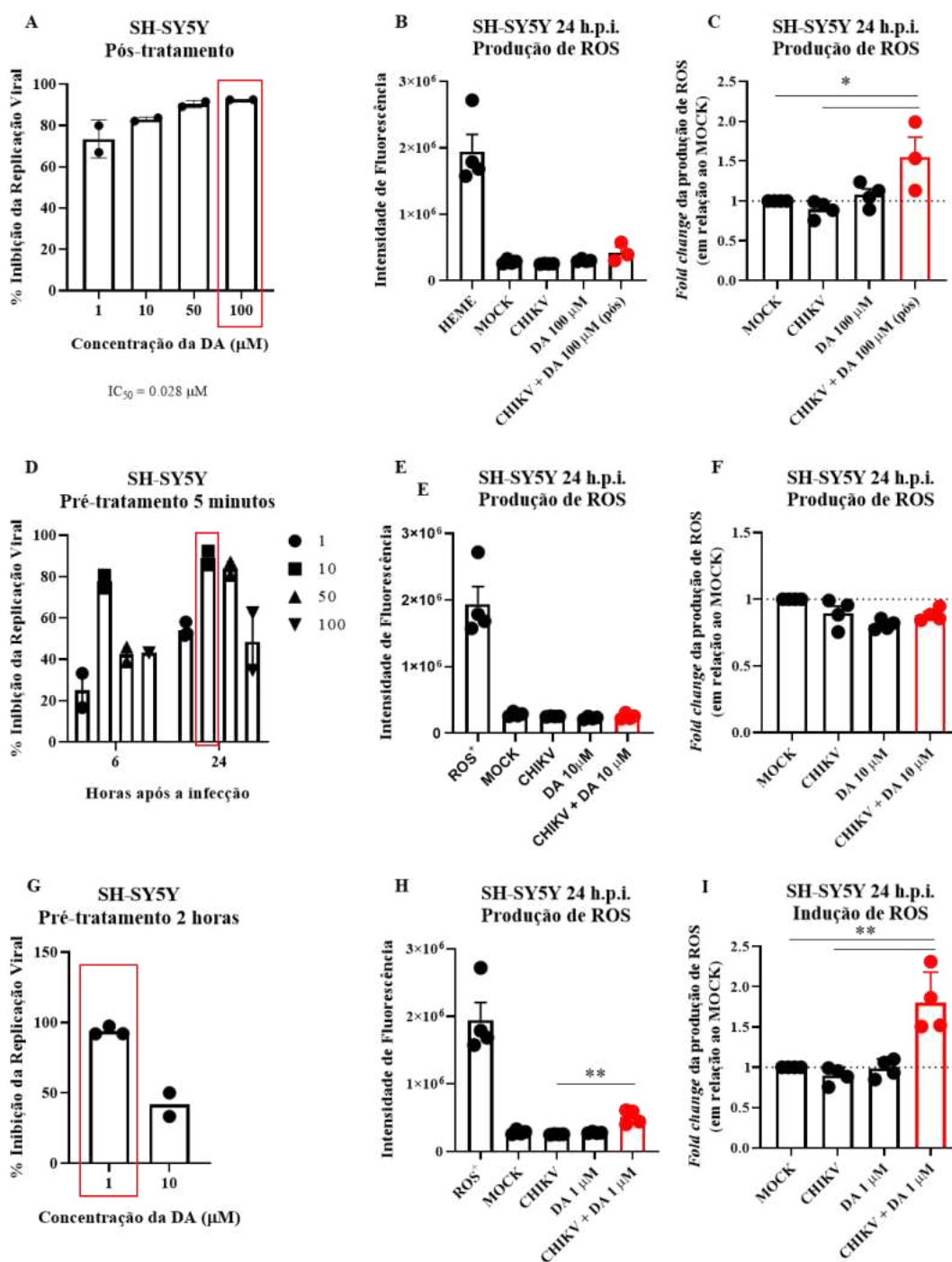


Figura 11. Impacto do tratamento com a DA sobre a replicação do CHIKV. A linhagem celular SH-SY5Y foi infectada com CHIKV e antes ou após a infecção, as células foram tratadas com diferentes concentrações de DA. Em 6 e 24 horas após a infecção, o sobrenadante celular foi coletado para avaliar a porcentagem de inibição da DA através da liberação de partículas virais infecciosas por ensaio de Plaque em comparação com células apenas infectadas. Os dados indicam a Média \pm SEM de 1 replicata biológica com 3 replicatas técnicas. A análise estatística não foi realizada.

5.5. Cinética de expressão dos DRs na linhagem celular HEK293T após o plaqueamento

Para saber se o efeito antiviral da DA se restringe a um tipo celular específico ou não, objetivou-se reproduzir as análises realizadas na linhagem celular SH-SY5Y agora na linhagem celular HEK293T, que são células de rim embrionário humano. Já se sabe na literatura científica que essas células são altamente permissíveis à infecção por CHIKV (Fonseca, 2021). Além disso, vale destacar que existe um sistema dopaminérgico no rim e a DA também está associada com a regulação de funções renais (Carey, 2001).

Para que as análises sejam realizadas, avaliou-se inicialmente se essas células expressam os DRs. Após a passagem, as células foram plaqueadas em diferentes tempos depois do plaqueamento e o lisado celular foi coletado para avaliar, por RT-qPCR, a expressão relativa dos receptores utilizando o gene GAPDH como normalizador através do método ΔC_t (Fig. 12). A HEK293T expressa todos os DRs, (Fig 12A, 12B, 12C, 12D, 12E), tendo maior expressão de DR4 em comparação com os outros DRs (Fig. 12F).

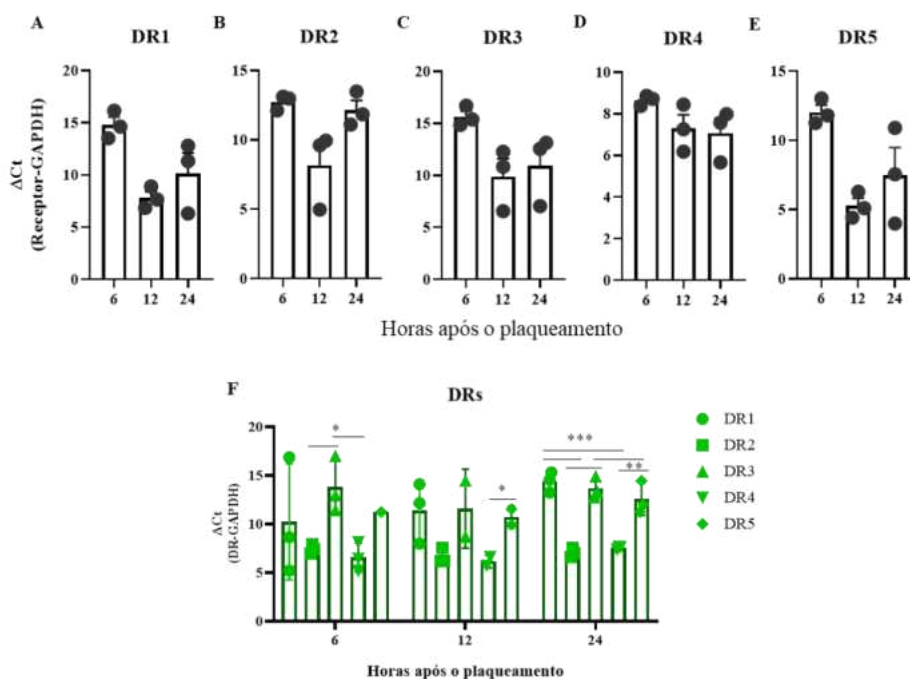


Figura 12. Expressão dos DRs na linhagem celular HEK 293T após o plaqueamento das células. Em 6, 12 e 24 horas após o plaqueamento das células, o lisado celular foi coletado para avaliar, por RT-qPCR, a expressão relativa dos receptores (A, B, C, D, E), comparando os níveis dos DRs entre si (F). Os dados indicam a Média \pm SEM de 2 replicatas biológicas com 3 replicatas técnicas. Teste de t não pareado, p-valor > 0.05 como não significativo estatisticamente.

5.6. Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular HEK293T

Para realizar as análises com a DA na linhagem celular HEK293T, avaliou-se o efeito citotóxico do composto (Fig. 13). As células foram tratadas com diferentes concentrações de DA por 24 ou 48 horas e fez-se a análise da viabilidade celular.

Em 24 horas após o tratamento, a viabilidade celular se manteve acima de 80% em todas as concentrações analisadas (Fig. 13). Contudo, em 48 horas pós-tratamento, a viabilidade celular se manteve exatamente em 80% em 100 μ M de DA e foi inferior a 80% na concentração de 150 μ M de DA (Fig. 13). As concentrações de DA que seguramente não levaram à redução de 80% da viabilidade celular foram apenas 10 e 50 μ M (Fig. 13). Assim, as análises posteriores com DA foram realizadas utilizando essas respectivas concentrações.

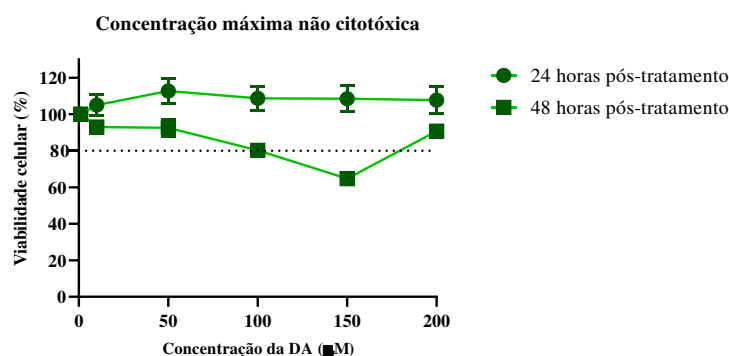


Figura 13. Citotoxicidade da DA sobre a linhagem celular HEK293T. A linhagem celular HEK293T foi tratada com diferentes concentrações de DA e em 24 e 48 horas após o tratamento, fez-se a análise da viabilidade celular por CellTiter-Blue para avaliar o efeito citotóxico do composto sobre as células. Os dados indicam a Média \pm SEM de 2 replicatas biológicas com 4 replicatas técnicas. A análise estatística não foi realizada.

