

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES
PATOGENICOS**

Expressão de microRNAs em trofoblastos infectados “*in vitro*” por vírus Zika e Chikungunya, e estabelecimento de um modelo experimental da transmissão vertical de vírus Chikungunya na gestação e lactação

Juliano de Paula Souza

Ribeirão Preto, 2021

JULIANO DE PAULA SOUZA

Expressão de microRNAs em trofoblastos infectados “*in vitro*” por vírus Zika e Chikungunya, e estabelecimento de um modelo experimental da transmissão vertical de vírus Chikungunya na gestação e lactação

Tese de Doutorado

apresentada ao Departamento de Biologia Celular,
Molecular e Bioagentes Patogênicos da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
Universidade de São Paulo.

Grau pretendido: Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

SOUZA, JULIANO DE PAULA.

Expressão de microRNAs em trofoblastos infectados “*in vitro*” por vírus Zika e Chikungunya, e estabelecimento de um modelo experimental da transmissão vertical de vírus Chikungunya na gestação e lactação

Ribeirão Preto, 2021.

101 pg.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Arruda, Eurico de.

1. Zika; 2. Chikungunya; 3. Trofoblasto; 4. microRNAs; 5. Leite materno; 6. Transmissão vertical

Folha de aprovação da banca examinadora

SOUZA, J. P. Expressão de microRNAs em trofoblastos infectados “*in vitro*” por vírus Zika e Chikungunya, e estabelecimento de um modelo experimental da transmissão vertical de vírus Chikungunya na gestação e lactação. Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de doutor em Biologia Celular e Molecular.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP através dos projetos Temático 2014/02438-6 e Regular de Doutorado 2016/06490-8.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC-FMRP-USP).

**Dedico este trabalho a minha família:
mãe, pai, irmãs, irmãos, sobrinha e sobrinhos**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família pelo apoio que sempre recebi em todos os sentidos, inclusive para me dedicar aos estudos e à pesquisa. Agradeço principalmente ao meu pai, Vicente, e à minha mãe, Zélia, pelo apoio e amor incondicional recebido desde sempre e pelos ensinamentos que me fizeram ser quem eu sou hoje. Agradeço aos meus irmãos José, Marli, Marcelo, Renata e Patrícia, e aos meus sobrinhos Rita, Bruno e Gabriel.

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Eurico pela oportunidade de desenvolver o meu projeto de doutorado no seu laboratório e pela orientação durante todos esses cinco anos.

Agradeço à toda equipe do laboratório de patogênese viral, especialmente à funcionária Maria Lúcia (Pitty) por todo o apoio desde que cheguei aqui, à aluna de doutorado Rosa Maria, e a ex-aluna Dra. Bruna Laís, que dividiram laboratório e apartamento comigo durante anos e se firmaram como amigas de verdade para mim. Aos outros membros do laboratório e amigos Drs. Ronaldo, Daniel, Rogério e Dras. Josane e Veridiana, aos pós-graduandos Suellen, Thaís, Stella, Brenda, Matheus e Fabiano. Aos alunos de iniciação científica Leonardo, Gabriela, Heitor, Antônio, Maria Vitória, Noilson e especialmente ao Mateus que se tornou um grande amigo desde que iniciamos nossa colaboração.

Aos meus amigos da IV turma do curso de bacharelado em Bioquímica da UFSJ e do intercâmbio de 2014.

Agradeço aos professores colaboradores do projeto que desenvolvi durante o doutorado: Dr. Geraldo Duarte, Dr. Wilson Araújo e Dr. José Carlos Farias e aos membros dos seus laboratórios que colaboraram.

À toda equipe do Centro de Pesquisa em Virologia e às demais pessoas que participaram dessa jornada comigo.

RESUMO

Expressão de microRNAs em trofoblastos infectados “*in vitro*” por vírus Zika e Chikungunya, e estabelecimento de um modelo experimental da transmissão vertical de vírus Chikungunya na gestação e lactação

No presente estudo investigamos dois aspectos pouco estudados dos mecanismos de transmissão vertical de vírus Zika (ZIKV) e Chikungunya (CHIKV) durante gestação e lactação. O ZIKV é conhecidamente teratogênico e capaz de infectar diversas células na placenta humana, inclusive trofoblastos, células intrinsecamente resistentes a infecções virais por vários mecanismos, que incluem a expressão de microRNAs (miRNAs) regulatórios de respostas antivirais. A susceptibilidade dessas células a ZIKV e CHIKV e o impacto das infecções na expressão de miRNAs da célula hospedeira foi estudado por sequenciamento de nova geração (NGS). O repertório de miRNAs em células infectadas permitiu fazer a predição computacional de vias negativamente e positivamente reguladas pelas infecções virais. Identificamos o fator de regulação de CREB3 (CREBRF) como alvo em potencial de diversos miRNAs positivamente regulados, o que tem impacto na indução de autofagia. A validação experimental foi feita pelo silenciamento com RNAs de interferência (RNAi) para silenciar CREBRF, resultando em impacto significativamente distintos nas infecções por ZIKV e CHIKV: a replicação de ZIKV aumentou, enquanto a de CHIKV sofreu redução, indicando que a regulação desses miRNAs pode ter efeito pró ou antiviral, dependendo de mecanismos de interação vírus-célula distintos entre os dois.

Há diversos relatos de transmissão vertical de CHIKV, mas pouco se sabe sobre rotas e mecanismos de transmissão. No presente estudo foi desenvolvido um modelo experimental de infecção por CHIKV, usando camundongos fêmeas da linhagem BALB/c infectadas durante a gestação e lactação, o que possibilitou a confirmação da transmissão transplacentária em 8,4% dos fetos analisados, com indução de efeitos teratogênicos graves. Tendo em vista que a maior parte dos animais nascidos e amamentados por fêmeas infectadas por CHIKV sobrevivem, foi avaliado o perfil de resposta imune desses animais ao longo da vida adulta contra esse vírus. Os resultados mostraram que os camundongos amamentados em fêmeas infectadas têm resposta imune humoral e celular ativas contra o vírus na idade adulta. Mais importante, esses animais são mais resistentes à infecção experimental por CHIKV 90 dias após o nascimento,

indicando que a resposta imune induzida pela amamentação é efetiva e de longa duração. Observamos que as glândulas mamárias das fêmeas infectadas são sítios de replicação para CHIKV, e que há a transmissão de antígenos virais para os neonatos via leite. Esses resultados são inéditos, e criam as bases para futuras investigações sobre mecanismos biológicos básicos da transmissão vertical de ZIKV e CHIKV, bem como para abordagens translacionais em gestantes e neonatos infectados por esses agentes.

Palavras-chave: Zika, Chikungunya, trofoblasto, microRNAs, Leite Materno, Transmissão vertical

ABSTRACT

Expression of microRNAs in trophoblasts infected “*in vitro*” by Zika and Chikungunya viruses and experimental model of vertical transmission of Chikungunya virus in pregnancy and breastfeeding

In the present study, we investigated two unexplored aspects of the Zika virus (ZIKV) and Chikungunya virus (CHIKV) vertical transmission mechanisms during pregnancy and lactation. ZIKV is known to be teratogenic and able to infect several cells in the human placenta, including trophoblasts, which are cells intrinsically resistant to viruses by several mechanisms. The expression of microRNAs (miRNAs) that regulate antiviral responses is very important to sustain this resistance. The susceptibility of these cells to ZIKV and CHIKV and the impact of changes in the expression of host miRNAs was studied by new generation sequencing (NGS) in this work. Using the repertoire of miRNAs in infected cells, we carried out computational prediction of negatively and positively regulated pathways during viral infections. We identified the CREB3 regulatory factor (CREBRF) as a potential target of several up-regulated miRNAs, what has an impact on autophagy induction. The experimental validation was performed by silencing CREBRF with interference RNAs (RNAi). Interestingly, we identified distinct impacts of CREBRF silencing on ZIKV and CHIKV infections: the replication of ZIKV increased, while CHIKV suffered a significant reduction in its genome replication. These results indicate that these miRNAs can regulate pro or antiviral pathways, based on the distinct virus-cell interactions between them.

There are several reports of vertical transmission of CHIKV, but little is known about routes and mechanisms of transmission. In the present study, an experimental model of CHIKV infection was developed, using female mice of the BALB/c strain infected during pregnancy and lactation, which enabled the confirmation of transplacental transmission in 8.4% of the analyzed fetuses, with induction of teratogenic effects. Taking advantage that most animals born and breastfed by CHIKV infected females survive, the profile of immune response of these animals throughout adulthood against this virus was evaluated. The results showed that mice breastfed in infected females develop active humoral and cellular immune responses against the virus in adulthood. More importantly, these animals are more resistant to experimental CHIKV infection 90 days after birth, indicating that the response induced by breastfeeding is effective and long lasting. We observed that the mice mammary glands are

sites of replication for CHIKV, and the transmission of viral antigens to neonates via milk occurs. These results will be very important for future investigations about the basic biological mechanisms of vertical transmission of ZIKV and CHIKV, as well as for translational approaches in pregnant women and newborns infected by these agents.

Keywords: Zika, Chikungunya, trophoblast, microRNAs, Breast milk, Vertical transmission

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise de RNA total em espectrofotômetro: concentração e razão de absorvância 260nm/280nm.....	46
Tabela 2. Lista de miRNAs com expressão alterada durante a infecção por ZIKV.....	48
Tabela 3 Lista de miRNAs com expressão alterada durante a infecção por CHIKV.....	49

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cultura primária de trofoblastos humanos.....	41
Figura 2. Análise por citometria de fluxo de citotrofoblastos purificados.....	41
Figura 3. Infecção de células trofoblásticas humanas por ZIKV e CHIKV.....	42
Figura 4. Avaliação da pureza e quantificação de microvesículas.....	43
Figura 5. Atividade antiviral de microvesículas de trofoblastos humanos contra ZIKV e CHIKV.....	44
Figura 6. Suscetibilidade das células JEG-3 a infecção por ZIKV e CHIKV.....	45
Figura 7. Análise da pureza e integridade do RNA total por eletroforese convencional e automatizada.....	47
Figura 8. Perfil de miRNAs em células JEG-3 infectadas por ZIKV e CHIK.....	55
Figura 9. Vias alteradas durante a infecção por ZIKV.....	56
Figura 10. Vias alteradas durante a infecção por CHIKV.....	57
Figura 11. Quantificação de mRNA de CREBRF em células JEG-3 infectadas por ZIKV e CHIKV.....	58
Figura 12. Impacto do silenciamento de CREBRF na infecção de ZIKV e CHIKV.....	59

CAPÍTULO 2

Figura 1. Transmissão vertical de CHIKV pela via transplacentária.....	76
Figura 2. Infecção “ <i>in vitro</i> ” de células de placenta de camundongo por CHIKV.....	77
Figura 3. Detecção de proteínas virais de CHIKV em leite de camundongos.....	78
Figura 4. Detecção molecular de CHIKV em glândulas mamárias de camundongo.....	79
Figura 5. Evidência de replicação de CHIKV em glândulas mamárias de camundongo.....	79
Figura 6. Desenho experimental: avaliação da imunidade contra CHIKV em camundongos nascidos e/ou amamentados em fêmeas infectadas.....	80
Figura 7. Ensaio de neutralização de CHIKV em células Vero.....	81
Figura 8. Identificação de IgG contra CHIKV em soro de animais amamentados em fêmeas infectadas.....	82
Figura 9. Ensaio de proliferação de células TCD4 e TCD8.....	83
Figura 10. Infecção experimental de camundongos na idade adulta.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg - micrograma

μm – micrômetro

\leq - menor ou igual a

\geq - maior ou igual a

$^{\circ}\text{C}$ - graus Celsius

ALIX - Proteína 6 de interação com morte celular programada

cDNA - DNA complementar

CHIKV - vírus Chikungunya

CREBRF - Fator de Regulação de CREB3

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Ácido dextrorribonucleico

E1/E2 - Proteínas do envelope 1 e 2

EDTA - Ácido etilenodiamino treta-acético

EEA-1 - Antígeno de endossomo inicial 1

g – gramas

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Kb - kilobases

kDa – kilodalton

LC3-II - Proteína associada a microtúbulos 1A/1B de cadeia leve 3B

miRNA - microRNAs

mg - miligrama

mL - mililitro

mM - milimolar

MOI - Multiplicidade de infecção

mRNA - RNA mensageiro

nm - nanômetro

nsP1 - Proteína não estrutural 1

NTA - Nanotracking Particle Analysis

ORF - Quadro de Leitura Aberto

qPCR - Reação em cadeia quantitativa da polimerase

RIN - Número de Integridade do RNA

RNA - Ácido ribonucleico

RPMI – Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium

RT - Transcrição Reversa

SFB - Soro Fetal Bovino

TBE - tampão tris borato EDTA

UTR - Região não traduzida

ZIKV - vírus Zika

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Vírus Zika.....	20
1.1.1. Histórico de ZIKV e aspectos clínicos.....	20
1.1.2. Classificação e estrutura de ZIKV.....	21
1.1.3. ZIKV e sua associação com síndrome congênita.....	21
1.2. Vírus Chikungunya.....	23
1.2.1. Histórico de CHIKV e aspectos clínicos.....	23
1.2.2. Classificação e estrutura de CHIKV.....	24
1.2.3. Transmissão vertical de CHIKV.....	24
1.3. Atividade antiviral de miRNAs de células trofoblásticas.....	26
1.4. Excreção de vírus em leite materno.....	27
Capítulo 1: Expressão de microRNAs em trofoblastos infectados “<i>in vitro</i>” por vírus Zika e Chikungunya.....	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Objetivo Geral.....	31
2.2. Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. Preparação e titulação dos estoques virais.....	33
3.2. Isolamento e cultivo de células trofoblásticas humanas.....	33
3.3. Citometria de Fluxo.....	34
3.4. Infecções virais “ <i>in vitro</i> ” de células trofoblásticas.....	34
3.5. Imunofluorescências.....	35
3.6. Isolamento de vesículas extracelulares de trofoblastos humanos.....	35
3.7. <i>Western Blot</i>	35
3.8. Nanotracking Particles Analysis (NTA).....	36
3.9. Atividade biológica de microvesículas.....	36
3.10. Extração, quantificação e análise da integridade de RNA.....	37
3.11. Sequenciamento de miRNAs e análises computacionais.....	37

3.12. Predição computacional de alvos de miRNAs.....	38
3.13. Silenciamento de CREBRF.....	38
3.14. Quantificação de genoma viral e mRNA de CREBRF.....	38
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Células trofoblásticas de placenta humana são suscetíveis à infecção “ <i>in vitro</i> ” por ZIKV e CHIKV.....	41
4.2. Microvesículas de citotrofoblastos exercem atividade antiviral contra CHIKV....	43
4.3. A infecção de células JEG-3 por ZIKV e CHIKV altera o perfil de expressão de miRNAs da célula hospedeira.....	44
4.4. As alterações na abundância dos miRNAs podem alterar vias importantes.....	56
4.5. O repertório de miRNAs de células JEG-3 inclui possíveis sequências codificadas pelo genoma viral.....	57
4.6. O silenciamento de CREBRF interfere na replicação de ZIKV e CHIKV de formas distintas.....	58
5. DISCUSSÃO.....	61
Capítulo 2: Estabelecimento de um modelo experimental da transmissão vertical de vírus Chikungunya na gestação e lactação.....	64
1. INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO.....	65
2. OBJETIVOS.....	67
2.1- Objetivo Geral.....	67
2.2- Objetivos específicos.....	67
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
3.1- Vírus, células e infecções.....	69
3.2- Modelos animais e infecções.....	69
3.3- Extração de RNA, transcrição reversa e PCR.....	70
3.4- Western Blot.....	70

3.5- Imunofluorescências.....	71
3.6- Teste de neutralização por redução de placa (PRNT).....	71
3.7- Ensaio de proliferação celular.....	72
3.8- Isolamento viral.....	72
3.9- Análises estatísticas.....	72
4. RESULTADOS.....	75
4.1- CHIKV pode ser transmitido verticalmente pela via transplacentária em modelo murino e causar efeitos teratogênicos.....	75
4.2- Genoma e proteínas de CHIKV podem ser detectados no leite de fêmeas BALB/c infectadas durante a gestação ou amamentação.....	77
4.3- O tecido mamário é um sítio de replicação de CHIKV.....	78
4.4- A amamentação em fêmeas BALB/c infectadas induz a formação de uma resposta imune contra CHIKV nos neonatos.....	80
4.5- Camundongos nascidos e/ou amamentados em fêmeas infectadas por CHIKV são menos susceptíveis à infecção por CHIK.....	83
5. DISCUSSÃO.....	86
CONCLUSÕES.....	89
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXOS.....	97
Anexo 1: Autorização do comitê de ética em pesquisas com amostras humanas.....	98
Anexo 2: Autorização do comitê de ética em experimentação animal.....	101

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Mulheres grávidas constituem um importante grupo de risco durante epidemias por diversos agentes infecciosos e merecem especial atenção não apenas pelo impacto das infecções na saúde das mulheres adultas, mas também pela possibilidade de ocorrência de transmissão vertical. A transmissão vertical transplacentária pode afetar a saúde e o desenvolvimento do feto de diversas formas, podendo causar danos como anomalias dos sistemas nervoso e cardiovascular, aparentes ou subclínicas, e estas últimas somente serão diagnosticadas tardiamente. Embora muitos avanços tenham ocorrido recentemente no campo da imunologia da gestação, muito ainda se precisa estudar para elucidar os mecanismos celulares e moleculares da transmissão vertical e teratogênese viral, para facilitar o desenvolvimento de intervenções preventivas e terapêuticas eficientes.

Nesse sentido, os arbovírus, que são agentes de grande impacto em saúde pública especialmente no ambiente tropical, merecem cuidadosa atenção, especialmente diante da epidemia de síndrome congênita por vírus Zika (ZIKV) ocorrida no Brasil entre os anos de 2014 e 2016. Além de ZIKV, outros arbovírus endêmicos no Brasil, como Chikungunya (CHIKV), merecem avaliação de sua transmissão vertical e dos seus efeitos teratogênicos, e é disso que trata o presente projeto.

1.1- Vírus Zika

1.1.1- Histórico de ZIKV e aspectos clínicos

Os mosquitos do gênero *Aedes* vêm ganhando cada vez mais importância como vetores de doenças virais em regiões de clima tropical e subtropical do mundo. Recentemente, um dos arbovírus emergentes de grande destaque e que pode ser transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* é o ZIKV. O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda a partir de amostras de sangue de um macaco Rhesus (DICK *et al.*, 1952). Em 1948 o vírus foi novamente isolado a partir de mosquitos *Aedes africanus* coletados na mesma floresta do primeiro macaco infectado. Apenas 14 casos de infecção por ZIKV em humanos foram notificados antes de abril de 2007, ano em que ocorreu uma epidemia na ilha de Yap, na Micronesia (DUFFY *et al.*, 2009). Até 2014, antes da epidemia que atingiu o Brasil, a doença causada pelo ZIKV era basicamente associada com sintomas como febre, dores musculares, dores de cabeça, dores nos olhos, indisposição e *rash* cutâneo. Não há evidências de que ZIKV esteja associado com casos de hemorragia e era considerado causar apenas infecção de moderada gravidade com sintomas

semelhantes aos da dengue. Além disso, muitos casos de humanos infectados por ZIKV são assintomáticos, sendo o sistema imune capaz de eliminar o patógeno sem nenhuma evidência clínica perceptível (FAUCI & MORENS, 2016). No entanto, a partir da introdução deste vírus no Brasil, surgiram evidências de que a infecção por ZIKV durante a gravidez pode causar microcefalia e afetar o desenvolvimento neurológico dos fetos, além de uma série de outros efeitos teratogênicos denominados em conjunto como síndrome congênita do vírus Zika (CZS) (MARTINS *et al.*, 2020; MLAKAR *et al.*, 2016).