5.7. Efeito da DA sobre a infecção por CHIKV em células HEK293T

Após caracterizar a expressão dos DRs diante de diferentes condições, as análises foram conduzidas para compreender o possível efeito antiviral da DA sobre a infecção por CHIKV. A linhagem celular HEK293T foi infectada com o CHIKV e após o tempo de adsorção viral foi tratada com 10 e 50 μ M de DA por 24 horas.

Houve uma redução significativa de 84% na liberação de partículas virais infecciosas quando as células infectadas foram tratadas com ambas as concentrações de DA (Fig 14A). Além disso, o CHIKV induziu em 3,7 vezes a produção de ROS quando comparado ao MOCK (Fig. 14B, 14C, 14D, 14E). Contudo, células infectadas e tratadas com 10 e 50 μ M

de DA apresentaram uma diminuição de 2,5 vezes na produção de ROS em comparação com células apenas infectadas (Fig. 14B, 14C, 14D, 14E).

Em relação ao *fold change*, em que observa-se a alteração da expressão do receptor em células infectadas e tratadas em relação a células infectadas não tratadas, ocorreu um aumento de aproximadamente 3 vezes da expressão de DR1 (Fig 14B) e de 2 vezes da expressão de DR5 (Fig 14F) diante do tratamento com 10 μ M de DA. Além disso, nessa mesma concentração, ocorre uma indução de cerca de 3 vezes de DR4 (Fig 14E). Em 50 μ M de DA, há um aumento da expressão de DR3 em 2 vezes (Fig 14D).

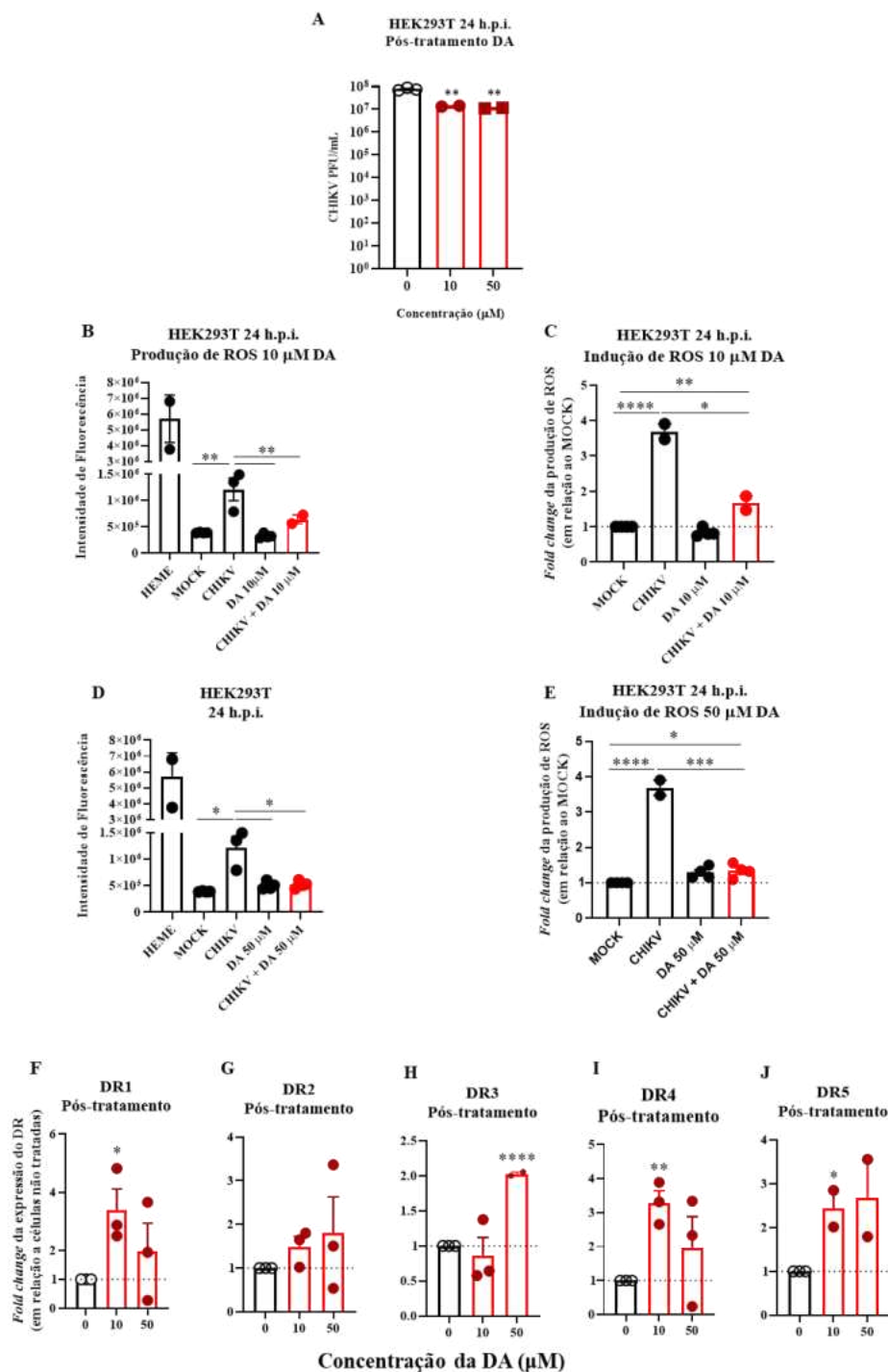


Figura 14. Impacto do pós-tratamento com a DA sobre a infecção pelo CHIKV. A linhagem celular HEK293T foi infectada com CHIKV e depois do tempo de adsorção, foi tratada com 10 e 50 μM de DA. Em 24 h.p.i., o sobrenadante celular foi coletado para o ensaio de Plaque (A) e o lisado celular foi coletado para análise do *fold change* em relação a células infectadas e não tratadas (B, C, D, E, F). Os dados indicam a Média \pm SEM de 2 replicatas biológicas com 3 replicatas técnicas. Teste de t não pareado, p-valor < 0.05 (*), < 0.01 (**), < 0.0001 (****).

5.8. Efeito da infecção por CHIKV e do tratamento com a DA sobre a expressão dos DRs em células HEK293T

Como houve alteração nos níveis de expressão dos DRs diante do tratamento com a DA em células infectadas por CHIKV, o objetivo foi avaliar se a expressão dos DRs poderia ser modulada somente diante da infecção ou do tratamento com a DA.

Foi avaliado o *fold change* dos DRs ao longo da infecção em relação ao MOCK, isto é, avaliar se os níveis da expressão dos DRs foram alterados diante dos diferentes tempos após a infecção. Houve indução de DR1 em 6 e 24 h.p.i. (Fig. 15A) e de DR5 em 6 h.p.i. (Fig. 15E), evidenciando que a infecção por CHIKV é capaz de modular a expressão dos DRs. Apenas os receptores do tipo 1 foram modulados, sendo necessários mais estudos para compreender como os DRs do tipo 1 estão associados com a infecção por CHIKV.

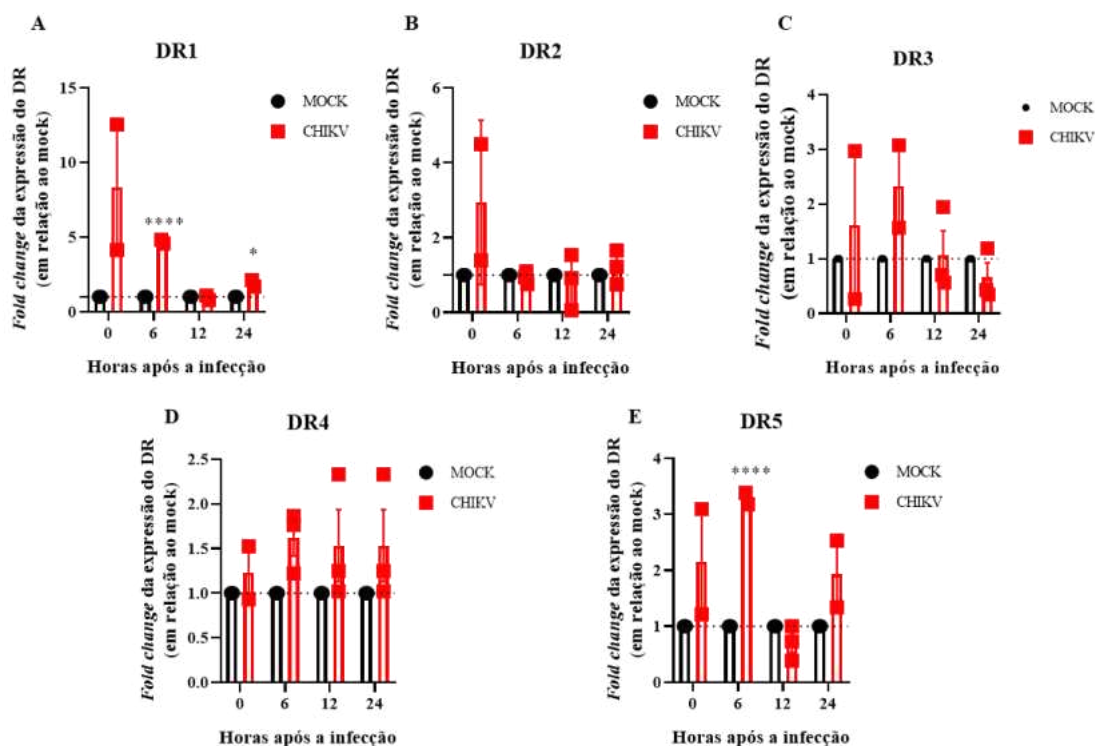


Figura 15. Expressão dos DRs diante da infecção por CHIKV. A linhagem celular HEK293T foi infectada com MOCK ou com o isolado RJ-IB1 do CHIKV no MOI de 0.01. Em diferentes tempos depois da infecção, o lisado celular foi coletado para avaliar os níveis de expressão relativa dos DRs ao longo do tempo tanto no MOCK (A, B, C, D, E), quanto na infecção por CHIKV (F, G, H, I, J); e para avaliar a modulação da expressão dos DRs pela infecção por CHIKV em comparação com o MOCK (K, L, M, N, O). Os dados indicam a Média \pm SEM de 2 replicatas biológicas com 3 replicatas técnicas. Teste de t múltiplo, p-valor < 0.05 (*), < 0.0001 (****).

Ademais, a linhagem HEK293T foi tratada com 10 e 50 μM de DA e em diferentes tempos após o tratamento, foi analisado o *fold change* dos DRs em relação ao tempo inicial de 0 horas após o tratamento, momento em que a DA foi adicionada no meio de cultivo celular. Nesse contexto, há um aumento significativo de 1.5 vezes de DR2 em 6 horas após o tratamento e de cerca de 4 vezes desse mesmo receptor em 24 horas após o tratamento (Fig 16B). Ocorre também uma diminuição de cerca de 0.5 vezes de DR3 em 6 horas após o tratamento (Fig 16C). Também é evidenciado uma redução de 0.5 vezes de DR4 em 24 horas após o tratamento (Fig 16D). O tratamento com 10 μM de DA modula somente a expressão de receptores do tipo 2, mas afeta diferentemente os seus níveis de expressão.

No tratamento com 50 μM de DA, ocorreu indução da expressão de DR1 de aproximadamente 2 vezes em 24 horas após o tratamento (Fig. 16F). Ademais, a expressão de DR3 teve uma redução significativa de aproximadamente 0.5 vezes em 6 e 12 horas após o tratamento (Fig. 16H). Também houve uma diminuição de 0.5 vezes de DR4 em 12 horas após o tratamento (Fig 16I). Diferente do tratamento com 10 μM de DA, em 50 μM de DA houve alteração dos níveis de expressão de receptores ambas as famílias.

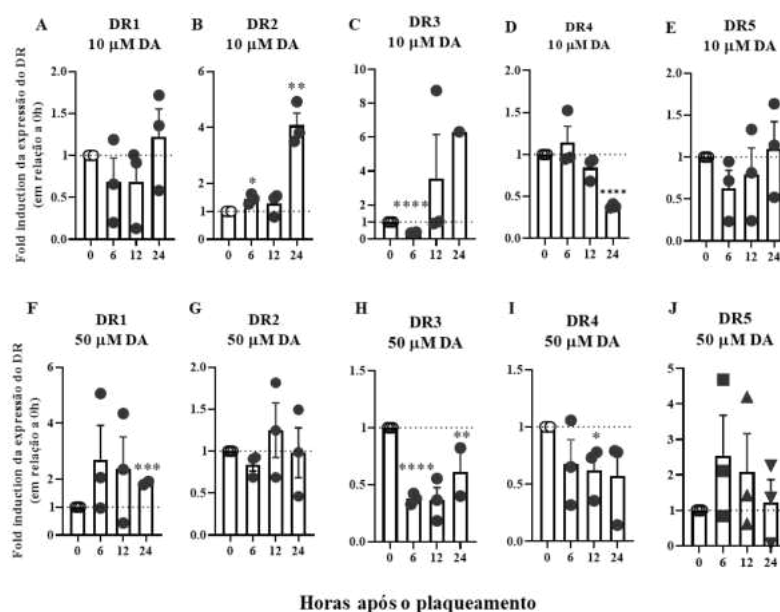


Figura 16. Expressão dos DRs diante do tratamento com 10 ou 50 μM de DA. Em diferentes tempos após o tratamento da linhagem celular HEK293T com 10 e 50 μM de DA, o lisado celular foi coletado para avaliar a alteração dos seus níveis ao longo do tempo em relação a 0 horas após o tratamento. Os dados indicam a Média \pm SEM de 2 replicatas biológicas com 3 replicatas técnicas. Teste de t não pareado, p-valor < 0.05 (*), < 0.01 (**), < 0.001(***), < 0.0001 (****).

6. DISCUSSÃO

A infecção por CHIKV causa uma doença de alta morbidade, o que é ainda mais agravado quando evolui para a cronicidade (Medina-Citrón et al., 2021). Assim, a qualidade de vida do paciente diminui, justificando o fato do vírus ocasionar uma doença auto-limitante (Medina-Citrón et al., 2021). Destaca-se, então, a importância de compreender quais fatores poderiam estar associados com o sucesso ou com o controle da infecção, a fim de futuramente buscar formas de combater o estabelecimento do CHIKV. Este trabalho procurou entender o efeito da DA sobre a infecção por CHIKV em células de neuroblastoma e de rim embrionário humano, uma vez que os DRs reduzem o estresse oxidativo, processo importante para o sucesso da infecção (Joubert et al., 2012).

Na literatura científica, ainda não foi demonstrada a permissividade de células SH-SY5Y à infecção por CHIKV. Contudo, essas células não-diferenciadas são permissíveis a outros vírus, como o vírus da Zika (ZIKV), produzindo títulos de 10^7 em 48 h.p.i. no MOI de 1 (Dias et al., 2023). Também são permissíveis aos vírus do gênero *Orthobunyavirus*, como o vírus La Crosse e o vírus Tahina, comumente associados com o desenvolvimento de doenças neurológicas (Evans, Winkler e Peterson, 2019). O título desses vírus atinge 10^7 em 48 h.p.i. tanto no MOI de 0.01 quanto no MOI de 0.1 (Evans, Winkler e Peterson, 2019). Tais resultados evidenciam a alta permissividade dessas células a outros vírus de diferentes famílias (Evans, Winkler e Peterson, 2019; Dias et al., 2023).

Para o CHIKV, independente das diferenças entre os isolados, a permissividade da SH-SY5Y à infecção é significativamente maior em relação aos demais vírus citados. A replicação do CHIKV nessas células ocorre com muito sucesso, tendo uma grande liberação de partículas virais infecciosas (Fig. 6). O título atingiu 10^{10} partículas virais infecciosas em 24 h.p.i. e em 36 h.p.i. diante da infecção pelo isolado RJ-IB1 e BHI3745, respectivamente (Fig. 6). Não se sabe por que as células SH-SY5Y são mais permissíveis à infecção por CHIKV em comparação à infecção por outros vírus.

As células SH-SY5Y, por exemplo, poderiam ser mais susceptíveis ao CHIKV, tendo maior expressão de Mxra8, molécula que atua como receptor para muitos membros do gênero *Alphavirus* (Zhang et al., 2018). Zhang e colaboradores mostraram que a infecção por *Alphavirus* foi prejudicada em diferentes tipos celulares diante da ausência de Mxra8 (Zhang et al., 2018). Nesse contexto, se a SH-SY5Y apresenta uma alta expressão de Mxra8, esses

receptores poderiam levar à internalização da partícula viral de maneira eficaz, contribuindo para o estabelecimento de uma infecção mais produtiva. Para comprovar esse fator, futuramente será de grande importância realizar técnicas que permitam observar a expressão dessa proteína na membrana celular, como Western-Blot e Citometria de Fluxo (Zhang et al., 2018).

Além disso, o CHIKV induz o *shutoff* traducional na célula hospedeira, o que também foi observado em outros modelos *in vitro*, como fibroblastos humanos primários (White et al., 2011). O CHIKV inibiu a síntese proteica global em fibroblastos a partir de 8 h.p.i. no MOI de 10, mas White e colaboradores afirmam que o *shutoff* também é observado nos MOIs de 0.1 e 1 (White et al., 2011). A partir de 16 h.p.i., não é mais possível observar síntese proteica nessas células (White et al., 2011). Os dados da inibição da síntese proteica celular global em fibroblastos primários são normalizados pelo GAPDH, enquanto os resultados apresentados neste trabalho são normalizados pela β -Actina (Fig. 7E; White et al., 2011). Tanto o GAPDH quanto a β -Actina são proteínas constitutivas da célula expressas ubiquitivamente, sendo de grande relevância para a sobrevivência celular (Sikand et al., 2012).

Os níveis de GAPDH em fibroblastos primários e de β -Actina em SH-SY5Y mostram que a célula infectada está viva e que a redução da síntese proteica ocorreu por um efeito direto do CHIKV sobre a tradução da célula hospedeira e não pela possibilidade de morte celular como consequência da infecção (White et al., 2011). Ademais, em 8 e 16 h.p.i., é possível detectar a PC viral em fibroblastos primários infectados com o CHIKV (White et al., 2011). Quanto maior a expressão da PC, maior a inibição da síntese proteica celular, evidenciando que a replicação viral induz o *shutoff* traducional (White et al., 2011). Posteriormente, pretendemos relacionar o *shutoff* com os níveis de expressão proteica viral, a fim de comprovar que o vírus inibe a síntese proteica celular para favorecer a síntese proteica viral.

Destaca-se ainda que na infecção pelo isolado BHI3745, as MOIs de 0.01 e 0.1 apresentaram um cenário de replicação distinto entre si, o que não foi observado para os vírus do gênero *Orthobunyavirus* (Evans, Winkler e Peterson, 2019). Evans, Winker e Peterson demonstraram que não houve diferença na produção de partículas virais infecciosas entre osas respectivas MOIs, enquanto o CHIKV a partir de 24 h.p.i. apresentou maior replicação

na MOI de 0.01 em comparação com a MOI de 0.1 (Evans, Winkler e Peterson, 2019). Por outro lado, a quantidade de vírus adicionada à cultura celular interfere diretamente no estabelecimento da infecção. Altas doses de um determinado inóculo ativam mais rapidamente o sistema imune inato, acionando uma resposta pró-inflamatória inicial capaz de controlar a infecção (Handel et al., 2018). Os nossos dados evidenciam que a adição de CHIKV em altas concentrações na cultura celular podem contribuir para a infecção ser menos produtiva em comparação com a adição de CHIKV em baixas concentrações (Fig. 6).

Por outro lado, no caso do CHIKV, sabe-se que a replicação é altamente citopática, levando a alterações na membrana plasmática da célula hospedeira e à morte da célula, por exemplo (Sourisseau et al., 2007). Nesse contexto, utilizar MOIs maiores que 0.01 para realizar a infecção com CHIKV *in vitro* pode ser uma quantidade alta o suficiente para uma intensa replicação viral, mas que levaria rapidamente à perda da viabilidade celular. Os dados apresentados mostraram que diante da infecção por ambos os isolados do CHIKV, a morte celular é mais elevada no maior MOI 0.1, sendo de 75,6% para o BHI3745 e 71% para o RJ-IB1 (Fig. 8).

Vale lembrar que, especificamente, a infecção por CHIKV em células de neuroblastoma humano foi caracterizada para mesma linhagem (ECSA), mas com dois isolados virais diferentes: BHI3745 e RJ-IB1. Em 24 h.p.i., em todas as MOIs analisadas, a infecção por RJ-IB1 apresentou maior título viral em relação ao BHI3745, e essa diferença foi mantida para os tempos posteriores (Fig. 6). Para outros tipos celulares, como células renais humanas e fibroblastos murinos, essa diferença também foi observada, tendo maior replicação do RJ-IB1 em comparação com o BHI3745 na MOI de 0.05 (Fonseca, 2021). Esses dados também se reproduziram *in vivo*, em que ao analisar a viremia em camundongos SV129 selvagens infectados com CHIKV, houve maior produção de título viral do RJ-IB1 em comparação com o BH3745 (Fonseca, 2021).