Frente a grande importância que o ZIKV ganhou durante a epidemia no Brasil e com a associação com síndromes congênitas, a comunidade científica se viu estimulada a estudar esse vírus em diversos aspectos e identificou novas vias de transmissão de ZIKV que não a transmissão por mosquitos e a transplacentária. Existem estudos que comprovaram a transmissão vertical perinatal (BESNARD *et al.*, 2014; SORIANO-ARANDES *et al.*, 2018), além da transmissão sexual (GREGORY *et al.* 2017), por transfusão de derivados de sangue e a transmissão pós-natal por meio do leite materno. Com relação à esta última, os recém-nascidos infectados durante a amamentação são em sua maioria assintomáticos ou apresentam sinais de doença leves, sem complicações. Portanto, de acordo com as recomendações feitas pela Organização Mundial da Saúde em 2016, os estudos reforçam que não há evidências que suportam a necessidade de interrupção da amamentação durante a infecção de uma lactente.

1.1.2- Classificação e estrutura de ZIKV

Este vírus, da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* (KUNO *et al.*, 1998), é envelopado, tem formato icosaédrico e genoma de aproximadamente 11 Kb, constituído de uma fita simples de RNA de polaridade positiva, que codifica as três proteínas estruturais (capsídeo, envelope e membrana) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) (CHAMBERS *et al.*, 1990; KUNO *et al.*, 2007).

1.1.3- ZIKV e sua associação com síndrome congênita

O Brasil é o país mais afetado por ZIKV, com número estimado de 440.000 a 1,3 milhão de casos até dezembro de 2015. Em 2015, o número de casos de microcefalia notificados no Brasil foi 20 vezes maior do que nos anos anteriores, totalizando aproximadamente 4.783 casos até o início de janeiro de 2016 (STOCKHOLM: EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE

PREVENTION AND CONTROL, 2015). Logo, os dados epidemiológicos sugeriram fortemente uma associação entre a infecção de gestantes por ZIKV e a microcefalia.

Desde que foi feita a associação entre a infecção por ZIKV e a ocorrência de síndrome congênita, diversos grupos de pesquisas enriqueceram a literatura com resultados relevantes. Um dos primeiros estudos que relacionou ZIKV com microcefalia foi conduzido com amostras de um feto microcefálico abortado, cuja mãe havia sido infectada com ZIKV no final do primeiro trimestre de gravidez. Resultados de ultrasonografia mostraram calcificações no cérebro do feto e na placenta, onde também foi detectado o vírus por RT-PCR. Neste mesmo estudo, experimentos de microscopia eletrônica mostraram que o tecido cerebral estava danificado e apresentava células lisadas. Também foi possível visualizar partículas virais de aproximadamente 50 nm, confirmando a presença do vírus neste tecido (MLAKAR *et al.*, 2016). Outros estudos mostraram que células progenitoras neuronais corticais são as mais permissivas à infecção por ZIKV, com formação de progênie viral infecciosa, porém o vírus pode também infectar astrócitos e neurônios em todos os estágios do desenvolvimento (TANG *et al.*, 2016; van den Pol *et al.*, 2017). Nessa população de células indiferenciadas, ZIKV induziu apoptose em cerca de 30% das mesmas, como evidenciado pelos altos níveis de caspase-3 ativada. Além disso, estudos de transcriptoma dessas células mostraram redução de quantidades de mRNAs de genes que controlam o ciclo celular, e aumento de mRNAs de genes que codificam componentes envolvidos na transcrição, transporte de proteínas e processos catabólicos (TANG *et al.*, 2016).

A transmissão vertical transplacentária de ZIKV tem sido associada com a indução de danos vasculares e apoptose no tecido placentário, que por sua vez rompem a barreira mais externa composta por sinciotrofoblastos e possibilitam o contato do vírus com outros tipos celulares do tecido placentário. Em um estudo realizado por Tabata e colaboradores (2016), os pesquisadores mostraram que o ZIKV infecta as seguintes células em explantes de placenta cultivados e infectados “*ex vivo*” e “*in vitro*”: citotrofoblastos, tanto no vilos placentário quanto extravilosos, células de Hofbauer, fibroblastos placentários, células endoteliais da veia umbilical, células progenitoras de trofoblastos e células epiteliais amnióticas.

O cruzamento da barreira placentária pelo ZIKV e os mecanismos pelos quais este atinge o feto também têm sido focos de grande atividade em pesquisa. Em experimentos realizados por Cugola *et al.* (2016), um modelo animal consistindo de fêmeas de camundongo grávidas infectadas foi utilizado para avaliar os efeitos da infecção por ZIKV nos fetos. As

observações demonstraram que o vírus causa restrição considerável de crescimento e sinais de microcefalia nos fetos. Este mesmo estudo mostrou que a infecção por ZIKV induziu apoptose e autofagia em células do tecido nervoso dos camundongos afetados.

Atualmente já se sabe que os efeitos teratogênicos resultantes da infecção intra-útero por ZIKV podem incluir também uma série de patologias silenciosas que impõem desafios para um diagnóstico preciso. Em modelo animal, pesquisadores já descreveram alterações neurodegenerativas e comportamentais em camundongos adultos que sobreviveram a uma infecção por ZIKV logo após o nascimento (IRELAND *et al.*, 2020). Em outro modelo animal de macaco *Rhesus*, a infecção pós-natal de recém-nascidos resultou em comprometimento severo de funções relacionadas ao comportamento e atividade motora e cognitiva (RAPER *et al.*, 2020). Em humanos, o acompanhamento de crianças que foram infectados verticalmente (intra-útero, perinatal ou pós-natal) têm sido feito e há relatos de acometimento tardio do sistema nervoso central, incluindo calcificações em diferentes regiões do cérebro, ocorrência de convulsões e deficiências motoras e oculares (SOUZA *et al.*, 2019).

1.2- Vírus Chikungunya

1.2.1- Histórico de CHIKV e aspectos clínicos

O CHIKV foi isolado pela primeira vez a partir de soro humano durante um surto de doença febril que ocorreu na Tanzânia em 1953 (ROSS, 1956). Desde então ocorreram diversas epidemias causadas por CHIKV em países da África do Sul e Central e no Sudeste Asiático, as quais foram frequentemente erroneamente relatadas como surtos de dengue (CAREY, 1971; POWERS, 2007). Em 2005 as infecções por CHIKV deixaram de ser restritas aos continentes Asiático e Africano, com a ocorrência de uma epidemia nas Ilhas Comoros, no Sudoeste do Oceano Índico (WEAVER, 2014). Em janeiro de 2014, os primeiros casos foram notificados na América Central e o primeiro caso de transmissão autóctone no Brasil foi reportado em setembro do mesmo ano (Ministério da Saúde, 2015).

CHIKV causa a doença conhecida como febre chikungunya, a qual é caracterizada por febre, cefaléia, mialgia, exantema e artralgias. Este último sintoma é bastante característico da doença, sendo um dos principais fatores utilizados no diagnóstico clínico para diferenciar a febre chikungunya de outras doenças febris agudas, como dengue e zika, por exemplo. Em alguns casos a artralgia pode persistir por meses ou até mesmo anos, afetando consideravelmente a qualidade de vida do paciente (DAS *et al.*, 2009; TESH, 1982).

Os dados epidemiológicos da febre chikungunya no Brasil reforçam a necessidade de se estudar a patogênese do vírus. Em 2015 foram registrados 38.332 casos prováveis em 696 municípios, e destes, 13.236 foram confirmados. Em 2016, foram registrados 236.287 casos prováveis distribuídos em 2.297 municípios, dos quais 116.523 foram confirmados. Entre todos esses casos 120 óbitos foram confirmados como consequência da infecção por CHIKV (Ministério da Saúde, 2016). Em 2019 foram registrados 132.205 casos prováveis de infecção pelo vírus, sendo as regiões Sudeste e Nordeste responsáveis pelas maiores taxas de incidência. Nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Norte, o número de casos prováveis corresponde a 75,6% do total do país (Ministério da Saúde, 2019). Em 2020, até a semana epidemiológica 32, foram registrados 63.928 casos prováveis e as regiões Sudeste e Nordeste continuam apresentando as maiores taxas de incidência. Em 2019 e 2020 foram confirmados respectivamente 92 e 12 óbitos por CHIKV e alguns óbitos continuam em investigação (Ministério da Saúde, 2020).

1.2.2- Classificação e estrutura de CHIKV

O CHIKV pertence à família *Togaviridae* e ao gênero *Alphavirus*. É um vírus envelopado e de formato esférico, sendo também transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. O genoma do CHIKV é constituído de uma fita simples de RNA de polaridade positiva com aproximadamente 12 Kb. Uma grande ORF na porção 5' compreende 2/3 do genoma e codifica uma poliproteína denominada P1234, a qual é posteriormente processada e clivada nas proteínas não estruturais nsP1, 2, 3 e 4. A segunda ORF é separada da primeira por 65 nucleotídeos e também codifica uma poliproteína que é processada e clivada para originar as proteínas estruturais do vírus (C, E2, E3, 6k e E1) (LI *et al.*, 2012; RAUSALU *et al.*, 2016).

1.2.3- Transmissão vertical de CHIKV

O primeiro caso de transmissão vertical de CHIKV foi documentado durante uma grave epidemia ocorrida em La Réunion Island, França, nos anos de 2005-2006 (ECONOMOPOULOU *et al.*, 2009). Um estudo realizado com 160 gestantes nessa região endêmica demonstrou que três abortos espontâneos ocorridos em mulheres com menos de 22 semanas de gestação puderam ser atribuídos à infecção por CHIKV. Além disso, os pesquisadores demonstraram viremia de CHIKV em 33 dos neonatos, dos quais 16 apresentaram sintomas da febre chikungunya (LENGLET *et al.*, 2006). Essa pesquisa apontou

que a transmissão vertical nos dois primeiros trimestres de gestação é rara e não chegou a conclusões sobre mecanismos celulares e moleculares da transmissão intra-útero.

Depois desse primeiro estudo, a transmissão vertical de CHIKV em humanos vem sendo documentada em outras regiões endêmicas, incluindo o Brasil. De acordo com dados publicados, a taxa de transmissão gira em torno de 50% entre as gestantes infectadas e resulta em aproximadamente 12% de neonatos sintomáticos (EVANS-GILBERT, 2020). Dos neonatos que apresentam sintomas, muitos evoluem para formas graves da doença, podendo incluir anomalias no sistema nervoso central, hemorragias e manifestações cardíacas (RAMFUL *et al.*, 2007; GÉRARDIN *et al.*, 2008; SENANAYAKE *et al.*, 2009; SHRIVASTAVA *et al.*, 2011). Além dos sintomas agudos, a infecção por CHIKV pode causar atrasos a longo prazo no neurodesenvolvimento dos recém-nascidos infectados (CONTOPOULOS-IOANNIDES *et al.*, 2018).

Um estudo realizado com 38 recém-nascidos de mães com infecção por CHIKV revelou que todos apresentaram sintomas e sinais como febre, dores, rash cutâneo, edemas periféricos, trombocitopenia, linfopenia, alterações relacionadas à protrombina e aspartato aminotransferase, a partir do terceiro dia de vida. Algumas complicações como convulsões, síndromes hemorrágicas e desordens hemodinâmicas também foram observadas. O vírus foi detectado por PCR no fluido cefalorraquidiano de 22 de 24 recém-nascidos analisados, nos quais foram encontradas também anormalidades no cérebro por imagem de ressonância magnética, com lesões na massa branca e hemorragia intraparenquimal. Por fim, análises ecocardiográficas mostraram a ocorrência de hipertrofia do miocárdio, disfunção ventricular, pericardite e dilatação de artérias coronárias. Um dos recém-nascidos faleceu por enterocolite necrosante (RAMFUL *et al.*, 2007).

Além desses dados, diversas observações relacionando infecção por CHIKV com danos neurológicos, doença em neonatos e óbitos, foram feitas durante as epidemias que ocorreram entre 2004 e 2006 (AZEVEDO *et al.*, 2015). Diante do exposto, o estudo dos efeitos de CHIKV em células de placenta humana é de grande importância para o conhecimento sobre a infecção em grávidas e nos fetos, bem como o desenvolvimento de um modelo animal que possibilite estudos mais aprofundados da patogênese da transmissão vertical.

A habilidade de CHIKV de atravessar a placenta pode estar associada com a cepa do vírus ou com características genéticas do indivíduo, mas isso ainda não foi investigado. Sendo assim, a literatura científica tem apenas relatos clínicos de transmissão vertical de CHIKV e

carece de estudos relacionados à investigação das rotas de transmissão vertical, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo e os fatores que influenciam na susceptibilidade

1.3- Atividade antiviral de microRNAs de células trofoblásticas

Estima-se que existam mais de 2000 miRNAs humanos que, em conjunto, regulam aproximadamente a expressão de um terço dos genes codificados pelo genoma humano, os quais podem estar envolvidos nos mais diversos tipos de processos celulares (HAMMOND *et al.*, 2016).

Infecções por patógenos diversos (vírus, bactérias, fungos e protozoários) podem desencadear uma resposta imune sujeita a regulação por miRNAs, os quais podem ter expressão positivamente regulada após a infecção (HU *et al.*, 2010). Por outro lado, uma infecção pode diminuir a expressão de alguns miRNAs envolvidos na regulação de resposta protetora contra o patógeno. Por exemplo, Triboulet *et al.* (2007) mostraram que a infecção pelo HIV-1 impede a expressão do miRNA miR-17/92 do hospedeiro, o qual é responsável por interferir negativamente na replicação viral. Um trabalho recente mostrou que miRNAs expressos durante a infecção por flavivírus podem não ser originados apenas do genoma do hospedeiro, mas também transcritos a partir do genoma viral, principalmente das regiões 3'UTR e 5'UTR. Esses miRNAs podem estar envolvidos em replicação e patogênese virais (BAVIA *et al.*, 2016). Portanto, o repertório de miRNAs de uma célula infectada pode diferir significativamente do conjunto expressos em células não infectadas, e isso pode impactar os efeitos da infecção de diferentes formas.

No contexto do tecido placentário, já se sabe que os miRNAs têm funções importantes em diversos eventos, incluindo desde a formação e a implantação da placenta na decídua até a regulação de resposta contra infecções virais. A placenta é a principal barreira materno-fetal, responsável por mediar trocas de nutrientes e metabólitos entre mãe e feto e proteger este último de patógenos circulantes no sangue materno, e recentemente alguns trabalhos têm mostrado que este órgão não é apenas uma barreira física contra infecções virais, mas também participa de processos que regulam uma resposta protetora contra esses agentes por meio de microRNAs (miRNAs). Esses miRNAs são secretados em exossomos de forma sistêmica e podem ser importantes regulando mecanismos antivirais nos próprios citotrofoblastos e em células adjacentes, podendo ter um papel importante na proteção do feto contra infecção

congênita e transplacentária (DELORME-AXFORD *et al.*, 2013). Os principais miRNAs presentes nesses exossomos são produzidos quase exclusivamente pelas células trofoblásticas e são codificados por uma sequência específica presente no cromossomo 19 do genoma humano (C19MC) (DONKER *et al.*, 2012).

Estudos anteriores já mostraram que esses miRNAs possuem atividade antiviral contra coxsackievirus B3, vírus da estomatite vesicular, vírus da hepatite C, vírus vaccinia, vírus herpes simplex 1 e poliovírus (DELORME-AXFORD *et al.*, 2013). Portanto, a investigação realizada sobre ZIKV neste trabalho é baseada em informação publicada de que o vírus infecta citotrofoblastos (TABATA *et al.*, 2016) e que esta é uma via de transmissão vertical em humanos, resultando em efeitos teratogênicos. Portanto, foi avaliado o impacto das alterações no repertório de miRNAs de citotrofoblastos infectados, obtendo resultados importantes para entender melhor a infecção no contexto da interação vírus-hospedeiro.

1.4- Excreção de vírus em leite materno

O leite materno contém o mais completo conjunto de fatores e nutrientes que garantem o crescimento saudável de neonatos. Os benefícios são reconhecidos mundialmente e a amamentação é recomendada como o único alimento que deve ser oferecido aos recém-nascidos desde a primeira hora após o parto até seis meses de idade (SECTION ON BREASTFEEDING, 2012; WHO, 2013). Em termos de imunidade, a amamentação tem papel fundamental na proteção do neonato pela transferência passiva de anticorpos, células do sistema imune, fatores antimicrobianos e um repertório de micro-organismos comensais do trato gastrointestinal. Além da imunização passiva exercida sobre o lactente, o leite possui componentes com função imunomodulatória com impacto importante no amadurecimento do sistema imune do neonato e na capacidade de reconhecer e combater micro-organismos patogênicos, bem como adquirir tolerância aos comensais (BALLARD & MORROW, 2013).

No entanto, alguns micro-organismos se tornam motivo de preocupação ao serem excretados no leite materno por infectar e causar doença nos recém-nascidos. Esse é o caso de alguns vírus como HIV1, HTLV-I e citomegalovírus que podem ser transmitidos verticalmente via leite materno e, nesses casos são necessárias intervenções terapêuticas ou interrupção da amamentação. No entanto, existem também vírus que já foram detectados em leite materno, mas não possuem capacidade de infectar o neonato pelo contato com o trato gastrointestinal ou por não estarem na forma de partículas virais infecciosas (LAWRENCE & LAWRENCE,

2004). No caso de ZIKV, por exemplo, a infecção perinatal por leite materno não resulta em doença grave e, portanto, a amamentação ainda é recomendada em caso de infecção da lactante. No caso do novo corona vírus SARS-CoV-2, algumas evidências já apontaram a detecção desse patógeno no leite, mas há controvérsias sobre a possibilidade da amamentação ser uma via efetiva de transmissão (LACKEY *et al.*, 2020).

Levando em consideração todo esse contexto, as pesquisas envolvendo a excreção de vírus em leite estão voltadas para a possibilidade de transmissão do patógeno e geração de sinais de doença. Nada é explorado no contexto de como a excreção de antígenos virais impacta o sistema imune e na susceptibilidade do neonato às infecções.

Capítulo 1:
Expressão de microRNAs em trofoblastos
infectados “*in vitro*” por vírus Zika e Chikungunya

OBJETIVOS

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

Avaliar a importância dos miRNAs e exossomos de células trofoblásticas na infecção por ZIKV e CHIKV.

2.2- Objetivos específicos

2.2.1- Avaliar a atividade biológica de exossomos de células trofoblásticas na infecção por ZIKV e CHIKV;

2.2.2- Identificar os miRNAs diferencialmente expressos em células trofoblásticas infectadas por ZIKV e CHIKV;

2.2.3- Realizar a predição computacional dos alvos dos miRNAs diferencialmente expressos em células trofoblásticas infectadas por ZIKV e CHIKV e as vias alteradas em decorrência dessa alteração no repertório de miRNAs;

2.2.4- Identificar os miRNAs diferencialmente expressos envolvidos no processo de autofagia e validar experimentalmente a relevância no contexto da infecção viral pelos dois arbovírus.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- Materiais e métodos

3.1- Preparação e titulação dos estoques virais

Células Vero CCL 81 foram cultivadas em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos e antimicóticos e em estufa à 37°C, 5% de CO₂ e temperatura úmida. Essas células foram utilizadas para preparar e titular os estoques de ZIKV e CHIKV das cepas BeH819966 e S27-African, respectivamente. Resumidamente, as culturas de células Vero infectadas foram observadas diariamente para visualização de efeito citopático. A coleta do estoque foi realizada ao ponto em que 50-60% da monocamada celular estava afetada pela infecção. O sobrenadante e as células (ressuspendidas mecanicamente) foram adicionados em tubos falcons e centrifugadas à 3000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi dividido em alíquotas de 500µL e estocado à -80°C. A titulação foi realizada em placa de 24 poços contendo células Vero com 80-90% de confluência. A infecção foi realizada com 200µL de diluições seriadas 1:10 do estoque viral em meio DMEM 0% SFB. A cultura foi incubada à 37°C por uma hora e submetida à agitação manual lenta a cada 10 minutos. Em seguida, o inóculo foi retirado e 500µL de DMEM contendo 1,5% de carboximetilcelulose, 2% SFB, 1% de antibióticos e antimicóticos foram adicionados em cada poço da placa. Ao final de 7 e 2 dias de incubação à 37°C para ZIKV e CHIKV, respectivamente, as células foram fixadas com formaldeído 5% e coradas com cristal violeta. Ao final da contagem das placas, os títulos obtidos para ZIKV e CHIKV foram 1,0x10⁷ e 2,3x10⁸ PFU/mL, respectivamente.