Os resultados, juntamente com os dados apresentados por Fonseca 2021, indicam que o RJ-IB1 estabelece uma infecção melhor não só em células de neuroblastoma humano, mas também em outros tipos celulares distintos (Fonseca, 2021). O interessante é que a cepa BHI3745 foi isolada na Feira de Santana, na Bahia, onde ocorreram os primeiros casos de infecção autóctone por CHIKV (Frutuoso et al., 2020). Já a cepa RJ-IB1 foi isolada no Rio de Janeiro, durante a epidemia de 2016 (Cunha et al., 2017). O RJ-IB1 apresenta algumas

mutações no genoma em relação à cepa BHI3745, como mutações únicas na região de nsP4 e na proteína estrutural E1 (Cunha et al., 2017). Nesse contexto, o RJ-IB1 pode ter adquirido mutações que favoreceram a replicação, produzindo maior título viral *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, as células SH-SY5Y podem ser diferenciadas a neurônio maduro, podendo expressar um fenótipo mais colinérgico ou dopaminérgico, ambos diferenciados utilizando ácido retinoico (Kovalevich e Langford, 2013). A diferenciação ocorre pelo uso de ácido retinóico, mas os diferentes fenótipos dependem da adição de uma formulação de ésteres de forbol, que permitem a diferenciação de neurônios maduros com fenótipo dopaminérgico (Kovalevich e Langford, 2013). Células SH-SY5Y diferenciadas expressam maiores características dopaminérgicas e aumento nos níveis do transportador de dopamina, configurando um modelo *in vitro* mais completo para estudos sobre a DA (Lopes et al., 2017).

Em neurônios maduros originados da diferenciação de células SH-SY5Y, a infecção por CHIKV induziu efeito citopático, tendo aumento de sincício (Dwanwani et al., 2012). Um ponto negativo foi a ausência de dados evidenciando que ocorre liberação de partículas virais infecciosas nessa célula, não sendo possível saber se o CHIKV é capaz de exercer todo o seu ciclo replicativo nessas células com sucesso (Dwanwani et al., 2012). O nosso trabalho apenas mostrou que o vírus é capaz de infectar SH-SY5Ys não diferenciadas (Fig. 6, 7, 8). Contudo, é de grande interesse caracterizar também a infecção em neurônio maduro, avaliando a produção de vírions e os níveis de partícula viral total através do genoma do CHIKV.

A infecção por ZIKV em células SH-SY5Y diferenciadas por ácido retinóico foi estimulada quando comparada com a infecção em células não diferenciadas (Martín et al., 2018). O mesmo fenômeno poderia ser observado para o CHIKV, contribuindo para o sucesso da infecção. Além disso, células SH-SY5Y diferenciadas por ácido retinóico apresentaram maiores características dopaminérgicas (Lopes et al., 2017). Seria de grande interesse caracterizar a infecção por CHIKV em células diferenciadas, já que apresentam características dopaminérgicas, sendo possível compreender melhor o efeito da DA sobre o CHIKV futuramente. O uso de células diferenciadas permitiria avaliar se a DA apresenta atividade anti-CHIKV nessas células ou se esse efeito é restrito à SH-SY5Y não-diferenciada.

A DA apresentou efeito antiviral *in vitro* contra a infecção por uma cepa do SARS-CoV-2 isolada na Itália em 2019 em células epiteliais pulmonares (Limanaqi et al., 2022).

Células infectadas e tratadas com a DA nas concentrações de 10, 50 e 100 μM apresentaram redução da liberação de RNA viral no sobrenadante celular (Limanaqi et al., 2022). Diferentemente do nosso trabalho, Limanaqi e colaboradores evidenciaram no sobrenadante viral apenas a liberação de RNA genômico, enquanto nós analisamos somente a liberação de partículas virais infecciosas (Limanaqi et al., 2022). Nós conseguimos avaliar de fato o efeito da DA sobre a produção de vírus infeccioso, ou seja, aquele que tem a capacidade de infectar e exercer com sucesso o seu ciclo replicativo completo em outra célula. Contudo, precisamos avaliar a produção de partículas virais totais avaliando os níveis de RNA genômico tanto no sobrenadante quanto no lisado celular. No sobrenadante, avaliar os níveis de RNA genômico é importante para saber se a liberação de partículas virais totais é afetada pela DA e para estabelecer uma razão entre a liberação de partículas virais totais e o de partículas virais infecciosas. E no lisado, os níveis de RNA genômico permitiria uma comparação entre células tratadas com a DA e células não tratadas, avaliando se o composto poderia ter um impacto na produção do vgRNA e, portanto, ser um indicativo de que a replicação estaria sendo afetada.

Limanaqi e colaboradores evidenciaram que células infectadas e tratadas com 10 μM DA antes do tempo de adsorção viral, apresentaram uma redução na liberação de vgRNA de aproximadamente 2 vezes (Limanaqi et al., 2022). Os nossos dados mostram que o tratamento com a mesma concentração de DA sobre a infecção por CHIKV na SH-SY5Y leva a uma inibição da replicação, atingindo aproximadamente 80% de inibição (Fig. 11).

A princípio, a DA apresenta um efeito inibitório mais evidente na infecção por CHIKV em relação à infecção por SARS-CoV-2 (Limanaqi et al., 2022). Entretanto, os parâmetros utilizados no nosso trabalho para representar a inibição da infecção viral e do trabalho desenvolvido por Limanaqi e colaboradores são diferentes (Limanaqi et al., 2022). Embora a inibição da infecção seja, em um primeiro momento, menor para o SARS-CoV-2 e maior para o CHIKV, não se sabe se o efeito da DA ocorre majoritariamente sobre a produção de partículas virais totais ou somente sobre a liberação de partículas virais infecciosas. Tal fato justifica a necessidade de avaliar os níveis de RNA genômico intra e extracelular.

Além disso, na SH-SY5Y, os nossos dados evidenciam que o pré-tratamento dessas células com a DA por 5 minutos na concentração de 10 μM inibiu a replicação viral em mais

de 80% (Fig. 11). No entanto, no pré-tratamento com DA por um período mais longo, por exemplo durante 2 horas, não levou a uma alta inibição da infecção (aproximadamente 50%).

Quando as células pulmonares foram tratadas tanto com 50 μM quanto 100 μM de DA, houve uma inibição da infecção de 10 vezes (Limanaqi et al., 2022). Essas mesmas concentrações inibiram 80% da infecção por CHIKV em células de neuroblastoma humano, evidenciando que essas concentrações possuem atividade inibitória contra diferentes em diferentes tipos de célula (Fig. 11).

Além disso, o pré-tratamento de 5 minutos com 10 μM de DA inibiu em mais de 80% a produção de partículas virais infecciosas em 24 h.p.i. (Fig. 11). Contudo, o pré-tratamento por um período maior de tempo induz uma inibição de 50% da infecção (Fig. 11). Tais dados sugerem que apenas por 5 minutos, a DA seria o suficiente para exercer o seu efeito na célula e contribuir para a inibição da infecção e que a ação do composto seria tempo-dependente. Mais estudos são necessários para avaliar qual seria esse impacto sobre a célula e como ele estaria relacionado com o controle da infecção.

Foi demonstrado também que a DA apresenta uma atividade antioxidante em plantas (Gomes et al., 2014). Em plantas, os níveis de ROS, como O_2 e H_2O_2 , diminuiriam diante do tratamento com 100 a 1000 μM de DA (Gomes et al., 2014). Com exceção de H_2O_2 , em que não ocorre redução dos seus níveis diante do tratamento com 1000 μM de DA (Gomes et al., 2014). Esse cenário pode estar acontecendo pela dessensibilização do receptor em resposta a altas quantidades da DA, tendo a internalização do DR (Laduron, 1997). Hipotetizamos, portanto, que em um primeiro momento, com a internalização do DR, a DA não conseguiria exercer a sua atividade sobre a célula e não levaria à redução do estresse oxidativo. Essa questão poderia justificar o motivo do pré-tratamento de células SH-SY5Y com a DA por 5 minutos na concentração de 100 μM não induzir a redução da replicação viral em 24 h.p.i., diferentemente do observado com 10 e 50 μM (Fig. 11).

Outro fator a se considerar é que na infecção por SARS-CoV-2, concentrações de DA menores que 10 μM não apresenta atividade inibitória da infecção (Limanaqi et al., 2022). Essas concentrações poderiam não ser o suficiente para levar à ativação de vias sinalizadas pelos DRs. Entretanto, isso foi diferente do observado para células de neuroblastoma humano, em que o tratamento após a infecção com 1 μM de DA induziu uma inibição da infecção superior a 70% (Fig. 11). Além disso, quando essas células são tratadas com 1 μM

de DA por 2 horas e em seguida infectadas com o CHIKV, a inibição da replicação viral atinge 90% (Fig. 11). Portanto, a atividade anti-CHIKV da DA sobre o CHIKV em células SH-SY5Y pode ser observado em baixas concentrações do composto, sendo necessário saber se em concentrações na faixa de nM, também pode ser observada uma inibição da infecção.

Em células HEK293T também foi observada inibição de 86% da replicação viral diante do pós-tratamento com a DA, tendo indução da expressão dos DRs de ambas as famílias (Fig. 14). DR1 e DR5 pertencem à mesma família, enquanto DR3 e DR4 pertencem à família do tipo 2 (Qu et al., 1989). Portanto, esses receptores induzem a ativação de vias de sinalização distintas, mas ambos estão associados com o efeito antiviral da DA sobre a infecção por CHIKV na linhagem celular HEK293T. Estudos evidenciam que tanto os receptores da família do tipo D1 quanto os receptores da família do tipo D2 inibem a produção de ROS, o que poderia ser uma limitação para a indução do estresse oxidativo e, assim, prejudicaria o curso da infecção pelo CHIKV (Armando et al., 2007; Yu et al., 2011; Lu et al., 2013; Liu et al., 2021).

Os DRs podem ser modulados por uma série de fatores, como a exposição ao fator de crescimento de epiderme, que foi associado com o aumento dos níveis de mRNA de DR2 (Missale et al., 1991). Além disso, a administração de antipsicóticos eleva os níveis de mRNA de DR2, mas não de DR1 (Bernard, Moine e Bloch, 1993). Nesse contexto, células renais tratadas com a DA na concentração de 10 μ M também apresentaram ao longo do tempo alteração da expressão de DRs somente da família do tipo 2 (Fig. 16). Por outro lado, diante da infecção por CHIKV em células renais, apenas a expressão de DRs da família do tipo 1 foram modulados (Fig. 15). Assim como representado na literatura, uma determinada molécula pode levar à ativação de apenas uma família de receptores, sendo importante investigar futuramente o que define essa regulação isolada. Entretanto, o tratamento de células renais com 50 μ M de DA induziu, ao longo do tempo, a alteração tanto de receptores da família do tipo 1 quanto da família do tipo 2, indicando que a quantidade do estímulo pode influenciar na expressão dos DRs de modo geral (Fig. 16).

Células renais, especificamente a linhagem HEK293T, apresentaram redução de enzimas associadas à indução do estresse oxidativo quando tratadas com agonistas para os DRs de ambas as famílias (Yu et al., 2011). Sabe-se que a DA pode interagir com os DRs tanto da família do tipo 1 quanto do tipo 2 (Hoffman et al., 1993). Esse fator pode estar

relacionado com a redução da replicação viral na HEK293T tratadas após a infecção com a DA quando comparadas apenas com células infectadas (Fig. 14).

Além disso, o fato de agonistas e antagonistas reduzirem o estresse oxidativo nas células HEK293T mostra uma outra possibilidade do efeito antiviral estar associado aos DRs (Yu et al., 2011). Inclusive, durante a inibição da infecção viral e 24 h.p.i., ocorre a indução de DRs das duas famílias de receptores nas células renais (Fig. 14). Um ponto negativo dessa relação é que ainda não se sabe se o efeito antiviral está, de fato, relacionado a ambas as famílias igualmente ou se está mais associado a uma determinada família de DRs. Diante disso, pretendemos investigar se uma determinada família de DR está mais associada ao efeito antiviral da DA em relação a outra família, utilizando agonistas e antagonistas para todos os DRs.

Além disso, células HEK293T consistem em uma importante ferramenta para estudar o estresse oxidativo e a ativação de processos celulares envolvidos com esse mecanismo (Joubert et al., 2012). Joubert e colaboradores evidenciaram que um mecanismo associado com a ativação do estresse oxidativo pela infecção por CHIKV é a indução da autofagia (Joubert et al., 2012). Krejbich e colaboradores mostraram que a autofagia é um processo necessário para o sucesso da infecção, tendo aumento do número de células infectadas diante da adição de rapamicina, que inibe mTOR e contribui para a ativação de vias autofágicas (Krejbich-Trotot et al., 2011). Ademais, houve também uma indução de cerca de duas vezes da produção de vRNA em HEK293T tratadas com rapamicina quando comparado com células não tratadas (Krejbich-Trotot et al., 2011). Maiores níveis da PC do CHIKV também foram detectados após o tratamento com rapamicina (Krejbich-Trotot et al., 2011).

Contudo, os estudos relacionando autofagia e infecção por CHIKV são muito limitados (Krejbich-Trotot et al., 2011; Joubert et al., 2012). Por conseguinte, pretendemos avaliar o impacto da autofagia sobre o CHIKV, caracterizando a expressão de proteínas envolvidas em vias autofágicas, como LC3-I e LC3-II, como o observado em fibroblastos murinos (Joubert et al., 2012). Essa análise será feita não só na HEK293T, mas também na SH-SY5Y, com o intuito de compreender se a indução da autofagia ocorre também em outros tipos celulares relevantes para estudar sobre o efeito da DA sobre a infecção.

Outra ferramenta muito relevante para estudar a relação da autofagia com o CHIKV é utilizar células *knockout* (KO), ou seja, modificadas geneticamente para não expressar

moléculas importantes no processo autofágico. Joubert e colaboradores utilizaram fibroblastos KO para Atg5, que é a proteína envolvida diretamente na formação do autofagossomo (Joubert et al., 2015). Inicialmente, utilizar células SH-SY5Y e HEK293T KO para Atg5 possibilita compreender se a autofagia impacta não só na infecção por CHIKV mas se ela também pode estar associada diretamente com o efeito antiviral da DA sobre a infecção por CHIKV.

7. CONCLUSÃO

Os isolados BHI3745 e RJ-IB1 apresentam diferença na infecção em células SH-SY5Y não diferenciadas. A infecção é mais produtiva para o isolado RJ-IB1, sendo necessário compreender futuramente por qual motivo isso acontece.

A DA inibiu a infecção por CHIKV em diferentes linhagens celulares susceptíveis à infecção dependendo da concentração e do momento no qual o tratamento foi realizado. Nesse contexto, em células de neuroblastoma humano, o efeito antiviral da DA pode ser observado em um pré-tratamento de 2 horas ou de somente 5 minutos e no pós-tratamento de 24 horas, tendo maior inibição no pré-tratamento de 2 horas com 1 μM de DA e de 5 minutos com 10 μM de DA e no pós-tratamento com 100 μM de DA. Em células de rim embrionário humano, a DA apresenta efeito antiviral em ambas as concentrações analisadas, tendo indução da expressão dos DRs.

Tanto na linhagem celular SH-SY5Y quando na linhagem HEK293T, os níveis dos DRs são modulados temporalmente. Ademais, na linhagem HEK293T, há uma indução da expressão dos DRs de ambas as famílias em células infectadas diante do tratamento com 10 e 50 μM de DA, que inibiram a produção de partículas virais infecciosas. Desse modo, os DRs possivelmente estão associados com o efeito antiviral da DA sobre a infecção nesse tipo celular, sendo necessário avaliar se na linhagem celular SH-SY5Y, o mesmo fenômeno é observado.

A diminuição do estresse oxidativo pode estar associada com o efeito antiviral da DA na HEK293T, mas não na SH-SY5Y. Contudo, vale destacar que o fenômeno observado na HEK293T pode ser somente uma consequência da atividade da DA, que inibiu a produção de partículas virais infecciosas, tendo menor produção de ROS. Portanto, é necessário investigar a relação do estresse oxidativo e a DA, e se isso de fato gera impactos na replicação viral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, R; HAUER, D; McPHERSON, RL; UTT, A; KIRBY, IT; COHEN, MS; MERITS, A; LEUNG, AKL; GRIFFIN, DE. ADP-ribosyl-binding and hydrolase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication. *Proceedings of National Academic Sciences*. v. 115, n. 44, p. 10457-10466, 15 out 2018. doi: 10.1073/pnas.1812130115.
- AKHRYMUCK, I; KULEMZIN, SV; FROLOVA, EI. Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *J Virol*. 2012 Jul;86(13):7180-91. doi: 10.1128/JVI.00541-12.
- ANDÉN, NE; DAHLSTROM, A; FUXE, K; LARSSON, K. Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*. v. 24, p. 263-274, ago. 1966. doi: 10.1111/j.1600-0773.1966.tb00389.x.
- ANDREU,SANCHEZ, S; CHEN, W; STILLER, J; ZHANG, G. Multiple origins of a frameshift insertion in a mitochondrial gene in birds and turtles. *Gigascience*. 2021 Jan 19;10(1):giaa161. doi: 10.1093/gigascience/giaa161.
- ARMANDO, I; WANG, X; VILLAR, VAM; JONES, JE; ASICO, LD; ESCANO, C; JOSE, PA. Reactive Oxygen Species–Dependent Hypertension in Dopamine D 2 Receptor–Deficient Mice. *Hypertension*. v. 49, n. 3, p. 672-678, mar 2007. doi: 10.1161/01.hyp.0000254486.00883.3d.
- BERGLUND, P; FINZI, D; BENNICK, JR; YEWDELL, JW. Viral alteration of cellular translational machinery increases defective ribosomal products. *Journal of Virology*. 2007 Jul;81(13):7220-9. doi: 10.1128/JVI.00137-07.
- BHALLA, N; SUN, C; LAM, LKM; GARDNER, C; CHRISTINA, L; RYMAN, K; KLIMSTRA, WB. Host translation shutoff mediated by non-structural protein 2 is a critical factor in the antiviral state resistance of Venezuelan equine encephalitis virus. *Virology*, [S.L.], v. 496, p. 147-165, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.06.005>.
- BURN, JH; RAND, MJ. The depressor action of dopamine and adrenaline. *Br J Pharmacol Chemother*. 1958 Dec;13(4):471-9. doi: 10.1111/j.1476-5381.1958.tb00240.x.
- CAREY, D; MYERS, RM; DERANITZ, CM; JADHAV, M; REUBEN, R. The 1964 chikungunya epidemic at vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, [S.L.], v. 63, n. 4, p. 434-445, jan. 1969. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(69\)90030-3](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(69)90030-3).
- CAREY, RM. Paracrine Regulator of Sodium Homeostasis and Blood Pressure. *Hypertension*. v. 38, n. 3, p. 297-302, 1 set 2021. doi: 10.1161/hy0901.096422
- CHATTERJEE, S; KUMAR, S; MAMIDI, P; DATEY, A; SENGUPTA, S; MAHISH, C; LAHA, E; DE, S; KESHRY, SS; NAYAK, TK. DNA Damage Response Signaling Is Crucial for Effective Chikungunya Virus Replication. *Journal Of Virology*, [S.L.], v. 96, n. 23, p. 1334-1422, 14 dez. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01334-22>.
- CHEUNG, Y; LAU, WK; YU, M; LAI, CS; YEUNG, S; SO, KF; CHANG, RC. Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 127-135, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2008.11.001>.
- CHOI, JP; KIM, YS; TAE, YM; CHOI, EJ; HONG, BS; JEON, SG; GHO, YS; ZHU, Z; KIM, YK. A viral PAMP double-stranded RNA induces allergen-specific Th17 cell response in the airways which is dependent on VEGF and IL-6. *Allergy*. 2010 Oct;65(10):1322-30. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02369.x.