3.2- Isolamento e cultivo de células trofoblásticas humanas

Os tecidos utilizados para as culturas foram provenientes de placentas humanas saudáveis. As placentas foram coletadas em parceria com o médico e professor Dr. Geraldo Duarte (FMRP) e o médico residente Marcelo Praxedes Monteiro Filho. O projeto foi submetido para análise na plataforma Brasil e foi aprovado de acordo com as normas de ética para utilização de amostras humanas em pesquisa.

Primeiramente, foram coletados 30g de tecidos de vilos placentários, buscando minimizar a porção de tecido conjuntivo. Os fragmentos foram cortados em pedaços menores com lâminas de bisturi e submetidos a três etapas de dispersão com tratamento enzimático. Em cada etapa, os fragmentos foram digeridos por 30 minutos a 37°C com agitação leve em solução HANK'S contendo 0,125% de tripsina, 0,1 mg/mL de DNase I e 1 mg/mL de dispase. A

suspensão celular obtida foi filtrada utilizando filtros com poros de 100 µm, centrifugada a 200 x g e o *pellet* foi ressuspendido em 4 mL de meio de cultura DMEM 10% SFB. Essa suspensão foi adicionada no topo de um gradiente constituído por 14 camadas de soluções com diferentes porcentagens de Percoll diluído em HANK'S (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 e 70% de percoll). Após a centrifugação por 30 minutos a 730 x g e 4°C, a camada celular intermediária, localizada aproximadamente entre as camadas de 35% e 45% de Percoll, foi coletada e submetida a separação por seleção negativa com esférulas magnéticas, de acordo com as instruções dos fabricantes do kit de isolamento (CELLlection™ Biotin Binder Kit) (CHIUPPESI *et al.*, 2015; QUICKE *et al.*, 2016; LI & SCHUST, 2015). O anticorpo anti-HLA-I (marcador de superfície das principais células contaminantes de culturas de trofoblastos) biotilado foi utilizado como intermediário de ligação entre a célula e a esférula magnética. As células foram adicionadas em placas previamente tratadas com colágeno tipo I e cultivadas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ em meio DMEM com 10% SFB, 1% antibióticos e antimicóticos (QUICKE *et al.*, 2016; HONGPAISAN, 2000).

3.3- Citometria de fluxo

Células trofoblásticas purificadas de placenta humana foram fixadas com paraformaldeído 4% e permeabilizadas com solução de PBS 1X com 0,1% de triton e 1% de BSA. Em seguida, as células foram incubadas por 1 hora com anticorpo de camundongo anti-citoqueratina 7 e por 30 minutos com anticorpo secundário marcado com ALEXA Fluor 488. A leitura foi feita em citômetro de fluxo com 10.000 células.

3.4- Infecções virais “*in vitro*” de células trofoblásticas

Células trofoblásticas de cultura primária ou células da linhagem JEG-3 foram incubadas com inóculo viral de ZIKV ou CHIKV, ambos com MOIs iguais a 1, por 1 hora à 4°C em agitação lenta. Em seguida o inóculo viral foi retirado, as monocamadas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X e as células foram mantidas em condições ideais de cultivo já descritas no item 3.2.

3.5- Imunofluorescências

Células trofoblásticas de cultura primária e células JEG-3, controles e infectadas por ZIKV ou CHIKV, foram fixadas com paraformaldeído 4% e permeabilizadas com solução de PBS 1X contendo 0,1% de Triton. As células foram em seguida incubadas com solução de bloqueio comercial por 30 minutos, seguida de incubação com anticorpos primários policlonais de camundongo anti-proteínas estruturais de ZIKV (diluição 1:500) ou CHIKV (diluição 1:500) e anticorpo policlonal de coelho anti-citoqueratina 7 humana (diluição 1:100). Para dupla marcação, foram utilizados dois secundários, um anti-IgG de camundongo marcado com Alexa Fluor 488 e outro anti-IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 594 (ambos utilizados na diluição 1:1000). Após cada incubação com anticorpos, foram feitas lavagens com PBS 1X para reduzir a possibilidade de marcação inespecífica e background fluorescente. As lamínulas contendo as células também foram incubadas com DAPI (diluição 1:1000) e preparadas para visualização em microscópio de fluorescência sobre uma lâmina contendo solução comercial Fluormount-G (Electron Microscopy Sciences).

3.6- Isolamento de vesículas extracelulares de trofoblastos humanos

O isolamento de microvesículas foi realizado conforme descrito anteriormente (DONKER *et al.*, 2012), utilizando sobrenadantes de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ trofoblastos cultivados por 72 horas. O sobrenadante foi submetido a três etapas de centrifugação de 200 x g por 10 minutos, 3000 x g por 10 minutos e 10.000 x g por 30 minutos para remover células e fragmentos celulares. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a ultracentrifugação por 70 minutos a 100000 x g e o pellet contendo as microvesículas foi ressuspensão em PBS e ultracentrifugado novamente nas mesmas condições. O pellet resultante foi ressuspensão em PBS e armazenado a -80°C até a utilização para o ensaio de atividade antiviral.

3.7- Western Blot

Aproximadamente 100 μL da suspensão de microvesículas purificadas foram utilizados para precipitação de proteínas com a adição de 15 μL de ácido tricloroacético (TCA). A mistura foi mantida overnight à 4°C para maior eficiência no procedimento de precipitação. A suspensão foi centrifugada à 14000 x g por 20 minutos à 4°C , o sobrenadante foi descartado, o pellet resultante foi lavado uma vez com acetona gelada e em seguida ressuspensão em 25 μL

de tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol. O mesmo procedimento foi realizado com lisado de citotrofoblastos para ser utilizado como um controle positivo e de pureza das microvesículas isoladas.

Para os experimentos de avaliação de indução de autofagia, culturas de células JEG-3, controles e silenciadas para CREBRF, foram ressuspendidas utilizando solução de PBS 1X com 2mM de EDTA, centrifugadas e o pellet foi ressuspenso em tampão de lise com inibidor de protease. A suspensão foi centrifugada por 20 minutos a 14000 x g e o sobrenadante foi equalizado e utilizado para corrida em gel de poliacrilamida 14%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose durante 1 hora e 15 minutos à 4°C com tampão de transferência contendo 192 mM de glicina e 10% de metanol. As membranas foram incubadas por duas horas com solução de bloqueio contendo 1% de BSA e 5% de leite em pó, mantidas overnight à 4°C com anticorpo primário anti-LC3-II (diluição 1:1000) ou anti-GAPDH (diluição 1:1000), incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP por 1 hora (diluição 1:5000) e finalmente revelada por método de quimioluminescência utilizando luminol. Cinco lavagens de 5 minutos com PBS 1X e 0,1% Tween 20 foram feitas após as etapas de incubações com anticorpos primários e secundários.

3.8- Nanotracking Particles Analysis (NTA)

Foram utilizados 10 μ L da suspensão de exossomos diluídos em 1 mL de PBS 1X para quantificação e análise do tamanho das partículas com diâmetro hidrodinâmico de 40 a 160 nm por NTA. A quantificação foi feita a partir de cinco análises da mesma amostra com média de 47 partículas por campo de leitura, obtendo-se uma média de $1,85 \times 10^{11} \pm 6,43 \times 10^9$ partículas por mL com o tamanho correspondente ao das microvesículas.

3.9- Atividade biológica de microvesículas

Foram adicionadas 10⁵ células Vero em placas de 24 poços e cultivadas em DMEM com 10% de SFB até 80% de confluência. As células foram então incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ com 300 μ L de DMEM (com 10% de SFB depletado para microvesículas por ultracentrifugação overnight) contendo $6,0 \times 10^9$ microvesículas purificadas e, em seguida, infectadas com ZIKV ou CHIKV com uma MOI = 1, ou inoculado com sobrenadante de células Vero (MOCK). Às 24 horas pós-infecção, as células e os sobrenadantes foram coletados para

realizar o ensaio de placa. A diferença nos títulos virais obtidos de células tratadas e não tratadas com exossomos foi estatisticamente significativa de acordo com o teste t não paramétrico e não pareado (p valor $\leq 0,5$).

3.10- Extração, quantificação e análise da integridade de RNA

Para preparação das bibliotecas de miRNAs, primeiramente foi extraído o RNA total de culturas de células JEG-3 com o kit *mirVana*TM miRNA isolation (Life Technologies). O RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro e avaliado com relação à sua integridade por eletroforese convencional e automatizada. A corrida foi feita aplicando em torno de 500 ng de RNA diluídos em Gel Loading Buffer II (reagente fornecido no kit de extração, Ambion) e GelRed Nucleic Acids Stain (Merck) em gel de agarose 1,2% em tampão de corrida TBE 1X. A eletroforese automatizada foi realizada em chips com matriz específica para análise no equipamento 2100 Bioanalyser System (Agilent).

3.11- Sequenciamento de miRNAs e análises computacionais

O sequenciamento foi realizado utilizando o kit NextSeq Mid Output (300 cycles) (Illumina) e os reads obtidos (~150 milhões, 94,26% \geq Q30) foram analisados com programa FastQC (WINGETT *et al.*, 2018) para avaliar a qualidade das amostras. Posteriormente, as reads foram submetidas ao programa CutAdapt (MARTIN *et al.*, 2011) para retirada dos adaptadores e mascarar as regiões de baixa qualidade. As sequências trimadas foram alinhadas e mapeadas com o programa Bowtie (LANGMEAD *et al.*, 2009) com a base de dados do miRBase (KOZOMARA *et al.*, 2019) para identificação dos microRNAs humanos. Após o mapeamento, os microRNAs identificados foram quantificados e exportados para análise comparativa das amostras. Cada repetição das amostras foi tratada de forma individualizada para cálculo da expressão diferencial dos microRNAs a partir da amostra controle sem infecção. Os valores absolutos de cada microRNA foram analisados com o programa R para análise estatística e preparação dos gráficos dos resultados. O valor de p foi calculado e a alteração da expressão (fold change) foram usados para produção do gráfico volcano.

3.12- Predição computacional de alvos de miRNAs

Após a identificação dos miRNAs diferencialmente expressos em células JEG-3 infectadas, foi realizada a identificação de possíveis alvos de regulação por métodos computacionais. As predições computacionais foram realizadas por meio dos programas miRDB (WONG *et al.*, 2014), miRanda (CAMPOS *et al.*, 2016), TargetScan (AGARWAL *et al.*, 2015), mirMap (VEJNAR *et al.*, 2012), miRTarBase (HUANG *et al.*, 2019) e miRNet (FAN *et al.*, 2016) e direcionadas inicialmente para análises dos miRNAs up-regulados.

3.13- Silenciamento de CREBRF

Aproximadamente 120000 células da linhagem JEG-3 células foram transfectadas em suspensão utilizando oligofectamina. Foram utilizadas duas sequências de RNA de interferência comerciais para a realização do silenciamento. As células foram mantidas em contato com o sistema de transfecção contendo os siRNAs em meio OPTI-MEM durante 4 horas. Em seguida, foi adicionado o dobro do volume de transfecção de meio de cultura com 3X de SFB e a cultura foi mantida por 72 horas até a infecção. Após decorridas 24 horas da infecção, as células foram coletadas e submetidas à extração de RNA para quantificação da carga viral.

3.14- Quantificação de genoma viral e mRNA de CREBRF

As culturas de células JEG-3 utilizadas para o experimento de silenciamento de CREBRF foram submetidas à extração de RNA por trizol (Invitrogen). Em seguida, 1000 ng de RNA de cada amostra foram utilizados para a reação de transcrição reversa utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). O cDNA sintetizado foi utilizado para quantificar mRNA de CREBRF pelo método de SYBR Green (PCR Biosystems) com os seguintes pares de primers: GGAAGGTCCTGGGTCCTTG (Forward) e TGGCTGTTACCCAAGTTGT (Reverse). A quantificação de genoma viral de CHIKV também foi realizada utilizando SYBR Green com os seguintes primers: CTCATACCGCATCCGCATCAG (Forward) and ACATTGGCCCCACAATGAATTTG (Reverse). Para ambas as quantificações, o GAPDH foi o gene endógeno amplificado para normalização das amostras com os seguintes primers: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC (Forward) e GCCTTCTCCATGGTGGTGAA (Reverse). A quantificação do genoma de ZIKV

foi realizada com o kit Taqman (PCR Biosystems) utilizando β -actina como gene endógeno para normalização. Os seguintes pares de primers e sondas foram utilizados: 1) ZIKV: GCACAATGCCCCCACTGT (Forward), TGGGCCTTATCTCCATTCCA (Reverse) e 6FAMTTCCGGGCTAAAGATGGCTGTTGGTMGBNFQ (Sonda); 2: β -actina: CCCAGCCATGTACGTTGCTA (Forward), TCACCGGAGTCCATCACGAT (Reverse) e FAM-ACGCCTCTGGCCGTACCACTGG-TAMRA (Sonda).

RESULTADOS

4- Resultados

4.1- Células trofoblásticas de placenta humana são susceptíveis à infecção “*in vitro*” por ZIKV e CHIKV

As culturas primárias de células trofoblásticas preparadas para avaliar a susceptibilidade dessas células às infecções por ZIKV e CHIKV foram observadas diariamente para avaliação de viabilidade e morfologia (Figura 1).

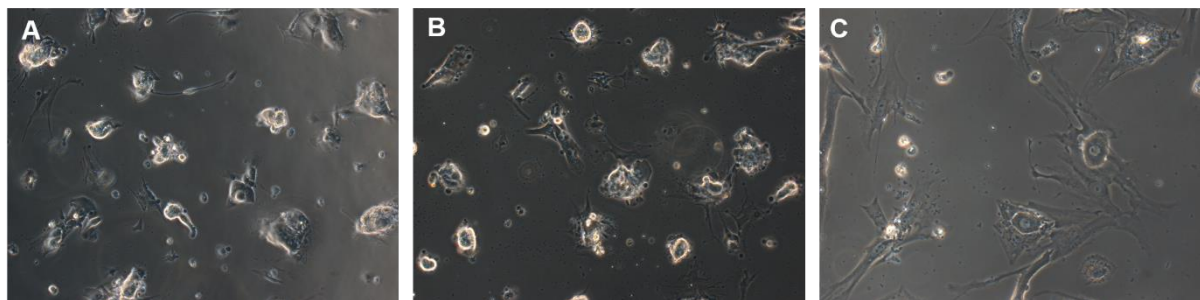


Figura 1: Cultura primária de trofoblastos humanos. A figura mostra a cultura de trofoblastos após 24, 48 e 72 horas de cultivo (Figura 1A, 1B e 1C, respectivamente). Ao longo desse tempo a morfologia das células se altera à medida que citotrofoblastos se diferenciam em sincitiotrofoblastos. A maioria dos citotrofoblastos já se encontra diferenciada após 72 horas de cultivo.

A confirmação do isolamento de citotrofoblastos foi realizada por citometria de fluxo com anticorpo específico para citoqueratina 7, um marcador de trofoblastos do vilo placentário. O resultado obtido mostrou que aproximadamente 95% das células possuíam a marcação desejada após o gradiente de percoll e seleção negativa com beads magnéticas (Figura 2).

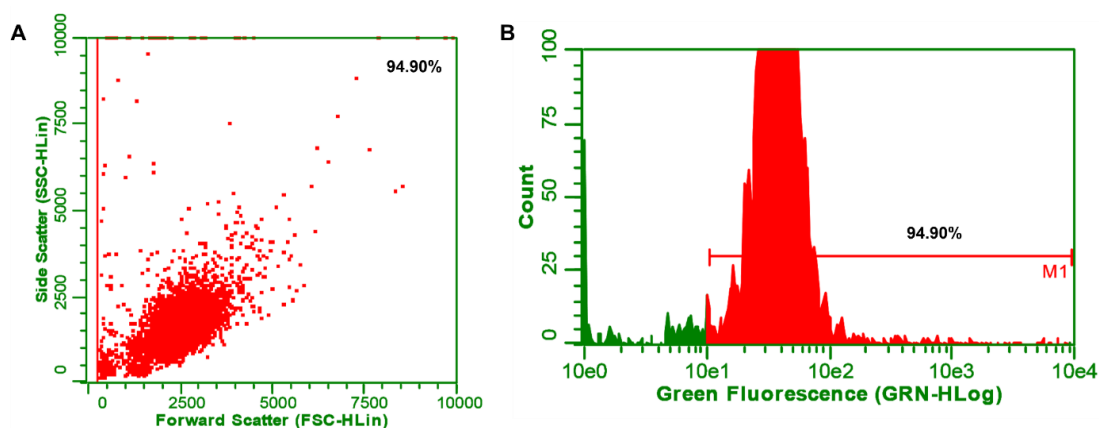


Figura 2: Análise por citometria de fluxo de citotrofoblastos purificados. A pureza da cultura de citotrofoblastos foi avaliada utilizando detecção de citoqueratina 7 por citometria de fluxo (fluorescência verde) (2B). Esta metodologia indicou que aproximadamente 95% da cultura é constituída pelas células de interesse.

Os resultados de imunofluorescência com as células infectadas mostraram marcação positiva para ZIKV e citoqueratina 7 nas culturas de células primárias, confirmando que trofoblastos humanos são susceptíveis à infecção por ZIKV (Figura 3E – H), conforme já havia sido publicado (AAGAARD *et al.*, 2017). Os resultados de imunofluorescência nas culturas infectadas por CHIKV mostraram dupla marcação para proteínas virais e citoqueratina 7 humana (Figuras 3M – 3P), indicando que estas células também são susceptíveis à infecção por este arbovírus.

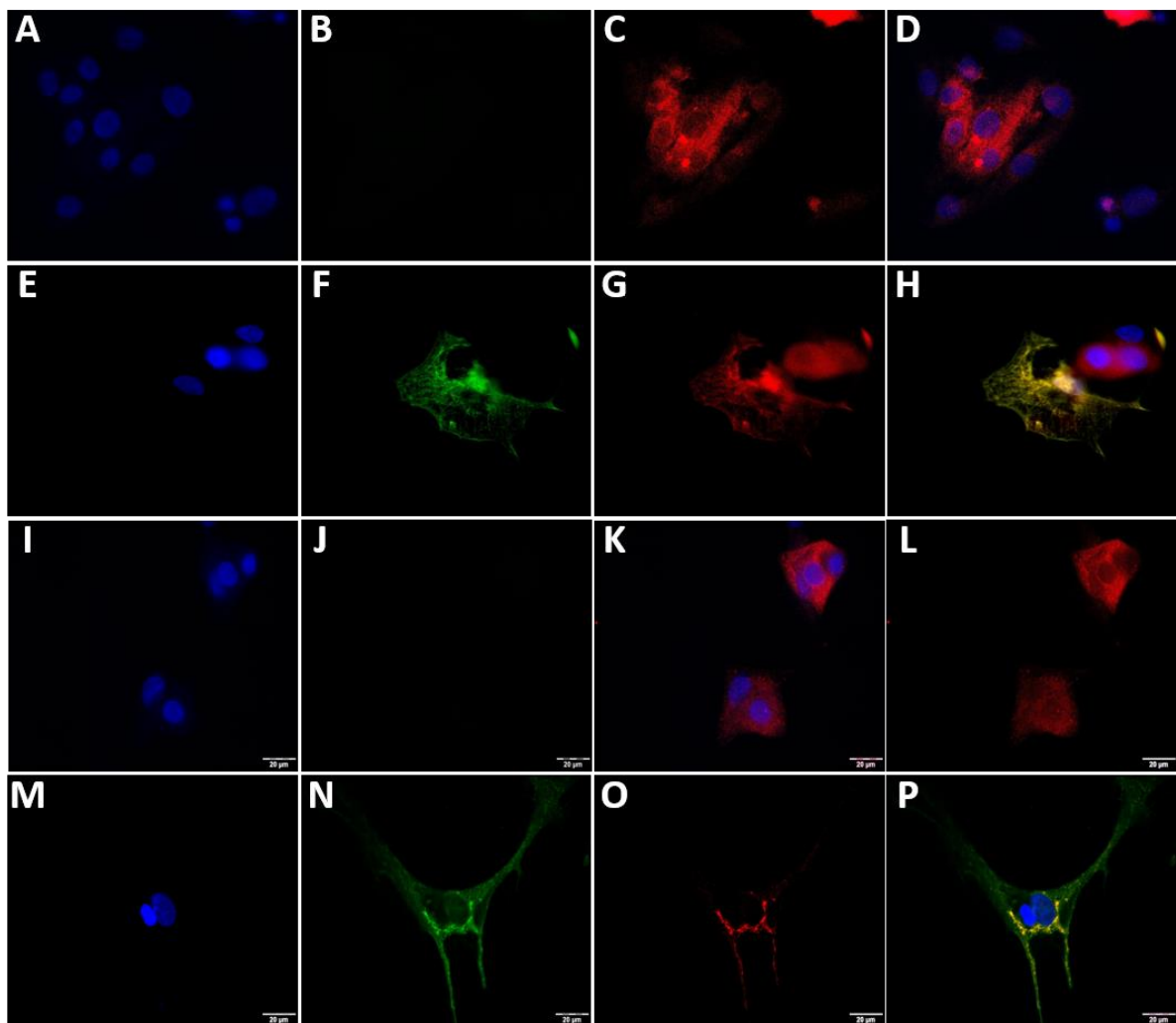


Figura 3: Infecção de células trofoblásticas humanas por ZIKV e CHIKV. A susceptibilidade de células trofoblásticas humanas à infecção “*in vitro*” por ZIKV e CHIKV foi confirmada por imunofluorescência. A marcação para proteínas virais ocorre em células positivas também para citoqueratina 7. A sobreposição da marcação em verde (vírus) e em vermelho (citoqueratina 7) é mostrada nas figuras 3H e 3P. Os controles negativos (Figuras A-D e I-L) apresentaram marcação apenas para citoqueratina 7 e DAPI (Figuras 3D e 3L).

4.2- Microvesículas de citotrofoblastos exercem atividade antiviral contra CHIKV

As microvesículas isoladas de sobrenadante de culturas de trofoblastos foram avaliadas com relação à pureza por Western Blot e quantificadas por NTA. A utilização de anticorpos anti-Alix mostrou que exossomos estavam presentes na suspensão purificada e, assim como no controle positivo (lisado de citotrofoblastos). Já a ausência de EEA1, marcador de endossomo inicial, na suspensão de microvesículas indica que não havia contaminação com outras estruturas celulares (Figura 4A).

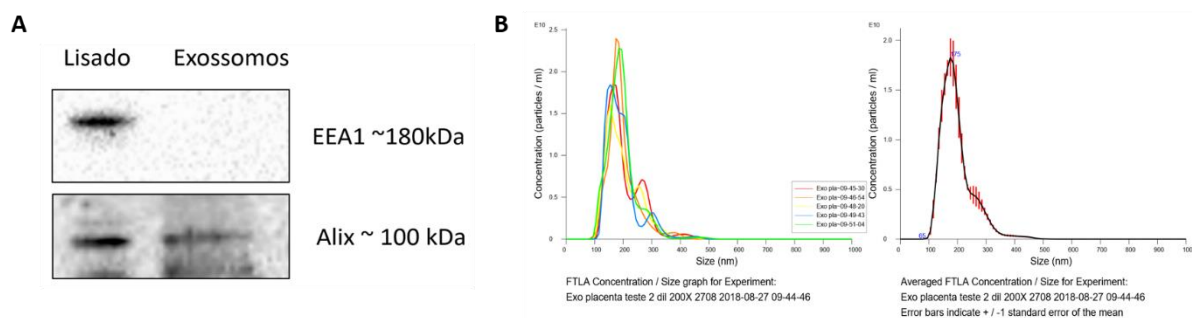


Figura 4: Avaliação da pureza e quantificação de microvesículas. (A) O marcador de exossomos Alix (100kDa) foi detectado por Western Blot no lisado de trofoblastos (controle positivo) e na suspensão de exossomos. O marcador de endossomo inicial EEA1 (180 kDa) foi detectado apenas no lisado. Esses resultados indicam que os exossomos foram isolados com grau de pureza satisfatório. (B) Quantificação de exossomos de trofoblastos humanos por análise de NTA. Uma alíquota da suspensão de exossomos foi utilizada para a quantificação de partículas com diâmetro hidrodinâmico na faixa de 40 a 160 nm. A quantificação foi feita com base em cinco análises da mesma amostra com uma média de 47 partículas por campo de leitura, obtendo-se uma média de $1,85 \times 10^{11} \pm 6,43 \times 10^9$ partículas por mL com tamanho correspondente ao dos exossomos. A média de tamanho das partículas na suspensão foi igual a 196,7 nm, provavelmente devido à presença de microvesículas, que têm tamanhos maiores. O desvio padrão (SD) foi igual a 57,1 nm.

Para avaliar se as microvesículas purificadas de trofoblastos humanos são ativas contra ZIKV e CHIKV, células Vero foram previamente incubadas com exossomos purificados antes da infecção. Não foi observado efeitos do tratamento com microvesículas na infecção por ZIKV, sendo que os títulos virais obtidos em células Vero tratadas e não tratadas foram semelhantes e sem diferenças estatísticas significativas (Figura 5A). No entanto, as microvesículas de trofoblastos conferiram resistência às células Vero com relação à CHIKV, diminuindo os títulos de progênie viral infecciosa em aproximadamente 100 vezes em comparação com o controle negativo (Figura 5B).

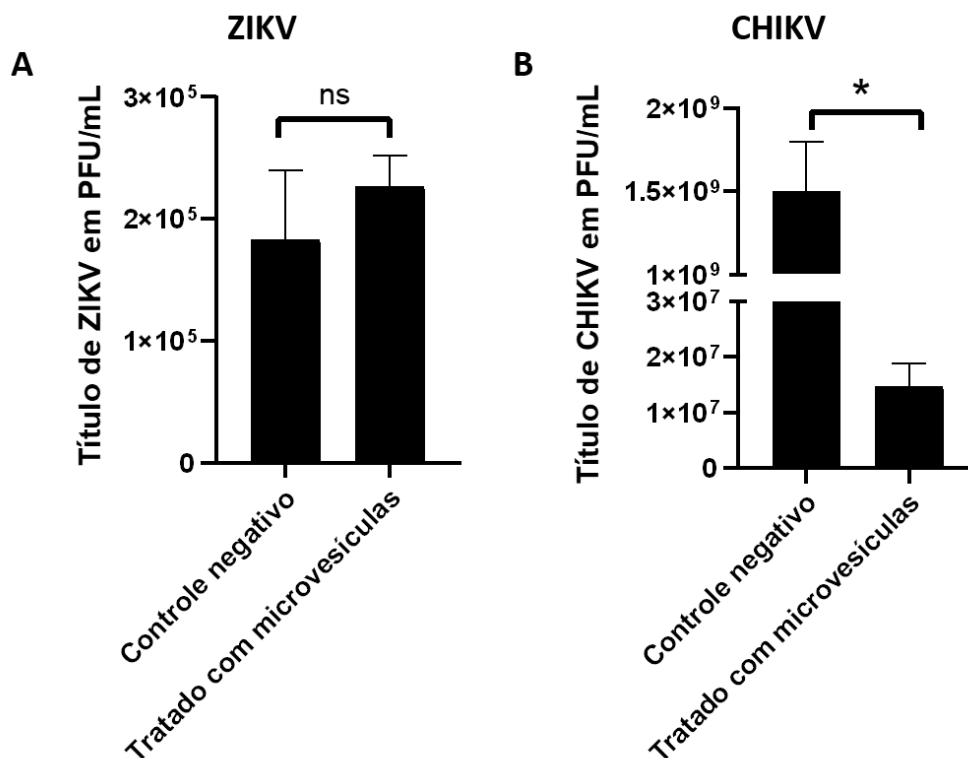


Figura 5: Atividade antiviral de microvesículas de trofoblastos humanos contra ZIKV e CHIKV. Os exossomos de trofoblastos foram capazes de reduzir a permissividade de células Vero à replicação de CHIKV em cerca de 100 vezes, mas não de ZIKV. Dois experimentos independentes foram realizados com células de duas placentas diferentes. Mais experimentos serão feitos.

4.3- A infecção de células JEG-3 por ZIKV e CHIKV altera o perfil de expressão de miRNAs da célula hospedeira

Células da linhagem imortalizada JEG-3 têm marcadores moleculares que as identificam como trofoblastos do viló placentário, pois expressam citoqueratina 7 e não expressam HLA-I e CD9 (KING *et al.*, 2000). Além disso, assim como trofoblastos vilosos, células JEG-3 são capazes de se diferenciar em sinciciotrofoblastos quando cultivadas “*in vitro*” em sistemas apropriados de cultura 3D (MCCONKEY *et al.*, 2016). As semelhanças também são observadas em termos funcionais e fisiológicos como os tipos de junções que mantêm a integridade da barreira celular, secreção de hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), permeabilidade controlada e dependente do material e tamanho de partículas, e resistência a infecções virais e *Toxoplasma gondii* quando diferenciadas “*in vitro*” em sinciciotrofoblastos (ROTHBAUER *et al.*, 2017; MCCONKEY *et al.*, 2016). Por fim, células JEG-3 têm perfis de expressão de RNAs mensageiros e microRNAs similares aos observados para trofoblastos vilosos, incluindo a expressão de microRNAs exclusivos de trofoblastos, codificados por genes presentes em clusters nos cromossomos 19 (C19MC) e 14 (C14MC) (DONKER *et al.*, 2012; MORALES-PRIETO *et al.*, 2012). Portanto, células da linhagem JEG-3 podem ser crescidas em grande quantidade necessária para obter material suficiente para o experimento de sequenciamento de RNA em larga escala.

Sendo assim, células JEG-3 foram utilizadas para avaliar a infecção por ZIKV e CHIKV. Os resultados de imunofluorescência com anticorpos policlonais de camundongos anti-proteínas estruturais desses vírus mostraram que as células dessa linhagem são susceptíveis à infecção viral por ambos (Figura 6) e, portanto, culturas de JEG-3 foram utilizadas para avaliar o perfil de expressão de miRNAs frente às infecções virais.

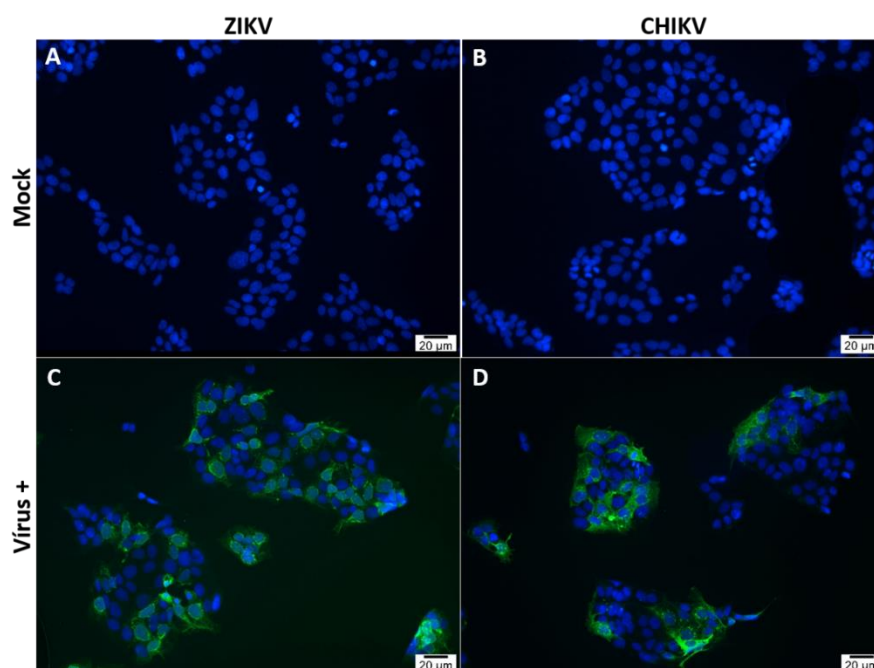


Figura 6: Susceptibilidade das células JEG-3 a infecção por ZIKV e CHIKV. Células JEG-3 foram infectadas por ZIKV (C) e CHIKV (D) com MOIs iguais a 5 e 1, respectivamente. As células foram fixadas e as proteínas virais foram detectadas por imunofluorescência com anticorpos policlonais de camundongos após decorridas 24 horas da infecção.

As amostras de RNA extraídas para sequenciamento foram primeiro quantificadas e analisadas com relação à sua integridade. As concentrações obtidas para cada amostra estão listadas na tabela 1 e variaram de 554,9 a 981,0 ng/μL. As razões de absorvância A_{260}/A_{280} também estão listadas na tabela 1 e indicam um grau de pureza do RNA dentro da faixa desejada para experimentos de sequenciamento em larga escala (de 1,8 a 2,1).

Tabela 1: Análise de RNA total em espectrofotômetro: concentração e razão de absorvância 260nm/280nm.

Amostra	[RNA](ng/μL)	A_{260}/A_{280}
1 (MOCK 1)	570,0	2,04
2 (MOCK 2)	873,0	2,04
3 (MOCK 3)	808,2	2,06
4 (ZIKV1)	554,9	2,04
5 (ZIKV2)	829,1	2,05
6 (ZIKV3)	823,7	2,07
7 (CHIKV1)	981,0	2,06
8 (CHIKV2)	713,8	2,05
9 (CHIKV3)	772,0	2,03

Em seguida, 1 μL do RNA foi analisado em gel de agarose não-desnaturante revelando alto grau de integridade do RNA total, visto que as bandas de RNA ribossômicos 28S e 18S foram detectadas nitidamente, sem a observação de arraste ou bandas inespecíficas que indicariam degradação ou contaminação com DNA genômico (Figura 7A). Além disso, a razão das intensidades das bandas 28S/18S é aproximadamente igual a 2, o que é esperado para uma amostra de RNA total de qualidade.

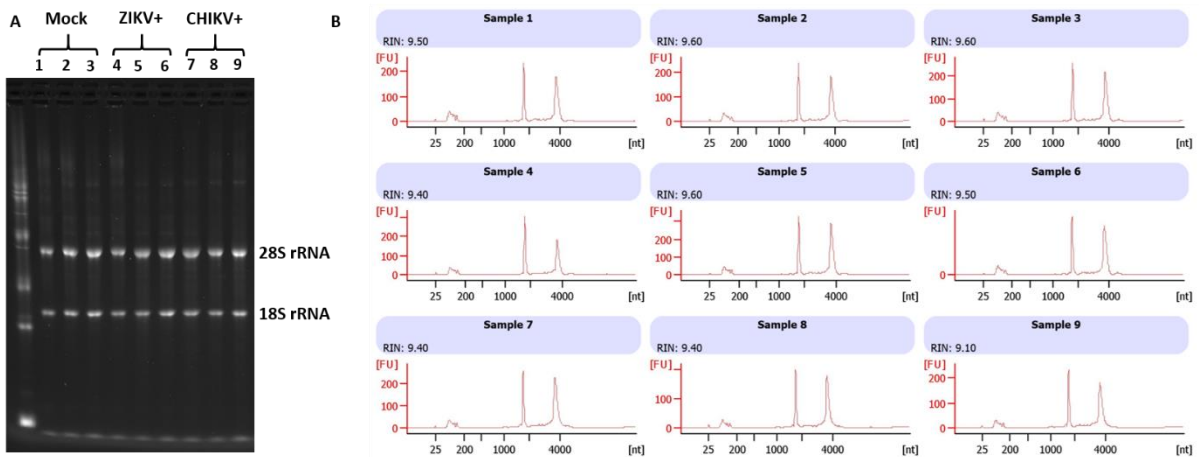


Figura 7: Análise da pureza e integridade do RNA total por eletroforese convencional e automatizada. (A) Os resultados de eletroforese em gel de agarose mostraram bandas bem definidas para as subunidades ribossomais 28S e 18S, sem a presença de arraste ou bandas inespecíficas, indicando integridade e pureza do RNA. (B) Análise das amostras em Bioanalyzer 2100 confirmou os resultados observados por eletroforese convencional, com picos de intensidade bem definidos para as subunidades ribossomais 28S (~4000 kb) e 18S (~2000 kb) e ausência de picos inespecíficos que poderiam indicar degradação ou contaminação do RNA. Os valores de RIN obtidos para cada amostra se mantiveram acima de 9.00.

A abundância, integridade e pureza das amostras também foram confirmadas utilizando ferramentas de eletroforese automatizada (Bioanalyzer 2100, Agilent). Os resultados confirmaram os já indicados por técnicas mais simples de controle de qualidade e mostraram picos bem definidos de intensidade para as bandas 28S e 18S de RNAs ribossomais. O software Bioanalyzer foi utilizado para analisar cada amostra por meio de um sistema numérico pré-definido, o RIN (RNA Integrity Number). Esse sistema classifica as amostras de 1.00 a 10.00 de acordo com a integridade e pureza, sendo que quanto mais próximo de 10.00 melhor a qualidade do RNA. Todas as amostras de RNA extraído das nossas culturas obtiveram valores de RIN maiores que 9.00 e, portanto, as características se mostraram dentro do padrão desejável para iniciar a preparação das bibliotecas de sequenciamento (Figura 7B).

As sequências de miRNAs obtidas por sequenciamento de nova geração foram comparadas entre os grupos controle e os infectados por ZIKV e CHIKV. A infecção por ZIKV analisada no tempo de 24 horas resultou apenas em regulação positiva de 29 miRNAs já identificados e cadastrados no banco de dados miRBase (Tabela 2).

Tabela 2: Lista de miRNAs com expressão alterada durante a infecção por ZIKV

	Identificação do miRNA
miRNAs regulados positivamente (fold change ≥ 1 ; p-valor ≤ 0.05)	hsa-miR-12117
	hsa-miR-1277-5p
	hsa-miR-33a-5p
	hsa-miR-6740-3p
	hsa-miR-3691-5p
	hsa-let-7f-1-3p
	hsa-miR-548a-3p
	hsa-miR-579-3p
	hsa-miR-548aj-3p
miRNAs regulados positivamente (fold change < 1 ; p-valor ≤ 0.05)	hsa-miR-548at-3p
	hsa-miR-105-5p
	hsa-miR-224-3p
	hsa-miR-4708-3p
	hsa-miR-3140-5p
	hsa-miR-573
	hsa-miR-3909
	hsa-miR-515-3p
	hsa-miR-520f-3p
	hsa-miR-520b-3p
	hsa-miR-520c-3p
	hsa-miR-26a-1-3p
	hsa-miR-519b-3p
	hsa-miR-519a-3p
	hsa-miR-519c-3p
	hsa-miR-1237-3p
	hsa-miR-4485-5p
	hsa-miR-7974
	hsa-miR-135a-5p
	hsa-miR-19b-1-5p

Curiosamente, 12 desses miRNAs, de acordo com as predições computacionais de seus alvos, podem estar envolvidos na regulação positiva do processo de autofagia tendo como alvo a proteína CREBRF. Para CHIKV, foram identificados 6 miRNAs com expressão aumentada e 169 miRNAs com expressão diminuída (Tabela 3), sendo que dois miRNAs up-regulados também possuem sítios de ligação na sequência de mRNA codificadora de CREBRF.