- CLARK, BJ. Dopamine receptors and the cardiovascular system. *Postgrad Med J*. 1981;57 Suppl 1:45-54.
- CUNHA, MS; CRUZ, NVG, SCHNELLRATH, LC; MEDAGLIA, MLG; CASOTTO, ME; ALBANO, RM; COSTA, LJ; DAMASO, CR. Autochthonous Transmission of East/Central/South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2017 Oct;23(10):1737-1739. doi: 10.3201/eid2310.161855.
- CURTIS, I; SIMONS, K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(21):8052-6. doi: 10.1073/pnas.85.21.8052.
- DEMAREST, KT; MOORE, KE. Comparison of dopamine synthesis regulation in the terminals of nigrostriatal, mesolimbic, tuberoinfundibular and tuberohypophyseal neurons. *J. Neural Transmission* 46, 263–277 (1979). <https://doi.org/10.1007/BF01259333>
- DHANWANI, R.; KHAN, M.; BHASKAR, A.s.B.; SINGH, Rajpriya; PATRO, I.K.; RAO, P.V.L.; PARIDA, M.M.. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. *Virus Research*, [S.L.], v. 163, n. 2, p. 563-572, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.009>.
- DIAS, SSG; CUNHA-FERNANDES, T; SOUZA-MOREIRA, L; SOARES, VC; LIMA, GB; AZEVEDO-QUINTANILGA, IG; SANTOS, J; PEREIRA-DUTRA, F; FREITAS, C; REIS, PA; REHEN, SK; BOZZA, FA; SOUZA, TML; ALMEIDA, CJG; BOZZA, PT. Metabolic reprogramming and lipid droplets are involved in Zika virus replication in neural cells. *J Neuroinflammation*. 2023 Mar 8;20(1):61. doi: 10.1186/s12974-023-02736-7.
- ELLIOT, PG; ALPERT, JE; BANNON, MJ; IVERSEN, SD. Selective activation of mesolimbic and mesocortical dopamine metabolism in rat brain by infusion of a stable substance P analogue into the ventral tegmental area. *Brain Res*. 1986 Jan 15;363(1):145-7. doi: 10.1016/0006-8993(86)90667-0.
- EVANS, AB; WINKLER, CW; PETERSON, KE. Differences in Neuropathogenesis of Encephalitic California Serogroup Viruses. *Emerg Infect Dis*. 2019 Apr;25(4):728-738. doi: 10.3201/eid2504.181016. PMID: 30882310; PMCID: PMC6433036.
- FATA, CL; SAWICKI, DL. Alphavirus minus-strand RNA synthesis: identification of a role for Arg183 of the nsP4 polymerase. *J Virol*. 2002 Sep;76(17):8632-40. doi: 10.1128/jvi.76.17.8632-8640.2002.
- FIENBERG, AA; HIROI, N; MERMELSTEIN, PG; SONG, WJ; SNYDER, GL; NISHI, A; CHERAMY, A; O'CALLAGHAN, JP; MILLER, DB; COLE, DG. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science*, [S.L.], v. 281, n. 5378, p. 838-842, 7 ago. 1998. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.281.5378.838>.
- FIRTH, A; CHUNG, BY; FLEETON, MN; ATKINS, JF. Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virology Journal*, [S.L.], v. 5, n. 108, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422x-5-108>.
- FONSECA, VWP (2021). CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DO ISOLADO BRASILEIRO RJ-IB1 DO VÍRUS CHIKUNGUNYA. Tese de Doutorado.
- FRAKOLAKI, E; KALLIAMPAKOU, K; KAIMOU, P; MORAITI, M; KOLAITIS, N; BOLETI, H; KOSKINAS, J; VASSILACOPOULOU, D; VASSILAKI, N. Emerging Role of l-Dopa Decarboxylase in Flaviviridae Virus Infections. *Cells*, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 837, 5 ago. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells8080837>.
- FRITSCH, Hegger *et al*. Retrospective Genomic Surveillance of Chikungunya Transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil. *Microbiology Spectrum*, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 327-345, 26 out. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01285-22>.

FROS, Jelke J.; LIU, Wen Jun; PROW, Natalie A.; GEERTSEMA, Corinne; LIGTENBERG, Maarten; VANLANDINGHAM, Dana L.; SCHNETTLER, Esther; VLAK, Just M.; SUHRBIER, Andreas; KHROMYKH, Alexander A.. Chikungunya Virus Nonstructural Protein 2 Inhibits Type I/II Interferon-Stimulated JAK-STAT Signaling. *Journal Of Virology*, [S.L.], v. 84, n. 20, p. 10877-10887, 15 out. 2010. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00949-10>.

FRUTUOSO, Livia; FREITAS, André; CAVALCANTI, Luciano; DUARTE, Elisabeth. ESTIMATED MORTALITY RATE AND LEADING CAUSES OF DEATH AMONG INDIVIDUALS WITH CHIKUNGUNYA IN 2016 AND 2017 IN BRAZIL. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, [S.L.], 2020.

GOLDSTEIN M, WEISS Z. INHIBITION OF TYROSINE HYDROXYLASE BY 3-IODO-L-TYROSINE. *Life Sci* (1962). 1965 Jan;4:261-4. doi: 10.1016/0024-3205(65)90126-8.

GOMES, BR; SIQUEIRA-SOARES, TC; SANTOS, WD; MARCHIOSI, R; SOARES, AR, FERRARESE-FILHO, O. The effects of dopamine on antioxidant enzymes activities and reactive oxygen species levels in soybean roots. *Plant Signal Behav*. 2014;9(12):e977704. doi: 10.4161/15592324.2014.977704.

GRANDY, D K; A MARCHIONNI, M; MAKAM, H; STOFKO, R e; ALFANO, M; FROTHINGHAM, L; FISCHER, J B; BURKE-HOWIE, K J; BUNZOW, J R; SERVER, A C. Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 86, n. 24, p. 9762-9766, dez. 1989. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.24.9762>.

HARA, Kenta; YONEZAWA, Kazuyoshi; KOZLOWSKI, Mark T.; SUGIMOTO, Tadanori; ANDRABI, Khurshid; WENG, Qing-Ping; KASUGA, Masato; NISHIMOTO, Ikuo; AVRUCH, Joseph. Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR. *Journal Of Biological Chemistry*, [S.L.], v. 272, n. 42, p. 26457-26463, out. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.272.42.26457>.

HARMAN, D.. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal Of Gerontology*, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 298-300, 1 jul. 1956. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>.

HAARRINGTON, HR; ZIMMER, MH; CHAMNESS, LM; NASH, V; PENN, WD; MILLER, TF; MUKHOPADHYAY, S; SCHLEBACH, JP. Cotranslational folding stimulates programmed ribosomal frameshifting in the alphavirus structural polyprotein. *J Biol Chem*. 2020 May 15;295(20):6798-6808. doi: 10.1074/jbc.RA120.012706.

HARTMAN, BK; ZIDE, D; UDENFRIEND, S. The use of dopamine -hydroxylase as a marker for the central noradrenergic nervous system in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972 Sep;69(9):2722-6. doi: 10.1073/pnas.69.9.2722.

HAYNES, CM; TITUS, EA; COOPER, AA. Degradation of Misfolded Proteins Prevents ER-Derived Oxidative Stress and Cell Death. *Molecular Cell*, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 767-776, set. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.025>.

HEMMINGS, H; GREENGARD, P; TUNG, H; COHEN, P. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310, 503-505 (1984). <https://doi.org/10.1038/310503a0>

HOEKS, J; BRIEDÉ, JJ; VOGEL, J; SCHAART, G; NABBEN, M; MOONEN-KORNIPS; HESSELINK, Matthijs KC; SCHRAUWEN, Pa. Mitochondrial function, content and ROS production in rat skeletal muscle: effect of high :fat feeding. *Febs Letters*, [S.L.], v. 582, n. 4, p. 510-516, 28 jan. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.013>.

- HOFFMAN, PL; LUTHIN, GR; THEODOROPOULOS, D; CORDOPATIS, P; TABAKOFF, B. Ethanol effects on striatal dopamine receptor-coupled adenylate cyclase and on striatal opiate receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18 Suppl 1:355-9. doi: 10.1016/0091-3057(83)90199-5.
- HOONWERG, TE; VAN DUIJL-RICHTER, MKS; NUNES, ANV; ALBULESCU, IC; VAN HEMERT, MJ; SMIT, JM. Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. *J Virol.* 2016 Apr 14;90(9):4745-4756. doi: 10.1128/JVI.03184-15.
- HU, Xiaoyi; LI, Jing; FU, Maorong; ZHAO, Xia; WANG, Wei. The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 1-1, 26 nov. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00791-1>.
- INDRAYANTO, G; PUTRA, GS; SUHUD, F. Validation of *in-vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology.* v. 46, p. 273-307, 2021. doi: 10.1016/bs.podrm.2020.07.005
- JAQUET, M; BENGUE, M; LAMBERT, K; CARNAC, G; MISSÉ, D; BISBAL, C. Human muscle cells sensitivity to chikungunya virus infection relies on their glycolysis activity and differentiation stage. *Biochimie*, [S.L.], v. 218, p. 85-95, mar. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2023.09.005>.
- JENSEN, PK. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles I. pH dependency and hydrogen peroxide formation. *Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Enzymology And Biological Oxidation*, [S.L.], v. 122, n. 2, p. 157-166, ago. 1966. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0926-6593\(66\)90057-9](http://dx.doi.org/10.1016/0926-6593(66)90057-9).
- JONES, R; BRAGAGNOLO, G; ARRANZ, R. Capping pores of alphavirus nsP1 gate membranous viral replication factories. *Nature* 589, 615–619 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-3036-8>
- JOUBERT, PE; STAPLEFORD, K; GUIVEL-BENHASSINE, F; VIGNUZZI, M; SCHWARTS, O; ALBERT, ML. Inhibition of mTORC1 Enhances the Translation of Chikungunya Proteins via the Activation of the MnK/eIF4E Pathway. *PLoS Pathog.* 2015 Aug 28;11(8):e1005091. doi: 10.1371/journal.ppat.1005091.
- JOUBERT, P; WERNEKE, S; LACALLE, CD; GUIVEL-BENHASSINE, F; GIODINI, A; PEDUTO, L; LEVINE, B; SCHWARTZ, O; LENSCHOW, D; ALBERT, ML. Chikungunya-induced cell death is limited by ER and oxidative stress-induced autophagy. *Autophagy*, [S.L.], v. 8, n. 8, p. 1261-1263, 31 ago. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.20751>.
- KHAN, AH; MORITA, K; PARQUET, MDC; HASEBE, F; MATHENGE, EGM; IGARASHI, A. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal Of General Virology*, [S.L.], v. 83, n. 12, p. 3075-3084, 1 dez. 2002. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3075>.
- KIRUI, J; ABIDINE, Y; LENMAN, A; ISLAM, K; GWON, Y; LASSWITZ, L; EVANDER, M; BALLY, M; GEROLD, G. The Phosphatidylserine Receptor TIM-1 Enhances Authentic Chikungunya Virus Cell Entry. *Cells*, [S.L.], v. 10, n. 7, p. 1828, 20 jul. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071828>.
- KOVALEVUCH, J; LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol.* 2013;1078:9-21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2.
- KREJBICH-TROTOT, P; GAY, B; LI-PATYUEN, G, HOAREAU, JJ; JAFFAR-BANDJEE, MC; BRIANT, L; GASQUE, P; DENIZOT, M. (2011) Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Journal of Virology.* 8: 432. : doi: [10.1186/1743-422X-8-432](https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-432)

KUMAR, A; SHRINET, J; SUNIL, S. Chikungunya virus infection in *Aedes aegypti* is modulated by L-cysteine, taurine, hypotaurine and glutathione metabolism. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [S.L.], v. 17, n. 5, p. 1-18, 2 maio 2023. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0011280>.