Tabela 3: Lista de miRNAs com expressão alterada durante a infecção por CHIKV

Identificação do miRNA
1- miRNAs regulados positivamente (fold change ≥ 1; p-valor ≤ 0.05)
hsa-miR-1290
hsa-miR-1248
hsa-miR-1246
hsa-miR-3609
hsa-miR-5582-5p
hsa-miR-663a
2- miRNAs regulados negativamente (fold change ≥ 1; p-valor ≤ 0.05)
hsa-miR-23a-5p
hsa-miR-4458
hsa-miR-1908-5p
hsa-miR-194-3p
hsa-miR-149-3p
hsa-miR-3917
hsa-miR-92a-1-5p
hsa-miR-197-5p
hsa-miR-139-3p
hsa-miR-586
hsa-miR-6724-5p
hsa-miR-9901

hsa-miR-222-5p
hsa-miR-365a-5p
hsa-miR-181b-3p
hsa-miR-30b-3p
hsa-miR-135b-3p
hsa-miR-191-3p
hsa-miR-181b-2-3p
hsa-miR-26a-1-3p
hsa-miR-125a-3p
hsa-miR-5693
hsa-miR-27b-5p
hsa-miR-25-5p
hsa-miR-146b-3p
hsa-miR-26b-3p
hsa-miR-4521
hsa-miR-6775-3p
hsa-miR-5695
hsa-miR-33b-3p
hsa-miR-373-5p
hsa-miR-193b-5p
hsa-miR-26a-2-3p
hsa-miR-424-3p
hsa-miR-23b-5p
hsa-miR-296-3p
hsa-miR-498-5p
hsa-miR-3145-3p
hsa-miR-1323
hsa-miR-1180-3p
hsa-miR-27a-5p
hsa-miR-371b-3p
hsa-miR-219a-1-3p
hsa-miR-21-3p

hsa-miR-503-3p
hsa-miR-1307-3p
hsa-miR-30c-1-3p
hsa-miR-320e
hsa-miR-320d
hsa-miR-128-1-5p
hsa-miR-34a-3p
hsa-miR-11399
hsa-miR-320b
hsa-miR-527
hsa-miR-320a-3p
hsa-let-7d-5p
hsa-miR-98-5p
hsa-let-7b-5p
hsa-miR-877-5p
hsa-let-7e-5p
hsa-miR-5697
hsa-miR-95-5p
hsa-miR-6839-5p
hsa-let-7c-5p
hsa-miR-320c
hsa-let-7g-5p
hsa-let-7a-5p
hsa-let-7f-5p
hsa-let-7a-3p
hsa-let-7f-2-3p
hsa-miR-744-5p
hsa-miR-1303
hsa-miR-375-3p
hsa-miR-182-3p
hsa-miR-615-3p
hsa-miR-500b-3p

hsa-miR-454-5p
hsa-miR-3140-3p
hsa-miR-664a-3p
hsa-miR-3173-5p
hsa-miR-24-2-5p
hsa-miR-99b-3p
hsa-miR-16-1-3p
hsa-miR-30d-3p
hsa-miR-4664-3p
hsa-miR-579-5p
hsa-miR-210-5p
hsa-miR-19b-1-5p
hsa-miR-130b-5p
hsa-miR-23c
hsa-miR-483-5p
hsa-miR-331-5p
hsa-miR-1237-3p
hsa-miR-3928-3p
hsa-miR-20a-3p
hsa-miR-4802-3p
hsa-miR-518a-5p
hsa-miR-23a-3p
hsa-miR-16-2-3p
hsa-miR-148a-5p
hsa-miR-3690
hsa-miR-1276
hsa-miR-181c-3p
hsa-miR-125b-2-3p
hsa-miR-181a-3p
hsa-miR-185-3p
hsa-miR-3661
hsa-miR-181d-5p

hsa-miR-196b-5p
hsa-miR-193a-5p
hsa-miR-3660
hsa-miR-675-5p
hsa-miR-671-3p
hsa-miR-3912-5p
hsa-miR-597-3p
hsa-miR-222-3p
hsa-miR-196a-5p
hsa-miR-181b-5p
hsa-miR-23b-3p
hsa-miR-1273c
hsa-miR-3912-3p
hsa-miR-212-5p
hsa-miR-181a-2-3p
hsa-miR-3940-3p
hsa-miR-335-5p
hsa-miR-32-3p
hsa-miR-941
hsa-miR-106b-3p
hsa-miR-361-5p
hsa-miR-5481
hsa-miR-4708-5p
hsa-miR-361-3p
hsa-miR-3615
hsa-miR-484
hsa-miR-942-3p
hsa-miR-520e-5p
hsa-miR-3662
hsa-miR-28-3p
hsa-miR-509-3-5p
hsa-miR-330-3p

hsa-miR-584-5p
hsa-miR-4708-3p
hsa-miR-629-3p
hsa-miR-548b-5p
hsa-miR-372-5p
hsa-miR-107
hsa-miR-629-5p
hsa-miR-130b-3p
hsa-miR-183-3p
hsa-miR-1-3p
hsa-miR-25-3p
hsa-miR-518c-5p
hsa-miR-659-5p
hsa-miR-942-5p
hsa-miR-422a
hsa-miR-548au-5p
hsa-miR-378h
hsa-miR-1287-5p
hsa-miR-378f
hsa-miR-452-5p
hsa-miR-335-3p
hsa-miR-7-5p
hsa-miR-200c-3p
hsa-miR-526b-5p
hsa-miR-23a-5p
hsa-miR-4458
hsa-miR-1908-5p
hsa-miR-194-3p
hsa-miR-149-3p
hsa-miR-3917
hsa-miR-92a-1-5p
hsa-miR-197-5p

hsa-miR-139-3p
hsa-miR-586
hsa-miR-6724-5p
hsa-miR-9901
hsa-miR-222-5p
hsa-miR-365a-5p
hsa-miR-181b-3p
hsa-miR-30b-3p
hsa-miR-135b-3p
hsa-miR-191-3p
hsa-miR-181b-2-3p
hsa-miR-26a-1-3p
hsa-miR-125a-3p
hsa-miR-5693
hsa-miR-27b-5p

Os gráficos do tipo volcano demonstrando o perfil de expressão nas células JEG-3 infectadas por ZIKV e CHIKV estão representados na Figura 8.

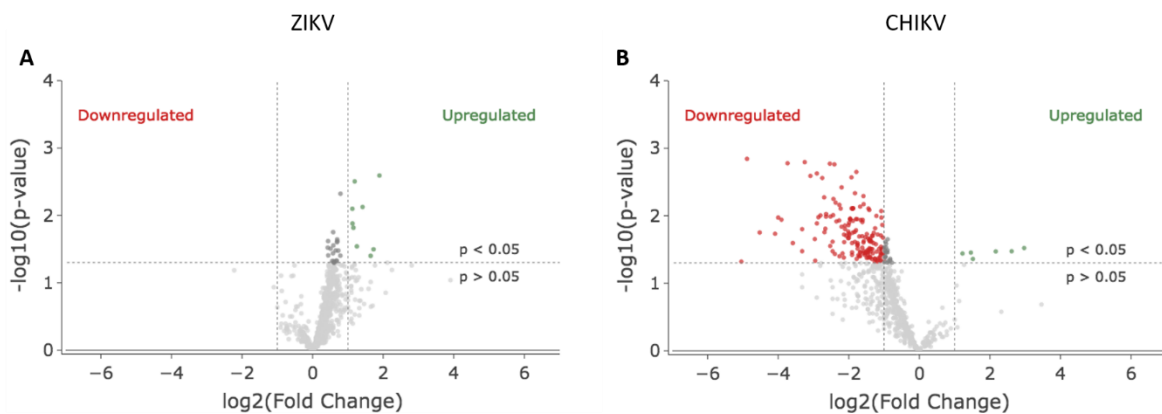


Figura 8: Perfil de microRNAs em células JEG-3 infectadas por ZIKV e CHIKV. Volcano plots obtidos a partir da quantificação das sequências identificadas por RNA-seq mostrando os microRNAs diferencialmente expressos em células infectadas por ZIKV (A) e CHIKV (B). Os eixos horizontais representam o aumento ou diminuição da expressão dos microRNAs em relação às células *mock* (fold-change), enquanto os eixos verticais representam a significância estatística dessas alterações em termos

de p-valor. As linhas pontilhadas horizontais indicam o ponto onde o p-valor = 0.05 e, portanto, todos os microRNAs representados acima dessa linha estão regulados negativamente (vermelho) ou positivamente (verde). As linhas pontilhadas verticais representam os valores de *fold change* iguais a -1 e 1, adotados como os valores mínimos para se considerar um microRNA negativamente ou positivamente regulado de forma significativa.

4.4- As alterações na abundância dos miRNAs podem alterar vias importantes

Os resultados de predições computacionais de vias alteradas durante infecções por ZIKV e CHIKV indicam que várias vias relevantes para a infecção viral são alteradas. Para ZIKV, processos como resposta a proteínas mal enoveladas e autofagia, inibição da transcrição pela RNA polimerase II, regulação negativa da progressão do ciclo celular, transporte endossomal e aumento dos processos biossintéticos relacionados à produção de citocinas foram preditos. Ao passo que a transcrição das proteínas virais ocorre em associação com membranas do retículo, a resposta a proteínas mal enoveladas e autofagia chama atenção e parece estar associada com a regulação por miRNAs (Figura 9).

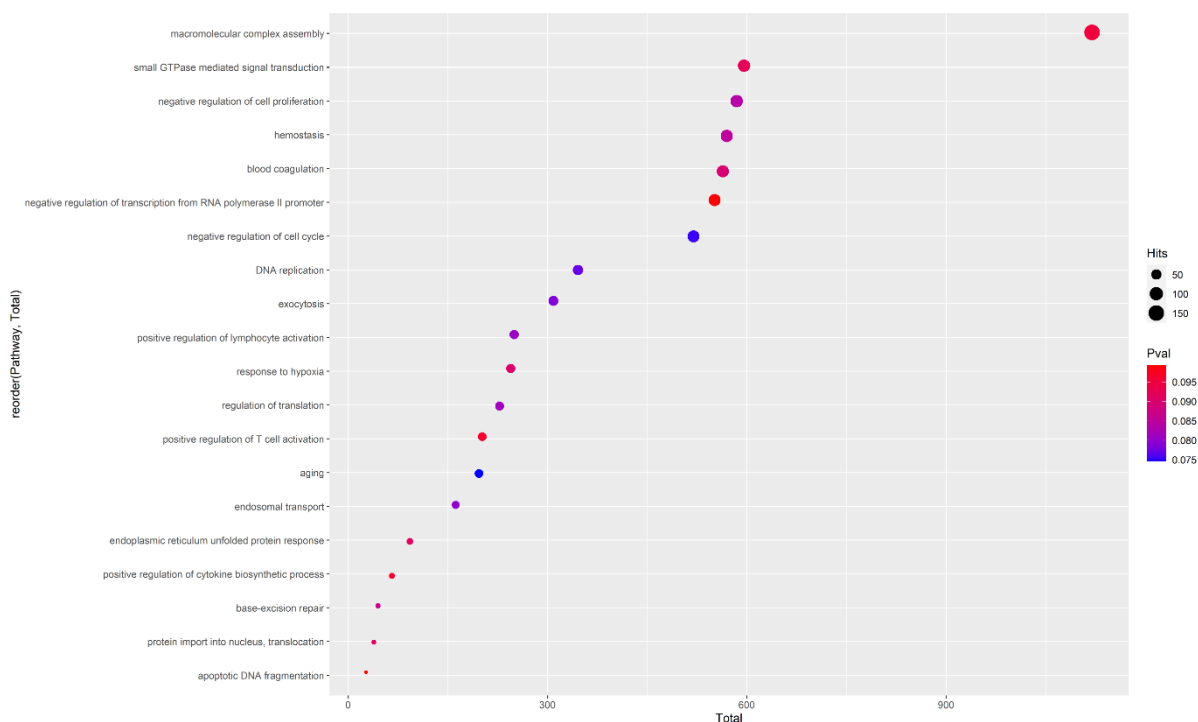


Figura 9: Vias alteradas durante a infecção por ZIKV. As predições computacionais indicam o envolvimento dos miRNAs na regulação das vias acima. A intensidade da alteração na via é demonstrada em termos do p-valor, no número de reads obtidos no sequenciamento (que reflete variação

na expressão do miRNA) e no número de genes envolvidos na via que são alvos dos miRNAs com expressão alterada.

As predições computacionais para vias alteradas em células infectadas por CHIKV indicam que os miRNAs podem estar envolvidos em processos importantes. As principais vias alteradas envolvem a regulação negativa de processos metabólicos e biossintéticos, modificações na estrutura da cromatina, incluindo pela adição de ligações covalentes a grupos químicos funcionais, splicing de RNA e interferências na progressão do ciclo celular e reparo à danos no DNA genômico (Figura 10).

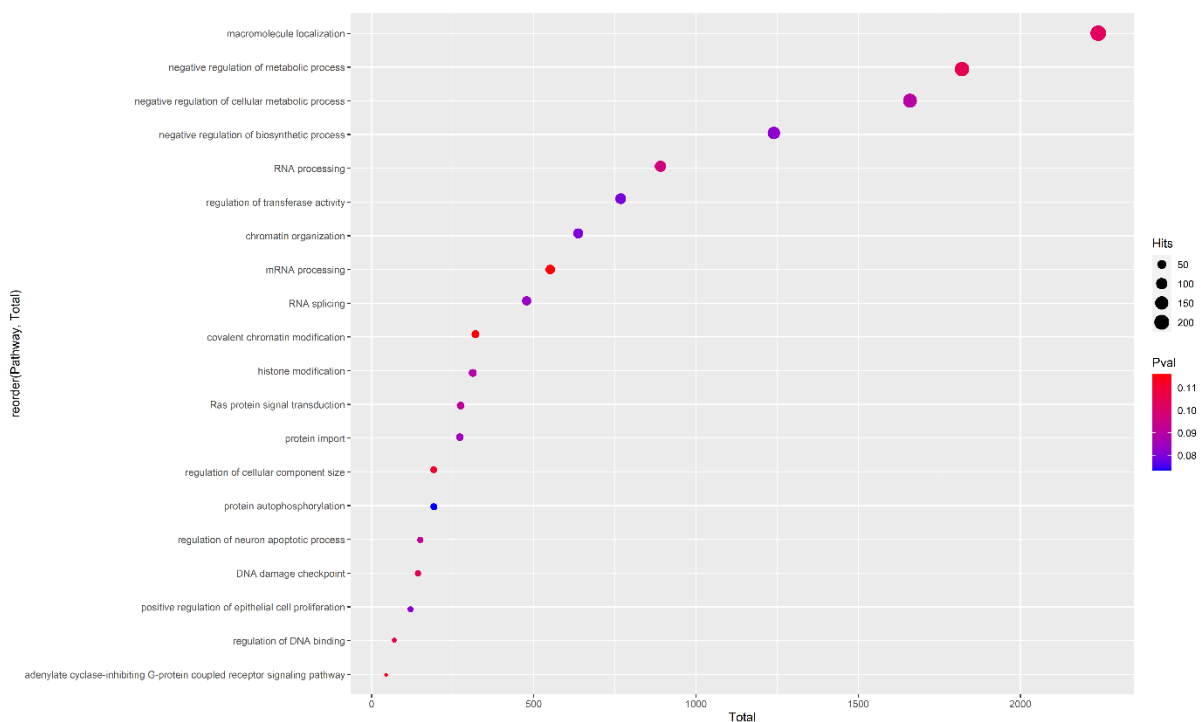


Figura 10: Vias alteradas durante a infecção por CHIKV. A mesma metodologia foi utilizada para predição das vias afetadas pela infecção de CHIKV, e os resultados apontaram intensa modificação na estrutura da cromatina e regulação negativa de processos metabólicos e biossintéticos.

4.5- O repertório de miRNAs de células JEG-3 inclui possíveis sequências codificadas pelo genoma viral

Parte das sequências identificadas por NGS nas culturas infectadas não se alinharam no genoma humano. Portanto, foi feita uma busca para avaliar se a origem dessas sequências seria ser os genomas virais. Como foi possível observar, 0,04% sequências identificadas na cultura

infectada por ZIKV se alinharam ao genoma desse vírus, abrindo a possibilidade de produção de miRNAs virais nessas culturas de trofoblastos. Da mesma forma, 13,86% sequências correspondiam ao genoma viral de CHIKV nas culturas infectadas por este vírus.

4.6- O silenciamento de CREBRF interfere na replicação de ZIKV e CHIKV de formas distintas

As predições computacionais chamaram atenção pelo número de miRNAs que têm o mRNA de CREBRF como alvo. Sendo assim, esse resultado preliminar foi selecionado para validação experimental, principalmente pelo fato de CREBRF ser uma proteína reguladora de autofagia, que por sua vez é um processo celular que pode ter um impacto significativo nas infecções virais. A primeira etapa consistiu da quantificação dos níveis de CREBRF a nível transcricional por PCR frente às infecções por ZIKV e CHIKV. Os resultados mostraram que células JEG-3 não tem a abundância de mRNA de CREBRF alterada após a infecção por ambos (Figura 11). Esse resultado reflete uma realidade relacionada aos mecanismos de ação de miRNAs de mamíferos, que se ligam aos mRNAs alvos e impedem a tradução, alterando assim somente a expressão a nível de proteínas.

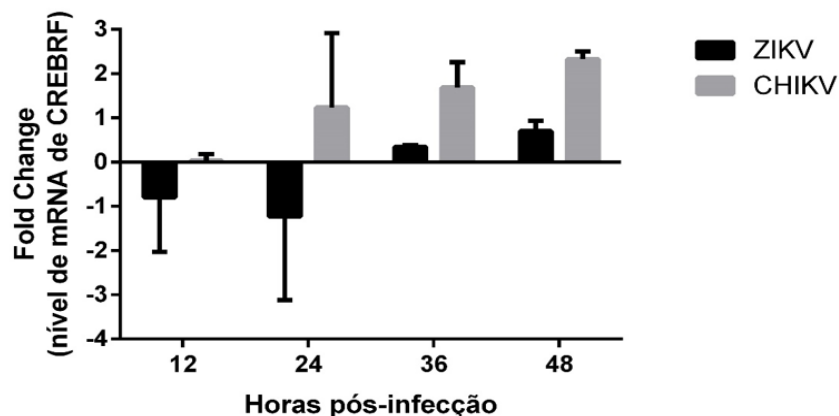


Figura 11: Quantificação de mRNA de CREBRF em células JEG-3 infectadas por ZIKV e CHIKV. A quantificação relativa de mRNA de CREBRF não foi alterada de forma significativa nas células infectadas pelos três arbovírus em nenhum tempo pós-infecção. A quantificação foi realizada por PCR em tempo real (SYBR GREEN) e normalizada pela expressão do gene endógeno GAPDH. Os resultados estão demonstrados na forma de fold change em relação às células mock.

Devido à ausência de um anticorpo comercial anti-CREBRF, esse resultado ainda não foi obtido. No entanto, o silenciamento de CREBRF com duas diferentes sequências de RNA de interferência alteraram a expressão de CREBRF e impactou tanto na replicação de ZIKV como de CHIKV, porém de formas contrárias. Ao silenciar CREBRF, a replicação de ZIKV sofreu um aumento significativo, enquanto a replicação de CHIKV foi diminuída em células JEG-3 (Figura 12B). O silenciamento de CREBRF induziu um aumento da proteína LC3-II, um marcador de autofagia (Figura 12C).

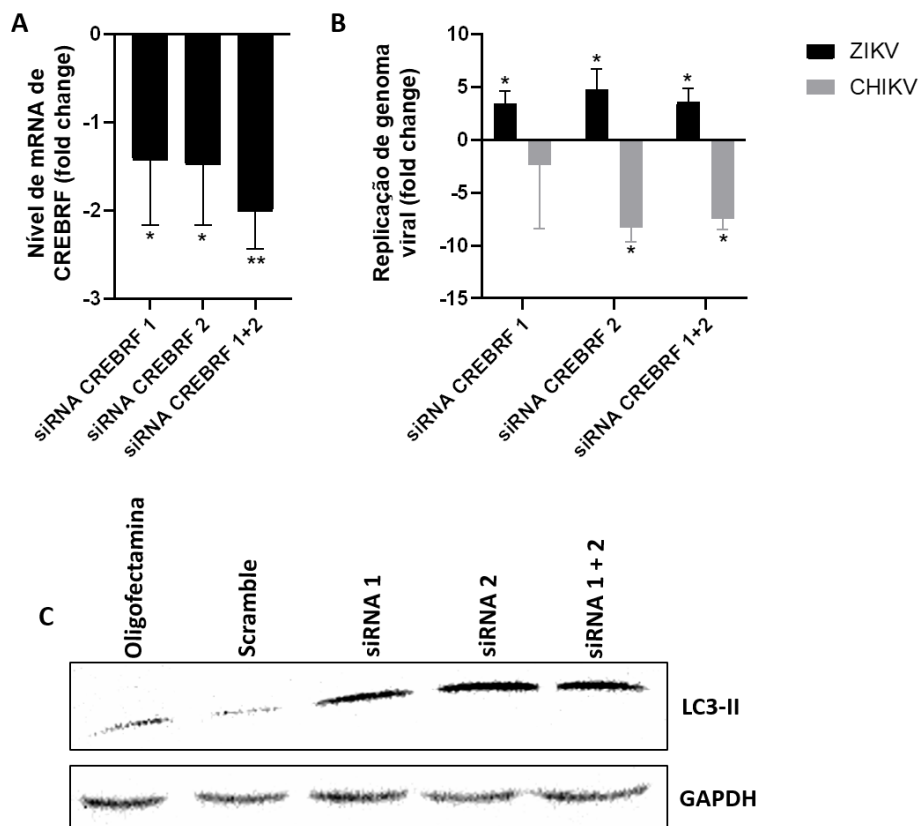


Figura 12: Impacto do silenciamento de CREBRF na infecção de ZIKV e CHIKV. (A) O silenciamento de CREBRF induziu uma diminuição significativa na abundância de mRNA que codifica essa proteína. (B) O silenciamento de CREBRF induziu um aumento na replicação do genoma de ZIKV, bem como uma diminuição na replicação de CHIKV. (C) O silenciamento de CREBRF resultou em indução de autofagia, como evidenciado pelo aumento do marcador LC3-II.

DISCUSSÃO

5- Discussão

Os resultados obtidos representam achados importantes relacionados à transmissão vertical transplacentária de ZIKV. A infecção de citotrofoblastos de placenta humana por este vírus já é um evento documentado na literatura, porém pouco se sabe sobre os mecanismos que fazem com que este arbovírus seja capaz de se replicar em células conhecidas por serem intrinsecamente resistente às infecções virais. Neste sentido, identificamos miRNAs da célula hospedeira que estão positivamente regulados durante a infecção viral e que tem como alvo a proteína CREBRF. Esta, por sua vez, é conhecida como um fator regulatório dos processos de resposta a proteínas mal enoveladas e autofagia.

Esse achado se torna relevante no contexto da transmissão vertical transplacentária diante do que já é relatado na literatura sobre o impacto da autofagia na infecção por ZIKV. Em modelos animais murinos, pesquisadores mostraram que a inibição da autofagia limita a infecção viral em células placentárias, impede a transmissão vertical para os fetos e, conseqüentemente, não há a observação de defeitos teratogênicos (CAO *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Além disso, o tratamento de células trofoblásticas JEG-3 com drogas inibidoras da autofagia reduziu a replicação viral “*in vitro*”. Portanto, os nossos resultados associam pela primeira vez os miRNAs de células trofoblásticas e a proteína CREBRF com a transmissão vertical, colaborando significativamente para a elucidação de mecanismos importantes na interação patógeno-hospedeiro.

Portanto, os resultados aqui descritos abrem caminhos para novas investigações, incluindo a descoberta de novas vias que podem ser estudadas como alvos terapêuticos e preventivos relacionados à transmissão vertical. Como perspectivas futuras, esta via será mais explorada pelo nosso grupo de pesquisa e o envolvimento da regulação de CREBRF será confirmado utilizando inibidores específicos dos miRNAs e avaliando as alterações nos níveis dessa proteína. Os miRNAs também serão clonados e superexpressos em células trofoblásticas, as quais também serão infectadas para avaliar o impacto na infecção viral.

Além dos resultados validados com relação à regulação de autofagia por CREBRF, outras vias importantes foram preditas e podem ser exploradas experimentalmente no futuro. Por exemplo, as predições computacionais indicaram o envolvimento dos miRNAs up-regulados com a regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase II em células infectadas por ZIKV. Esse processo também pode ser descrito como um evento pró-viral, visto que a maquinaria de transcrição, tradução e processamento de proteínas da célula infectada fica

disponível para a tradução e processamento das proteínas virais. Para macrófagos infectados por ZIKV, os pesquisadores já mostraram que a abundância de proteínas que têm seus mRNAs transcritos pela RNA polimerase II é consideravelmente reduzida em decorrência de um shut off transcricional (CARLIN *et al.*, 2018). Em citotrofoblastos este evento pode também ocorrer e pode estar relacionado com regulação por miRNAs.

Além dos miRNAs codificados pela célula hospedeira e que estão positivamente regulados durante a infecção por ZIKV, foram identificadas sequências virais por NGS. Por muito tempo, a comunidade científica acreditou que apenas vírus de DNA pudessem codificar miRNAs em seu genoma. Os vírus com genoma composto por RNA, por terem replicação exclusivamente citoplasmática, não teriam acesso à enzima Drosha no núcleo, responsável pelo processamento inicial de transcritos primários em precursores de miRNAs. No entanto, já existem trabalhos publicados que descrevem mecanismos alternativos de biogênese de miRNAs virais, incluindo Flavivirus e Alphavirus. Em um primeiro mecanismo descrito, as estruturas secundárias formadas pelo genoma viral se tornam resistentes à degradação por nucleases do hospedeiro e podem ser reconhecidas diretamente pela Dicer no citoplasma, a enzima responsável pelo processamento de precursores de miRNAs em miRNAs maduros. Por outro lado, também já foi mostrado que, em algumas infecções por vírus de RNA, há um realocamento da enzima Drosha do núcleo para o citoplasma, possibilitando o processamento de transcritos primários até a etapa final de miRNAs maduros (BAVIA *et al.*, 2016; SHAPIRO *et al.*, 2012; ROUHA *et al.*, 2010).

Ao analisar comparativamente os dados obtidos para ZIKV e CHIKV, o tratamento com microvesículas de trofoblastos e silenciamento de CREBRF têm efeitos contrários na replicação viral. Ao passo que a exposição de células Vero às microvesículas e o silenciamento de CREBRF diminuem a replicação de CHIKV, supõe-se que a indução de autofagia em trofoblastos seja um evento antiviral para este arbovírus. Isso pode explicar, em partes, as taxas de transmissão vertical em humanos para cada arbovírus. Enquanto a transmissão vertical transplacentária de CHIKV é considerada mais rara e dependente do tempo de gestação e de altas cargas virais no sangue materno, a transmissão vertical de ZIKV é muito mais recorrente.

Com relação às outras vias alteradas pela infecção de CHIKV em células JEG-3, várias delas apontam que os miRNAs estão relacionados a alterações na estrutura da cromatina. Nesse contexto, pode-se entender que essas alterações estariam relacionadas com a regulação negativa ou positiva da expressão de diversos outros genes por impedir ou promover a ligação

de diversos fatores de regulação em elementos regulatórios nas sequências de DNA genômico. Também foi predita a regulação negativa de processos metabólicos e biossintéticos celulares, provavelmente relacionados com estratégias virais para disponibilizar a maquinaria celular para os eventos de replicação e montagem do vírus.

Capítulo 2:
Estabelecimento de um modelo experimental da
transmissão vertical de vírus Chikungunya na
gestação e lactação

1- INTRODUÇÃO AO CAPÍTULO

Os modelos animais descritos na literatura para estudos com CHIKV envolvem, em sua maioria, pesquisas sobre infecção aguda letal em murinos neonatos ou imunocomprometidos e infecção crônica e persistente em primatas não humanos. No que se refere à transmissão vertical, já se sabe que é um evento que ocorre em humanos, mas não existem modelos animais para avaliar as rotas da transmissão e os efeitos teratogênicos nos fetos, bem como para avaliar a atividade antiviral de substâncias e identificar vias e alvos terapêuticos para impedir a passagem do vírus para o feto ou neonato.

Outro aspecto ainda não explorado está relacionado com o impacto da infecção por CHIKV durante a gestação e amamentação no sistema imune do feto ou lactente. O presente trabalho explorou essas duas abordagens em modelos de camundongos BALB/c e traz resultados interessantes que serão úteis para estudos futuros e abordagens translacionais.

OBJETIVOS

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

2.1.1- Avaliar os impactos da infecção de CHIKV em camundongos fêmeas BALB/c durante a gestação e lactação.

2.2- Objetivos específicos

2.2.1- Avaliar a possibilidade de transmissão vertical transplacentária de CHIKV em modelo murino e observar a ocorrência de efeitos teratogênicos nos fetos;

2.2.2- Avaliar a presença de genoma e antígenos virais no leite de fêmeas BALB/c infectadas durante a gestação e a lactação;

2.2.3- Avaliar os impactos da excreção de antígenos virais de CHIKV no leite sobre o sistema imune de camundongos lactentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

3- Materiais e métodos

3.1- Vírus, células e infecções

Células Vero CCL-81 foram utilizadas para preparação e titulação dos estoques virais, como descrito no item 3.1 do primeiro capítulo desse trabalho. Células Vero também foram utilizadas para realizar os ensaios de neutralização e as tentativas de isolamento viral a partir de leite de camundongos. Essas células foram mantidas em estufa de à 37°C, 5% de CO₂, 1% de antibióticos e antimicóticos e atmosfera úmida. As culturas foram observadas diariamente para verificação de morfologia e subcultivadas ao atingir 100% de confluência. Também foram feitas culturas primárias de placenta de camundongos. Para isso, as placentas foram coletadas no 18º dia gestacional, dissecadas para a retirada de membranas extraembrionárias, cortadas em pequenos pedaços com lâminas de bisturi e submetidas à digestão enzimática (500µg/mL de colagenase e 0,1mg/mL de DNase) por 1 hora a 37°C e agitação lenta. A suspensão celular obtida foi filtrada em membrana com poros de 100 µm para a retirada de fragmentos de tecidos não digeridos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X e adicionadas em poços de placas de 24 poços contendo lamínulas estéreis e revestidas com colágeno tipo I. As culturas foram mantidas em meio DMEM 10%, 37°C e 5% de CO₂ por 4 horas para permitir a adesão das células viáveis e lavadas em seguida com PBS 1X para retirar células mortas, debris celulares e hemácias. A infecção foi feita com estoque viral diluído em DMEM 10% SBF (MOI = 10) e as células foram mantidas por 12 horas até serem fixadas com paraformaldeído 10% para a realização de imunofluorescências com anticorpo policlonal de camundongos contra CHIKV.

3.2- Modelos animais e infecções

Camundongos da linhagem BALB/c foram utilizados nesse projeto de acordo com as normas de ética estabelecidas para experimentação animal. O projeto foi submetido para análise e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Fêmeas e machos com 6 semanas de idade foram obtidos pelo Biotério Central de Criação da FMRP. As fêmeas foram mantidas por no mínimo 10 dias na mesma gaiola e separadas dos machos para sincronização do ciclo estral. Ao final deste período, a progressão do ciclo foi estimulada alojando as fêmeas nas gaiolas dos respectivos machos com os quais foi feito o acasalamento. Três dias após esse estímulo, os casais foram colocados na mesma gaiola e observados diariamente para avaliação da presença de plug vaginal, sendo este considerado o 0.5º dia gestacional. Para avaliação da transmissão vertical transplacentária, as fêmeas foram infectadas com 100µL contendo 10⁶ PFU de CHIKV pela

via subcutânea nos dias 5, 8, 12 e 15 de gestação e os fetos e placentas foram obtidos por cesariana no dia gestacional 18. Para avaliar o impacto da gestação e amamentação em fêmeas infectadas por CHIKV, as grávidas foram mantidas até o parto natural e os filhotes foram observados até a idade adulta, sendo desmamados no 30º dia após o nascimento. Parte desses animais foram submetidos a coleta de sangue nos dias 30, 60 e 90 após o nascimento para análise de resposta humoral (ensaio de neutralização) anti-CHIKV e coleta de baço no dia 90 após o nascimento para análise de resposta imune celular (ensaio de proliferação celular). Outra parte dos animais foram desafiados com 10^6 PFU de CHIKV e tiveram seus cérebros e baços coletados 72 horas após a infecção para quantificação de carga viral (RT-qPCR).

3.3- Extração de RNA, transcrição reversa e PCR

De acordo com instruções do kit de trizol (Invitrogen), 50 mg de tecido de glândulas mamárias, cérebro, baço ou leite coletado do estômago dos animais foram macerados em 1 mL de trizol e a extração foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido para o reagente. Na transcrição reversa, 1000 ng de RNA foram utilizados para sintetizar o cDNA completar com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para detecção de CHIKV, foram utilizados 200 ng do cDNA sintetizado na etapa anterior na reação realizada pelo método SYBR Green (PCR Biosystems) com os seguintes pares de primers: (Forward) e (Reverse). Para quantificação do RNA viral, foi utilizada uma curva com cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de um estique viral. Os dados foram normalizados por grama de tecido e plotados na forma de cópias de RNA equivalente a PFU de CHIKV. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism versão 8.

3.4. Western Blot

O leite coletado do estômago dos neonatos foi colocado em tampão de lise contendo inibidor de protease e, após intensa homogeneização, o conteúdo foi centrifugado à 14000 x g por 20 minutos à 4°C. A fração intermediária foi coletada cuidadosamente, evitando o conteúdo do pellet e a camada de gordura formada na parte superior do tubo. As amostras coletadas de animais amamentados em fêmeas mock e em fêmeas infectadas foram equalizadas e aplicadas em gel de poliacrilamina 14%. As proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência contendo 192 mM de glicina e 10% de metanol. As membranas foram incubadas com solução de bloqueio por 2 horas (5% de leite em pó dissolvidos em PBS 1 X com 0,01% de Tween 20), lavadas e mantidas overnight com anticorpo policlonal de camundongo anti-proteínas estruturais ou anticorpo policlonal de coelho anti-

nsP1 de CHIKV. Após 1 hora de incubação com anticorpo secundário conjugado a HRP, foi feita a revelação pelo método de quimioluminescência com luminol. Cinco lavagens (5 minutos cada uma) seguiram as etapas de bloqueio e incubações com os anticorpos primários e secundários.

3.5. Imunofluorescência

Fêmeas BALB/c foram infectadas pela via subcutânea com 10^6 PFU de CHIKV-595, um vírus obtido por genética reversa em um trabalho previamente publicado por Kummerer e colaboradores (2012). Após o décimo dia decorrido do nascimento dos animais, as glândulas mamárias foram coletadas, fixadas por 24 horas em formaldeído 10%, cortadas em fatias de $100\mu\text{m}$ em vibrátomo, incubadas por 1 hora com DAPI (diluição 1:500) e analisadas por microscopia confocal para detecção de fluorescência no comprimento de onda correspondente ao da proteína mCherry.

Células Vero utilizadas para isolamento viral e culturas primárias de placenta de camundongos foram crescidas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. As culturas foram lavadas após o tempo de necessário de infecção e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com solução comercial e BSA 1% por 30 minutos à 37°C . Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário de camundongo anti-proteínas estruturais de CHIKV (diluição 1:100) por uma hora, lavadas com PBS 1X e incubadas com o secundário anti-mouse conjugado com fluoróforo Alexa Fluor 488 (diluição 1:1000) e DAPI (diluição 1:1000) por 30 minutos. As células foram novamente lavadas e montadas para visualização em microscópio de fluorescência com solução comercial Fluormount-G (Electron Microscopy Sciences).

3.6- Teste de neutralização por redução de placa (PRNT)

Células Vero foram adicionadas em placas de 24 poços e observadas até atingir confluência de aproximadamente 90%. Os soros dos animais foram incubados à 56°C por 1 hora para inativação do sistema de complemento e em seguida diluídos serialmente na proporção 1:2, obtendo 8 diluições entre o intervalo 1:100 e 1:12800 para um volume final de $200\mu\text{L}$ já contendo 30 PFU de CHIKV em cada diluição. Os soros foram incubados com o inóculo viral por 1 hora e 30 minutos à 37°C e em seguida adicionados sobre as monocamadas de células Vero e as placas com a cultura foram novamente mantidas à 37°C e submetidas à agitação manual lenta a cada 15 minutos. Decorrido o tempo de incubação, o inóculo foi retirado e foram adicionados $500\mu\text{L}$ de meio DMEM com 1,5% de carboximetilcelulose, 2% de

SFB e 1% de antibióticos e antimicóticos. A cultura foi mantida em estufa à 37°C, 5% de CO₂ em atmosfera úmida por 48 horas, fixadas com formaldeído 5% e coradas com cristal violeta 1%. As placas foram contadas e os dados foram plotados em tabelas utilizando o software GraphPad Prism versão 8 para construção dos gráficos e análises estatísticas.

3.7- Ensaio de proliferação celular

Grupos de camundongos amamentados em fêmeas mock e controle foram sacrificados 90 dias após o nascimento e os baços foram coletados, macerados, tratados com solução de hemólise e as células totais foram coradas com CellTrace™ Violet (Invitrogen). As culturas foram mantidas em meio RPMI com 10% de soro fetal bonito, 1% de antibiótico e antimicótico, e cultivadas na presença de sobrenadante de células Vero (mock), controle positivo de proliferação celular (anti-CD3 e anti-CD28), CHIKV infeccioso ou CHIKV inativado em estufa à 37°C, 5% de CO₂ e atmosfera úmida. Decorridas 72 horas, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e CD8 (marcadores de linfócitos TCD4 e TCD8, respectivamente) e a proliferação e viabilidade foi avaliada por citometria de fluxo para a identificação de linfócitos de memória que se dividiram frente ao estímulo com antígenos virais.

3.8- Isolamento viral

Células vero foram cultivadas em placas de 24 poços até atingir confluência de 80%. O leite coletado do estômago dos neonatos e macerados de glândulas mamárias em meio DMEM 0% SFB foram congelados e descongelados 3 vezes, centrifugadas à 3000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm. O sobrenadante filtrado foi inoculado nas culturas de células Vero e as placas foram deixadas em agitação lenta por 1 hora e 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 200 µL de meio DMEM 4% de SFB e as cultas foram mantidas em estufa e observadas diariamente para verificação de efeito citopático. Na ausência de efeito citopático, foram feitas passagens cegas e imunofluorescência com anticorpo policlonal de camundongo anti-CHIKV para confirmação da ausência do vírus.

3.9- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism e as diferenças entre os grupos foi considerada significativa quando p valor ≤ 5. As diferenças entre as cargas virais, curvas de neutralização e porcentagens de proliferação celular foram avaliadas utilizando ANOVA e testes de múltiplas comparações para dados não paramétricos e não

pareados. Os dados foram obtidos com pelo menos dois experimentos independentes e analisados em triplicata biológica.