LAW, YS; WANG, S; TAN, YB. SHIH, O; UTT, A; GOH, WY, LIAN, BJ; CHEN, MW; JENG, US; MERITS, A; LUO, D. Interdomain Flexibility of Chikungunya Virus nsP2 Helicase-Protease Differentially Influences Viral RNA Replication and Infectivity. *J Virol*. 2021 Feb 24;95(6):e01470-20. doi: 10.1128/JVI.01470-20.

LEGAULT, M; CONGAR, P; MICHEL, FJ; TRUDEAU, LE. Presynaptic action of neurotensin on cultured ventral tegmental area dopaminergic neurones. *Neuroscience*. 2002;111(1):177-87. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00614-5.

LI, J; NING, Y; HEDLEY, W; SAUNDERS, B; CHEN, Y; TINDILL, N; HANNAY, T; SUBRAMANIAM, S. The Molecule Pages database. *Nature* 420, 716–717 (2002). <https://doi.org/10.1038/nature01307>

LI, ML; STOLLAR, V. Distinct sites on the Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase for binding to the promoters for the synthesis of genomic and subgenomic RNA. *J Virol*. 2007 Apr;81(8):4371-3. doi: 10.1128/JVI.02672-06.

LI, R; SUN, K; TUPLIN, A; HARRIS, M. A structural and functional analysis of opal stop codon translational readthrough during Chikungunya virus replication. *Journal Of General Virology*, [S.L.], v. 104, n. 10, p. 1-12, 20 out. 2023. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jgv.0.001909>.

LIMANAQI, F; ZECCHINI, S; DINO, B; STRIZZI, S; CAPPELLETTI, G; UTYRO, O; VANETTI, C; GARZIANO, M; SAULLE, I; CLERICI, M. Dopamine Reduces SARS-CoV-2 Replication In Vitro through Downregulation of D2 Receptors and Upregulation of Type-I Interferons. *Cells*, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 1691, 19 maio 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11101691>.

LIU, N; BROWN, DT. Transient translocation of the cytoplasmic (endo) domain of a type I membrane glycoprotein into cellular membranes. *J Cell Biol*. 1993 Feb;120(4):877-83. doi: 10.1083/jcb.120.4.877.

LIU, X; GUO, Y; YANG, Y; QI, C; XIONG, T; CHEN, Y; WU, G; ZENG, C; WANG, D. DRD4 (Dopamine D4 Receptor) Mitigate Abdominal Aortic Aneurysm via Decreasing P38 MAPK (mitogen-activated protein kinase)/NOX4 (NADPH Oxidase 4) Axis-Associated Oxidative Stress. *Hypertension*, v. 78, n. 2, p. 294-307, ago. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/hypertensionaha.120.16738>.

LOBGS, M; ZHAO, HX; GAROFF, H. Function of Semliki Forest virus E3 peptide in virus assembly: replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. *J Virol*. 1990 Sep;64(9):4346-55. doi: 10.1128/JVI.64.9.4346-4355.1990.

LOPES, FM.; MOTTA, LL; BASTIANI, MA; PFAFFENSELLER, B; AGUIAR, BW; SOUZA, LF; ZANATTA, G; VARGAS, DM; SCHÖNHOFEN, P; LONDERO, GF. RA Differentiation Enhances Dopaminergic Features, Changes Redox Parameters, and Increases Dopamine Transporter Dependency in 6-Hydroxydopamine-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotoxicity Research*, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 545-559, 2 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-016-9699-0>.

LU, Q; YANG, Y, Villar, V; ASICO, L; JONES, JE; YU, P; LI, H; WEINMAN, EJ; EISNER, G,M; JOSE, PA.. D5 dopamine receptor decreases NADPH oxidase, reactive oxygen species and blood pressure via heme oxygenase-1. *Hypertens Res* 36, 684–690 (2013). <https://doi.org/10.1038/hr.2013.9>

LU, YE; KIELIAN, M. Semliki forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement. *J Virol*. 2000 Sep;74(17):7708-19. doi: 10.1128/jvi.74.17.7708-7719.2000.

LUMSDEN, WH. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Jan 1955. p. 37-57. doi: 10.1016/0035-9203(55)90081-x

MARTÍN, SSMC; LI, T; BOUQUET, J; STREITHORST, J; YU, G; PARANJPE, A; CHIU, CY. Differentiation enhances Zika virus infection of neuronal brain cells. *Sci Rep.* 2018 Sep 28;8(1):14543. doi: 10.1038/s41598-018-32400-7.

MAHARAJ, PD; WIWIN, SG; HUANG, J; WOOD, TG; THANGAMANI, S. Discovery of mosquito saliva microRNAs during CHIKV infection. *Plos Neglethead Tropical Disease.* v. 9, n. 1, jan. 2015. doi: 10.1371/journal.pntd.0003386.

MCALLISTER, N; LIU, Y; SILVA, LM; LENTSCHER, AG; CHAI, W; WU, N; GRISWOLD, KA; RAGHUNATHAN, K; VANG, L; ALEXANDER, J; WARFIELD, KL; DIAMOND, MS; FEIZI, T; SILVA, LA. Chikungunya Virus Strains from Each Genetic Clade Bind Sulfated Glycosaminoglycans as Attachment Factors. *Journal Of Virology*, [S.L.], v. 94, n. 24, 23 nov. 2020. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01500-20>.

HABIBI, M. Dopamine Receptors, *Encyclopedia of Movement Disorders*, Academic Press, 2010, Pages 326-329, ISBN 9780123741059, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374105-9.00236-7>.

McLENNAN, H; YORK, DH. The action of dopamine on neurones of the caudate nucleus. *J Physiol.* 1967 Apr;189(3):393-402. doi: 10.1113/jphysiol.1967.sp008175.

MCMILLAN, CR; SHARMA, R; OTTENHOF, T; NILES, LP. Modulation of tyrosine hydroxylase expression by melatonin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters*, [S.L.], v. 419, n. 3, p. 202-206, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2007.04.029>.

MEDINA-CINTRÓN, N; MARTÍNEZ, I; PÉREZ-RÍOS, N; BERRÍOS-LÓPEZ, Y; VILÁ, LM. Clinical Manifestations and Outcomes in Disease-Modifying Antirheumatic Drug-Naive Adult Patients with Chronic Chikungunya Arthritis. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, [S.L.], v. 104, n. 5, p. 1741-1746, 5 maio 2021. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.20-1573>.

MELTON, JV; EWART, GD; WEIR, RC; BOARD, PG; LEE, E; GAGE, PW. Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):46923-31. doi: 10.1074/jbc.M207847200.

MERRICK, WC. Initiation of protein biosynthesis in eukaryotes. *Biochemistry And Molecular Biology Education*, v. 31, n. 6, p. 378-385, nov. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bmb.2003.494031060274>.

METZ, SW; GARDNER, J; GEERTSEMA, C; LE, TT; GOH, L; VLAK, JM; SUHRBIER, A; PIJLMAN, GP. Effective chikungunya virus-like particle vaccine produced in insect cells. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(3):e2124. doi: 10.1371/journal.pntd.0002124.

MEURS, E; CHONG, K; GALABRU, J; THOMAS, NSB; KERR, IM; WILLIAMS, BRG; HOVANESSIAN, AG. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon, *Cell Volume 62, Issue 2, 1990, Pages 379-390, ISSN 0092-8674*, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90374-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90374-N).

MILLSAPPS, EM; UNDERWOOD, EC; BARR, KL. Development and Application of Treatment for Chikungunya Fever. *Research And Reports In Tropical Medicine*, [S.L.], v. 13, p. 55-66, dez. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.2147/rrtm.s370046>.

MIZUSHIMA, N; LEVINE, B; CUERVO, AM; KLIONSKY, DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008 Feb 28;451(7182):1069-75. doi: 10.1038/nature06639.