RESULTADOS

4- Resultados

4.1- CHIKV pode ser transmitido verticalmente pela via transplacentária em modelo murino e causar efeitos teratogênicos

Para investigar a transmissão vertical do CHIKV pela via transplacentária, camundongos BALB/c fêmeas foram infectados com 10^6 PFU de CHIKV pela veia da cauda no 5º, 8º, 12º e 15º dias de gestação. Os fetos foram coletados por cesariana no 18º dia de gestação, para excluir as possibilidades de transmissão vertical perinatal ou pós-natal. No total, o CHIKV foi detectado por PCR em 8,4% dos fetos obtidos de fêmeas grávidas infectadas no 5º dia de gestação, mas não em fêmeas infectadas em períodos mais tardios (Figura 1A). Alguns dos fetos infectados exibiram malformações graves (Figura 1B). Além do genoma viral, proteínas virais foram detectadas por imunohistoquímica em fatias de tecido obtidas de cortes sagitais dos fetos inteiros e emblocados em parafina. A coloração para proteínas virais não foi observada em animais mock (Figura 1C), enquanto foi observada em todos os corpos de fetos infectados com CHIKV, especialmente nas regiões subcutâneas, meninges, fígado e coração (Figura 1D). As placentas de fetos infectados também apresentavam genoma viral e proteínas detectáveis, indicando a ocorrência de transmissão vertical do CHIKV pela via transplacentária (Figura 1F). Além disso, partículas virais infecciosas foram isoladas de amostras de tecido em culturas de células Vero, indicando que o vírus permanece viável e capaz de se replicar nos tecidos (Figura 1G).

Com o objetivo de avaliar os tipos celulares susceptíveis à infecção por CHIKV na placenta de camundongos, culturas primárias de células totais foram cultivadas e infectadas “*in vitro*” para realização de imunofluorescência com anticorpos direcionados às proteínas virais e aos marcadores de células epiteliais (pan-citoqueratina) e mesenquimais (vimentina). Os resultados mostraram que as células positivas para proteínas virais são também marcadas para vimentina, indicando que células mesenquimais (fibroblastos e células endoteliais) do tecido placentário apresentam susceptibilidade à infecção por CHIKV. Não foram observadas células positivas para CHIKV e citoqueratina, sugerindo que células epiteliais, como as diferentes linhagens de trofoblastos, são resistentes à infecção por CHIKV (Figura 2).

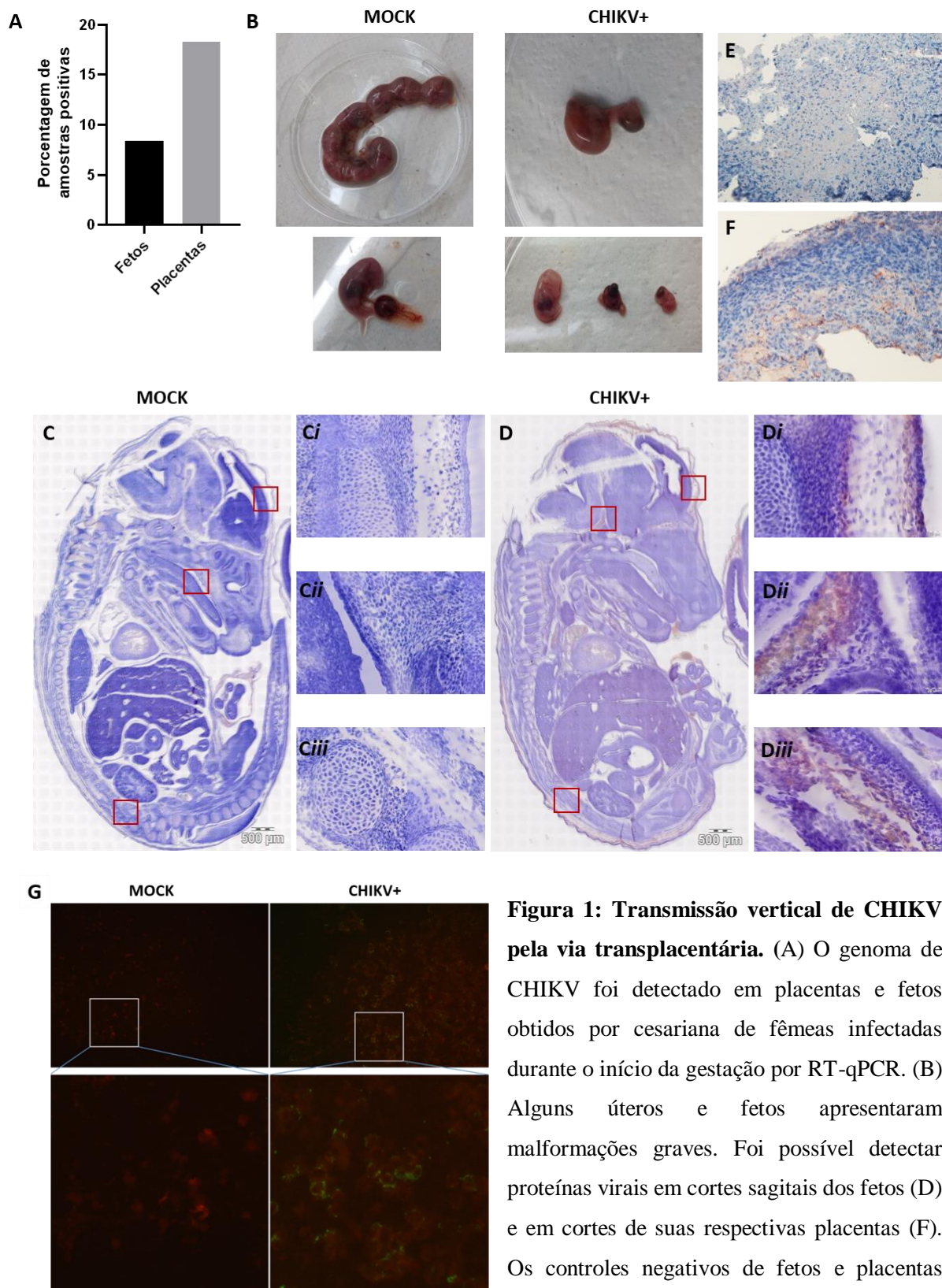


Figura 1: Transmissão vertical de CHIKV pela via transplacentária. (A) O genoma de CHIKV foi detectado em placentas e fetos obtidos por cesariana de fêmeas infectadas durante o início da gestação por RT-qPCR. (B) Alguns úteros e fetos apresentaram malformações graves. Foi possível detectar proteínas virais em cortes sagitais dos fetos (D) e em cortes de suas respectivas placentas (F). Os controles negativos de fetos e placentas estão representados nas figuras 1C e 1E, respectivamente, sem marcação para proteínas virais. Também foi possível isolar partículas virais infecciosas em culturas de células Vero a partir das amostras de fetos com efeitos teratogênicos graves, como mostrado por imunofluorescência na Figura 1G.

respectivamente, sem marcação para proteínas virais. Também foi possível isolar partículas virais infecciosas em culturas de células Vero a partir das amostras de fetos com efeitos teratogênicos graves, como mostrado por imunofluorescência na Figura 1G.

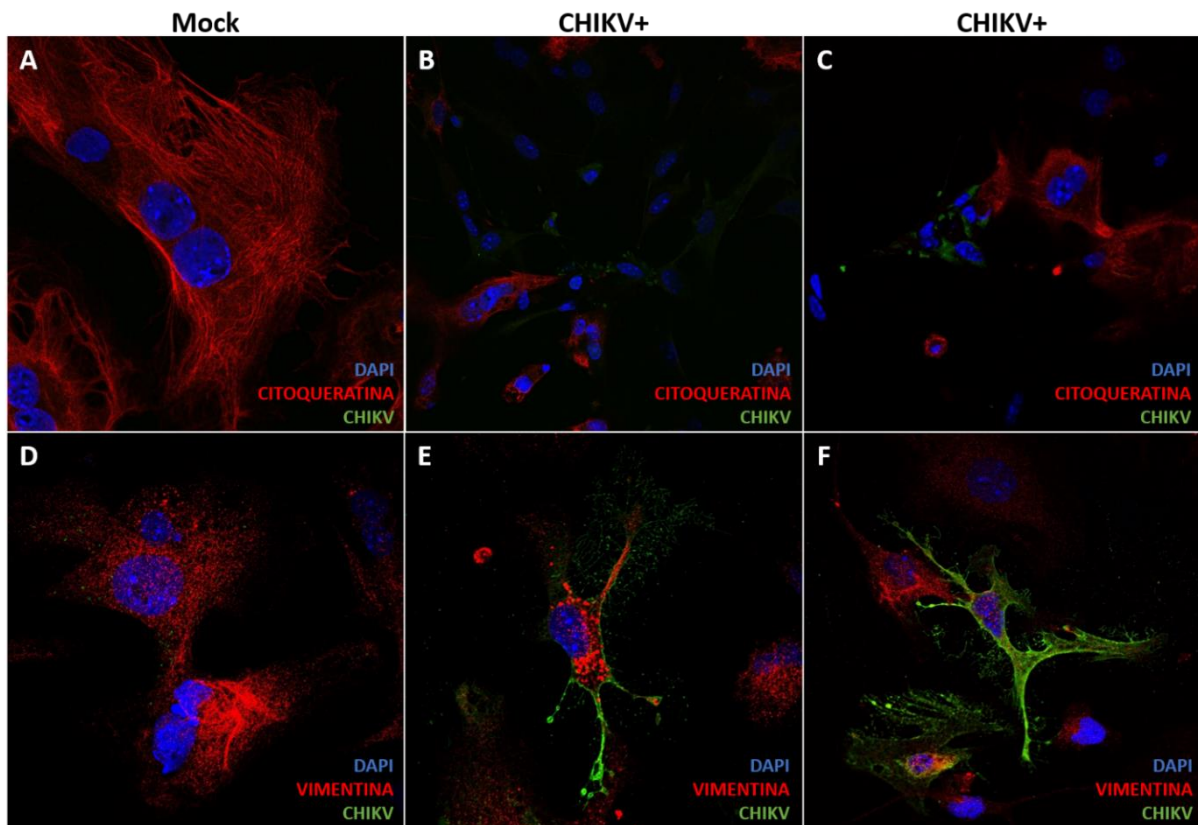


Figura 2: Infecção “*in vitro*” de células de placenta de camundongo por CHIKV. Células totais obtidas pela digestão enzimática de tecido placentário de camundongo foram infectadas por CHIKV. Células epiteliais marcadas para citoqueratina não apresentam marcação para o vírus (Figuras 2B e 2C), ao contrário de células mesenquimais marcadas para vimentina e que se mostraram susceptíveis à infecção (Figuras 2E e 2F).

4.2- Genoma e proteínas de CHIKV podem ser detectados no leite de fêmeas BALB/c infectadas durante a gestação ou amamentação

Para avaliar a presença de genoma, antígenos e partículas virais infecciosas de CHIKV no leite, fêmeas BALB/c foram infectadas no 10.5^o dia gestacional. Após decorridos 5 dias do nascimento, neonatos recém-alimentados foram sacrificados e tiveram o leite coletado diretamente do estômago. A presença de genoma viral foi confirmada por PCR, assim como antígenos virais foram detectados por Western Blot (Figura 3). Após marcação com anticorpos policlonais direcionado às proteínas de CHIKV, foi possível observar a presença de bandas correspondentes as poliproteínas estrutural e não estrutural de CHIKV (Figura 3A, assim como para as proteínas do envelope E1 e E2 (Figura 3B). Apesar da detecção de genoma e proteínas

virais de CHIKV nessas amostras, não foi possível isolar partículas infecciosas em culturas de células Vero.

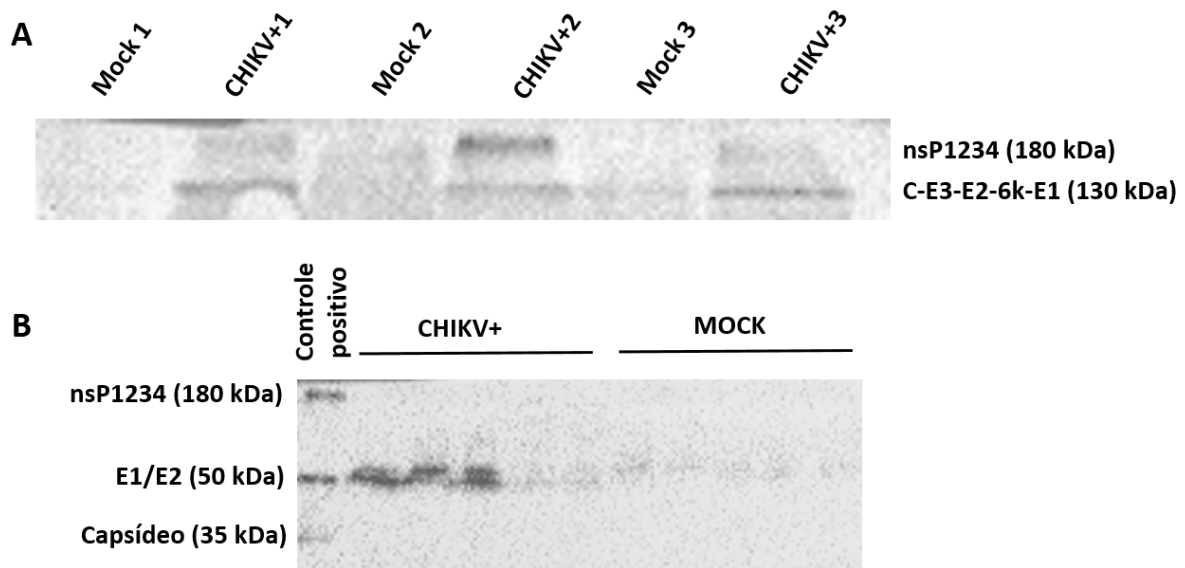


Figura 3: Detecção de proteínas virais de CHIKV em leite de camundongos. As amostras de leite coletadas dos estômagos dos neonatos foram processadas e analisadas por Western Blot com anticorpo anti-proteínas estruturais e anticorpo anti-nsP1 de CHIKV. (A) Bandas de 130 e 180 kDa (pesos moleculares correspondentes aos das poliproteínas estrutural e não estrutural de CHIKV) foram observadas em todos os animais analisados. (B) A maioria das amostras de animais amamentados em fêmeas infectadas também continha as proteínas estruturais do envelope E1 e E2.

4.3- O tecido mamário é um sítio de replicação de CHIKV

Para avaliar se as glândulas mamárias são sítios de infecção e replicação de CHIKV, as fêmeas infectadas durante a gestação foram sacrificadas e as glândulas mamárias cervicais, torácicas, abdominais e inguinais foram coletadas e processadas separadamente. Parte desses tecidos foram submetidos à extração de RNA para detecção de genoma viral. Assim como mostrado na figura 4, o genoma de CHIKV foi detectado por PCR, mas curiosamente com maior frequência nas glândulas superiores, um fato ainda não explorado nesse trabalho.

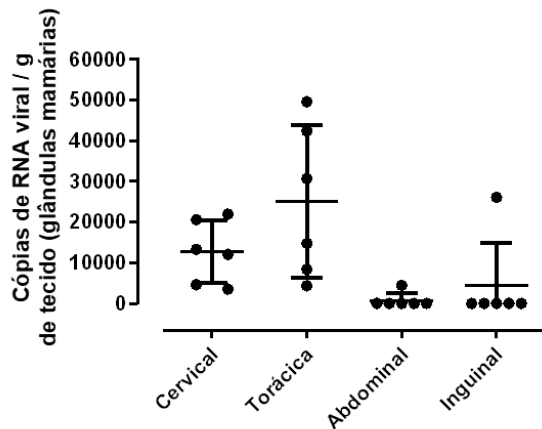


Figura 4: Detecção molecular de CHIKV em glândulas mamárias de camundongo. As glândulas mamárias cervicais, torácicas, abdominais e inguinais de fêmeas controle e infectadas por CHIKV-595 foram coletadas para detecção molecular do vírus. O genoma viral foi detectado por RT-qPCR apresentando maior frequência de positividade e carga viral mais alta nas glândulas cervicais e torácicas.

Para avaliar se há replicação de CHIKV nesse tecido, fêmeas foram infectadas da mesma forma com um vírus obtido por genética reversa e que expressa a proteína fluorescente m-Cherry associada com a proteína viral não estrutural 3 (nsP3). As glândulas foram coletadas 10 dias após o nascimento dos filhotes e cortadas em fatias de 100 μ m de espessura, as quais foram avaliadas por microscopia confocal para detecção de fluorescência. Como mostrado na Figura 5, a proteína m-Cherry pôde ser detectada nos tecidos, tanto no interior de células quanto na luz das glândulas secretórias.

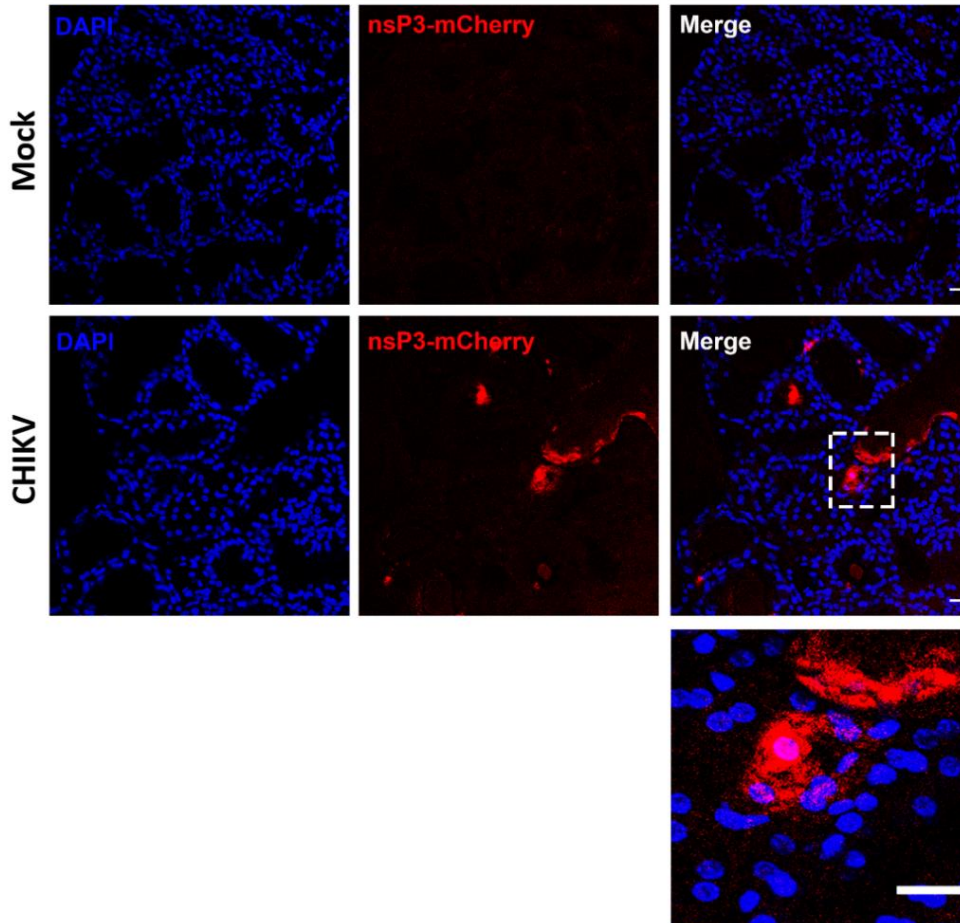


Figura 5: Evidência de replicação de CHIKV em glândulas mamárias de camundongo. Glândulas mamárias de camundongos fêmeas BALB/c infectadas com CHIKV-595 foram avaliadas por microscopia confocal de fluorescência para detecção da proteína mCherry.