- MONTMAYEUR, JP; BORELLI, E. Transcription mediated by a cAMP-responsive promoter element is reduced upon activation of dopamine D2 receptors. *Pnas*, [S.L.], v. 88, n. 8, 15 abr. 1991.
- MOORE, DL; REDDY, S; AKINKUGBE, FM; LEE, VH; DAVID-WEST, TS; CAUSEY, OR; CAREY, DE. An epidemic of Chikungunya fever at Ibadan, Nigeria, 1969. *Annals Of Tropical Medicine & Parasitology*, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 59-68, mar. 1974. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00034983.1974.11686925>.
- MÜLLER, MBD; KASTURI, P; JAYARAD, GG; HARTL, U. Mechanisms of readthrough mitigation reveal principles of GCN1-mediated translational quality control. *Cell*, [S.L.], v. 186, n. 15, p. 3227-3244, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.035>.
- NISHIUMA, T; HARA, K; TSUJISHITA, Y; KANEKO, K; SHII, K; YONEZAWA, K. Characterization of the Phosphoproteins and Protein Kinase Activity in mTOR Immunoprecipitates. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, [S.L.], v. 252, n. 2, p. 440-444, nov. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.9671>.
- OU, JH; RICE, CM; DALGARNO, L; STRAUSS, EG; STRAUSS, JH. Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Sep;79(17):5235-9. doi: 10.1073/pnas.79.17.5235.
- PETERSEN, LR; POWERS, AM. Chikungunya: epidemiology [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research* 2016, 5(F1000 Faculty Rev):82.<https://doi.org/10.12688/f1000research.7171.1>
- PFEFFER, M; ZOLLER, G; ESSBAUER, S; TOMASE, H; BEHRENS-RIHA, N; LOSCHER, T; DOBLER, G. Clinical and virological characterization of imported cases of Chikungunya fever. *Wiener Klinische Wochenschrift*, [S.L.], v. 120, n. 4, p. 95-100, out. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00508-008-1035-0>.
- QADDUMI, WN; JOSE, PA. The Role of the Renal Dopaminergic System and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Biomedicines*, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 139, 1 fev. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9020139>.
- REN, SC; QAZI, SA; TOWELL, B; WANG, JC; MUKHOPADHYAY, S. Mutations at the Alphavirus E1'-E2 Interdimer Interface Have Host-Specific Phenotypes. *J Virol*. 2022 Mar 9;96(5):e0214921. doi: 10.1128/jvi.02149-21.
- SAWAI, H; DOMAE, N. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 5;411(3):569-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.06.186.
- SCHILTE, C; COUDERC, T; CHRETIEN, F; SOURISSEAU, M; GANGNEUX, N; GUIVEL-BEMHASSINE, F; KRAXNER, A; TSCHOPP, J; HIGGS, S; MICHAULT, A; ARENZANA-SEISDEDOS, F; COLONNA, M; PEDUTO, L; SCHWARTZ, O; LECUIT, M; ALBERT, ML. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):429-42. doi: 10.1084/jem.20090851.
- SERGON, K; NJUGUNA, C; KALANI, R; OFULA, V; ONYANGO, C; KNONGOI, LS; BEDNO, S; BURKE, H; DUMILLA, AM; KONDE, J; NJENGA, MK; SANG, R; BREIMAN, RF. Seroprevalence of Chikungunya Virus (CHIKV) Infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene*, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 333-337, 1 fev. 2008. American Society of Tropical Medicine and Hygiene. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.333>.
- SHIN, G; YOST, SA; MILLER, MT; ELROD, EJ; GRAKOU, A; MARCOTRIGIANO, . Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proceedings Of The National*

Academy Of Sciences, [S.L.], v. 109, n. 41, p. 16534-16539, 25 set. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1210418109>.

SHIRAKO, Y; STRAUSS, JH. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved p123 and nsp4 function in minus-strand rna synthesis, whereas cleaved products from p123 are required for efficient plus-strand rna synthesis. *Journal Of Virology*, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 1874-1885, mar. 1994. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.68.3.1874-1885.1994>.

SIKAND, K; SINGH, J; EBRON, JS; SKUKLA, GC. Housekeeping gene selection advisory: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -actin are targets of miR-644a. *PLoS One*. 2012;7(10):e47510. doi: 10.1371/journal.pone.0047510.

SINGH, I; HELENIUS, A. Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *Journal Of Virology*, [S.L.], v. 66, n. 12, p. 7049-7058, dez. 1992. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.66.12.7049-7058.1992>.

SILVA, LA; DERMORDI, TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *Journal Of Clinical Investigation*, [S.L.], v. 127, n. 3, p. 737-749, 1 mar. 2017. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci84417>.

SIMIZU, B; YAMAMOTO, K; HASHIMOTO, K; OGATA, T. Structural proteins of Chikungunya virus. *J Virol*. 1984 Jul;51(1):254-8. doi: 10.1128/JVI.51.1.254-258.1984.

SOURISSEAU, M; SCHILTE, C; CASARTELLI, N; TROUILLET, C; GUIVEL-BENHASSINE, F; RUDNICKA, D; SOL-FOULON, N; LE, RK; PREVOST, MC; FSIHI, H; FRENKIEL, MP; BLANCHET, F; AFONSO, PV; CECCALDI, PE; OZDEN, S; GESSAIN, A; SCHUFFENECKER, I; VERHASSELT, B; ZAMBORLINI, A; SAIB, A; REY, FA; ARENZANA-SEISDEDOS, F; DESPRÈS, P; MICHAULT, A; ALBERT, ML; SCHWARTS, O. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog*. 2007 Jun;3(6):e89. doi: 10.1371/journal.ppat.0030089.

SOUZA, WM; LIMA, ST; MELLO, LMS; CANDIDO, D; BUSS, L; WHITTAKER, C; CLARO, IM; CHANDRADEVA, N; GRANJA, F; JESUS, R. Spatiotemporal dynamics and recurrence of chikungunya virus in Brazil: an epidemiological study. *The Lancet Microbe*, [S.L.], v. 4, n. 5, p. 319-329, maio 2023. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2666-5247\(23\)00033-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2666-5247(23)00033-2).

SPUUL, P; BALISTRERI, G; HELLSTROM, K; GOLUBTSOV, AV; JOKITALO, E; AHOLA, T. Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells. *J Virol*. 2011 May;85(10):4739-51. doi: 10.1128/JVI.00085-11.

STAUDACHER, T; PECH, B; TAPPE, M; GROSS, G; MÜHLBAUER, B; LUIPPOLD, G. Arterial Blood Pressure and Renal Sodium Excretion in Dopamine D3 Receptor Knockout Mice. *Hypertension Research*, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 93-101, 2007. Japanese Society of Hypertension. <http://dx.doi.org/10.1291/hypres.30.93>.

TCHERKEZIAN, J; CARGNELLO, M; ROMEO, Y; HUTTLIN, EL; LAVOIE, G; GYGI, SP; ROUX, Philippe P.. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes & Development*, [S.L.], v. 28, n. 4, p. 357-371, 14 fev. 2014. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.231407.113>.

THOMAS, S., RAI, J., JOHN, L. *et al*. Functional dissection of the alphavirus capsid protease: sequence requirements for activity. *Virology* 7, 327 (2010). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-327>

TOMAR, S; HARDY, RW; SMITH, JL; KUHN, RJ. Catalytic core of alphavirus nonstructural protein nsP4 possesses terminal adenylyltransferase activity. *J Virol*. 2006 Oct;80(20):9962-9. doi: 10.1128/JVI.01067-06.

TOSCHI, A; LEE, E; THOMPSON, S; GADIR, N; YELLEN, P; DRAIN, CM; OHH, M; FOSTER, DA. Phospholipase D-mTOR requirement for the Warburg effect in human cancer cells. *Cancer Lett*. 2010 Dec 18;299(1):72-9. doi: 10.1016/j.canlet.2010.08.006.

TSETSARKIN, KA; VALANDINGHAM, DL; MCGEE, CE; HIGGS, S. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 3, n. 12, p. 1895-1906, 7 dez. 2007. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>.

UMEK, N; GERSAK, B; VINTAR, N; SOSTARIC, M; MAVRI, J. Dopamine Autoxidation Is Controlled by Acidic pH. *Front Mol Neurosci*. 2018 Dec 18;11:467. doi: 10.3389/fnmol.2018.00467.

UNNI, N; ARTEAGA, CL. Is Dual mTORC1 and mTORC2 Therapeutic Blockade Clinically Feasible in Cancer? *Jama Oncology*, [S.L.], v. 5, n. 11, p. 1564-1564, 1 nov. 2019. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.2525>.

VALJENT, E, PASCOLI, V, SVENNINGSSON, P; PAUL, S; ENSLEN, H; CORVOL, JC; STIPANOVICH, A; CABOCHE, J; LOMBROSO, PJ; NAIRN, AC; GREENGARD, P; HERVÉ, D; GIRAULT, JA. (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 491–496. doi: 10.1073/pnas.0408305102

WASSENBERG, T; MONNENS, LAH; GEURTZ, BPBH; WEVERS, RA; VERBEEK, MM; WILLEMSSEN, Michèl AAP. The Paradox of Hyperdopaminuria in Aromatic L-Amino Acid Deficiency Explained. *Jimd Reports*, [S.L.], p. 39-45, 2011. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/8904_2011_84.

WICHIT, S; DIOP, F; HAMEL, R; TALIGNANI, L; FERRARIS, P; CORNELIE, S; LIEGEOIS, F; THOMAS, F; YSSEL, H; MISSÉ, D. Aedes Aegypti saliva enhances chikungunya virus replication in human skin fibroblasts via inhibition of the type I interferon signaling pathway. *Infect Genet Evol*. 2017 Nov;55:68-70. doi: 10.1016/j.meegid.2017.08.032.

WIKAN, N; SAKOONWATANYOO, P; UBOL, S; YOKSAN, S; SMITH, DR. Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage. *PLoS One*. 2012;7(1):e31102. doi: 10.1371/journal.pone.0031102.

WHITE, LK; SALI, T; ALVARADO, D; GATTI, E; PIERRE, P; STREBLOW, D; DEFILIPPIS, VR. Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff. *J Virol*. 2011 Jan;85(1):606-20. doi: 10.1128/JVI.00767-10.

YACTAYO, S; STAPLES, JE; MILLOT, V; CIBRELUS, L; RAMON-PARDO, P. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *J Infect Dis*. 2016 Dec 15;214(suppl 5):S441-S445. doi: 10.1093/infdis/jiw390.

YANG, Z; ASICO, LD; YU, P; WANG, Z; JONES, JE; ESCANO, SC; WANG, X; QUINN, MT; SIBLEY, DR; ROMERO, GG; FELDER, RA; JOSE, PA. D5dopamine receptor regulation of reactive oxygen species production, NADPH oxidase, and blood pressure. *American Journal Of Physiology-Regulatory, Integrative And Comparative Physiology*, [S.L.], v. 290, n. 1, p. 96-104, jan. 2006. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00434.2005>.

ZHANG, R; KIM, AS; FOX, JM; NAIR, S; BASORE, K; KLIMSTRA, WB; RIMKUNAS, R; FONG, RH; LIN, H; PODDAR, S; CROWE, JE, DORANZ, BJ; FREMONT, DH; DIAMOND, MS. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*. 2018 May;557(7706):570-574. doi: 10.1038/s41586-018-0121-3.

ZHOU, J; PENG, C; LI, Q; YAN, X; YANG, L; LI, M; CAO, X; XIE, X; CHEN, D; RAO, C; HUANG, S; PENG, F; PAN, X. Dopamine Homeostasis Imbalance and Dopamine Receptors-Mediated AC/cAMP/PKA Pathway Activation are Involved in Aconitine-Induced Neurological Impairment in Zebrafish and SH-SY5Y Cells. *Front Pharmacol*. 2022 Mar 18;13:837810. doi: 10.3389/fphar.2022.837810.