4.4- A amamentação em fêmeas BALB/c infectadas induz a formação de uma resposta imune contra CHIKV nos neonatos

Para avaliar o impacto da excreção de antígenos virais no leite, foi proposto um experimento, esquematizado detalhadamente na Figura 6. Sete grupos de animais em condições diferentes foram analisados com relação ao perfil de resposta imune contra CHIKV. Camundongos nascidos e amamentados em fêmeas mock (G1), fêmeas infectadas por CHIKV no 10,5^o dia gestacional (G2) e fêmeas infectadas durante a lactação (G5) foram mantidos após o nascimento, assim como camundongos nascidos de fêmeas infectadas e amamentados em fêmeas mock (G3) e vice-versa (G4). Um grupo de fêmeas foi infectado com vírus inativado por luz ultravioleta (G6) e, por último, um grupo de fêmeas foram infectadas durante a primeira gestação e a prole da segunda gestação foi analisada sem uma nova reinfecção.



Figura 6: Desenho experimental: avaliação da imunidade contra CHIKV em camundongos nascidos e/ou amamentados em fêmeas infectadas. Foram analisados 7 grupos para avaliar os efeitos da gestação e amamentação na indução de imunidade humoral e celular. Os grupos G1 e G2 representam animais nascidos e amamentados em fêmeas mock e infectadas, respectivamente. As fêmeas dos grupos G3 e G4 foram infectadas com CHIKV infeccioso e mock, respectivamente, durante a gestação, mas tiveram suas proles trocadas no primeiro dia após o nascimento. As fêmeas do grupo G5 foi infectada

no primeiro dia após o parto. Foi utilizado um controle de fêmeas infectadas com CHIKV inativado por UV em um sexto grupo denominado G6. Já o grupo G7 foi composto por camundongos nascidos de uma segunda gestação de fêmeas que foram infectadas uma única vez na primeira gestação.

A presença de anticorpos neutralizantes nos animais foi avaliada por ensaio de neutralização em células Vero. Os resultados deixam claro que apenas os grupos amamentados em fêmeas infectadas possuem imunidade humoral contra CHIKV (Figura 7). O grupo G3 é essencial para afirmar esse dado, visto que são animais que possuem anticorpos neutralizantes no soro, mas nasceram de fêmeas mock. Esse grupo também exclui qualquer possibilidade de se estar detectando IgG transferido pela via transplacentária, visto que nasceram de fêmeas não infectadas e, portanto, não são soroconvertidas. Os animais de todos os grupos foram analisados em tempos diferentes, com 30, 60 e 90 dias após o nascimento (Figuras 7A, B e C, respectivamente), e os dados mostram que a produção de anticorpo é consistente ao longo da idade adulta, com perfil de resposta imune ativa. Na figura 7D, é possível observar que a segunda prole de uma fêmea infectada somente na primeira gestação também possui anticorpos neutralizantes.

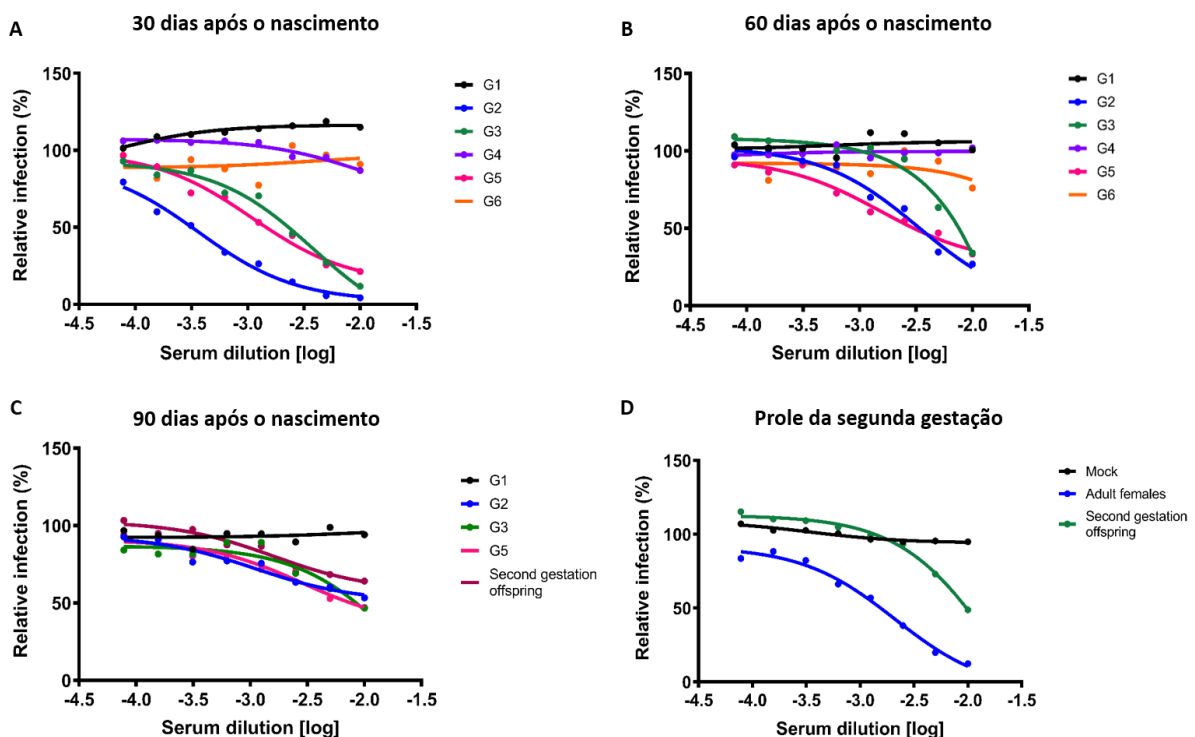


Figura 7: Ensaio de neutralização de CHIKV em células Vero. Os resultados obtidos mostraram que os camundongos amamentados em fêmeas adultas infectadas por CHIKV possuem imunidade

humoral contra o vírus ao longo da vida adulta (G2, G3 G5). Os mesmos animais foram analisados com 30, 60 e 90 dias após o nascimento (Figuras 7A, B e C, respectivamente). Cada ponto da curva equivale à média de uma triplicata biológica.

A exposição a um antígeno viral é caracterizada por uma produção de IgM logo após o contato do sistema imune com o vírus, seguida por uma diminuição nos níveis de IgM e produção de IgG por períodos mais longos. Para avaliar se os animais com resposta humoral contra CHIKV possuem IgG na fase adulta, o soro desses animais foi coletado com 90 dias após o nascimento e utilizado como anticorpo primário em uma imunofluorescência feita com células Vero infectadas. Como observado na figura 8, os animais dos grupos G2, 3 e 5 possuem IgG anti-CHIKV, visto que foi utilizado um anticorpo secundário específico para cadeias leves e pesadas de IgG de camundongos.

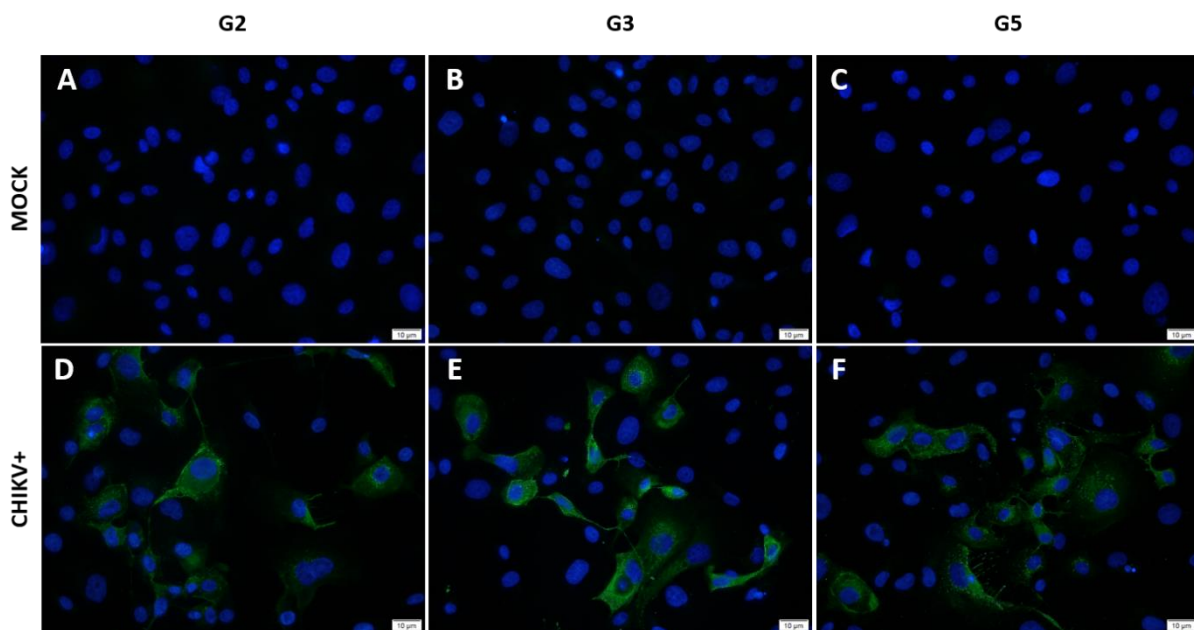


Figura 8: Identificação de IgG contra CHIKV em soro de animais amamentados em fêmeas infectadas. Camundongos amamentados em fêmeas infectadas por CHIKV possuem imunoglobulinas do tipo IgG. Foi realizada uma imunofluorescência em células Vero infectadas por CHIKV utilizando o soro dos animais como anticorpo primário (diluição 1:100) e o secundário Donkey anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (diluição 1:1000). Os núcleos foram marcados com DAPI (diluição 1:1000). É possível identificar fluorescência nas culturas infectadas que foram incubadas com os soros de animais dos três grupos (Figuras 8D, E e F), e as culturas de células Vero infectadas com mock se mantiveram negativas, como esperado.

A resposta celular contra CHIKV foi outro aspecto da resposta imune avaliado nesses animais. Os baços coletados 90 dias após o nascimento foram utilizados para fazer uma cultura de esplenócitos totais, os quais foram cultivados na ausência e presença de CHIKV, inativado ou infeccioso. A proliferação celular foi avaliada por meio de citometria de fluxo com células coradas com CellTrace Violet e marcadas com anticorpos anti-CD4 e CD8. Os resultados mostraram que os mesmos grupos de animais com resposta humoral contra CHIKV também apresentaram proliferação de células TCD4 e TCD8 frente ao estímulo com a infecção “*in vitro*”.

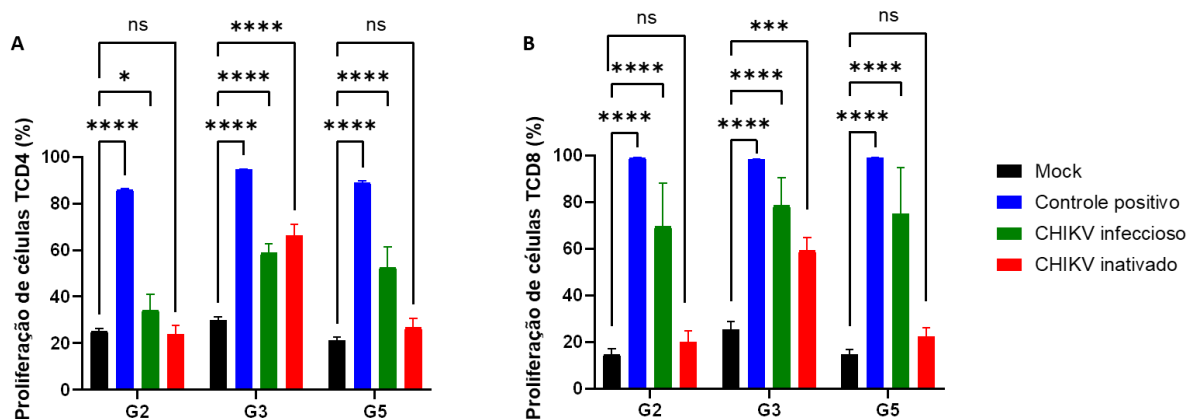


Figura 9: Ensaio de proliferação de células TCD4 e TCD8. Os baços dos animais dos diferentes grupos experimentais foram coletados após decorridos 90 dias do nascimento. Os esplenócitos totais foram cultivados e expostos ao mock, controle positivo de proliferação (anti-CD3 e anti-CD28) e CHIKV infeccioso ou inativado por UV. A análise por citometria de fluxo permitiu concluir que os grupos amamentados em fêmeas infectadas com CHIKV infeccioso possuem células TCD4 (Figura 6A) e TCD8 (Figura 6B) preparadas para exercer uma atividade antiviral celular contra CHIKV.

4.5- Camundongos nascidos e/ou amamentados em fêmeas infectadas por CHIKV são menos susceptíveis à infecção por CHIKV

Após decorridos 90 dias do nascimento dos animais dos grupos G1-G7, 3 camundongos de cada grupo foram submetidos a um desafio com CHIKV para confirmar a efetividade da resposta imune humoral e celular identificadas. A susceptibilidade dos camundongos com relação à infecção por CHIKV foi avaliada por quantificação de carga viral nos cérebros e baços 72 horas após a infecção. Os resultados, mostrados na figura 10, confirmam que a replicação viral nos órgãos dos camundongos amamentados em fêmeas infectadas é reduzida significativamente em relação ao grupo mock. Curiosamente, os animais nascidos de fêmeas

infectadas, mas amamentados em fêmeas mock, também são mais resistentes à infecção viral na idade adulta, apesar de não apresentarem anticorpos neutralizantes e linfócitos TCD4 e TCD8 de memória contra CHIKV nos testes “*in vitro*”. Os animais amamentados em fêmeas infectadas com CHIKV inativado também apresentaram certa redução na dosagem de genoma viral no cérebro, mas não no baço, indicando que a transmissão eficiente de imunidade pode depender de replicação viral e excreção de antígenos virais no leite.

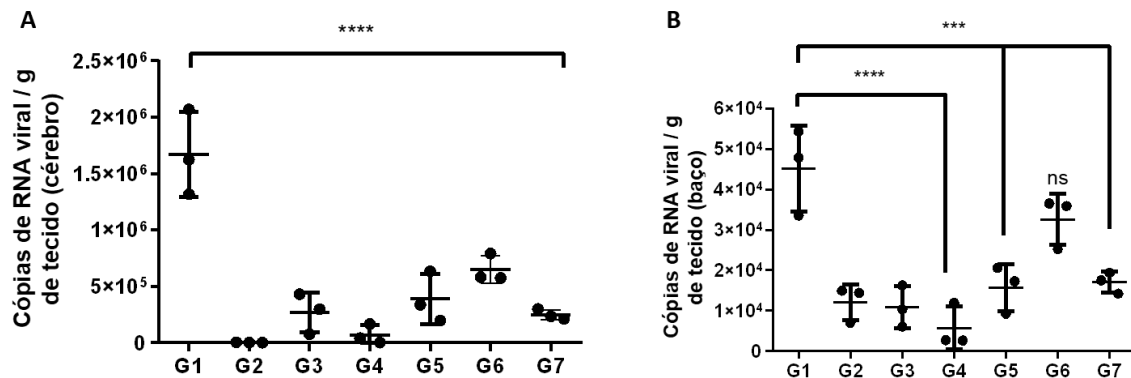


Figura 10: Infecção experimental de camundongos na idade adulta. Os camundongos dos grupos G1 a G7 foram infectados com 10^6 PFU de CHIKV e os cérebros e baços foram coletados 72 horas após a infecção para quantificação de genoma viral. Os resultados mostraram que os animais nascidos e/ou amamentados em fêmeas infectadas por CHIKV tem a susceptibilidade à infecção reduzida.

DISCUSSÃO

5- Discussão

Sabe-se que o CHIKV é transmitido verticalmente em humanos (RAMFUL et al., 2007; GÉRARDIN et al., 2008; SENANAYAKE et al., 2009; SHRIVASTAVA et al., 2011), mas muito pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nessa transmissão e os modelos experimentais adequados ainda não foram desenvolvidos. No presente estudo, um modelo experimental de transmissão vertical do CHIKV foi desenvolvido em camundongos BALB/c, permitindo a confirmação de que a infecção pelo CHIKV no início da gravidez ocorre por transmissão transplacentária, com RNA viral detectado em fetos e placentas. Por outro lado, a infecção no final da gestação não causou transmissão fetal detectável. Os experimentos também mostraram que filhotes nascidos de mães infectadas no início da gravidez podem ter efeitos teratogênicos graves e é possível detectar antígenos virais e isolar vírus infeccioso desses animais. A viabilidade de tal modelo é importante, e apesar da baixa taxa de transmissão vertical observada, o modelo pode ser útil e aperfeiçoado para estudos de patogênese, elucidação de mecanismos de transmissão transplacentária e também para o desenvolvimento e teste pré-clínico de intervenções que podem ser utilizadas para prevenção da infecção fetal.

O conjunto de resultados apresentados neste trabalho aponta que a amamentação pode ser uma importante fonte de componentes que induzem uma resposta imune ativa, celular e humoral, contra o vírus CHIKV. Os resultados mostraram que as glândulas mamárias em camundongos BALB/c são sítios de replicação para este vírus e que antígenos virais são encontrados no leite a curto e longo prazo após a infecção da fêmea adulta. Mais importante, esse evento tem um impacto na susceptibilidade dos camundongos à infecção por CHIKV na idade adulta, mostrando que a imunidade gerada é efetiva e de longa duração.

Não se sabe ainda quais os componentes que estão associados à essas proteínas virais e que permitiriam o reconhecimento dos antígenos pelo sistema imune do trato gastrointestinal do neonato. Essa importante pergunta será investigada pelo nosso grupo de pesquisa, avaliando como se dá a apresentação dos antígenos virais ao lactente. É preciso também considerar a hipótese da ocorrência de um evento denominado microquimerismo. Alguns trabalhos já publicados mostraram que existe um repertório de células do sistema imune materno presentes no leite, e a atividade dessas células não está restrita apenas ao lúmen do trato gastrointestinal. Essas células são capazes de atravessar o epitélio do recém-nascido, atingir a corrente sanguínea, migrar e se estabelecer em alguns órgãos linfoides. Como exemplo disso, já foi mostrado que células secretoras de IgG no leite materno de camundongos podem se estabelecer no baço do lactente, assim como células T citotóxicas e células TCD4⁺ MHCII⁺ são capazes de

atingir placas de Peyer e o timo, respectivamente (ARVOLA *et al.*, 2000; CABINIAN *et al.*, 2016; GHOSH *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos neste projeto com modelos animais podem ter grande impacto no entendimento da imunidade de neonatos, incluindo com incentivo à amamentação, abrindo caminhos para uma linha de pesquisa inovadora. Os resultados obtidos até o momento serão a base para futuras investigações translacionais com o objetivo desvendar se esse evento também ocorre em humanos. Ao passo que os mecanismos de indução da resposta imune estiverem elucidados no modelo animal, também poderão ser consideradas pesquisas sobre abordagens de imunização via oral em neonatos.

Existe ainda a necessidade de avaliar se este fenômeno ocorre para outros vírus ou se é exclusivo da biologia de CHIKV. Diversos trabalhos têm mostrado a excreção de vírus em leite, infecciosos ou não, mas os impactos dessa excreção ainda são voltados à verificação de transmissão vertical perinatal por leite materno. Nesse sentido, o presente trabalho traz resultados inéditos e que abrirão caminhos para avaliar o impacto de outros vírus no leite materno sobre o sistema imune do lactente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Células trofoblásticas humanas são susceptíveis à infecção por ZIKV e CHIKV e sofrem alterações na expressão de miRNAs em decorrência da infecção.

A proteína CREBRF pode ser um alvo importante de miRNAs em células trofoblásticas e sua regulação negativa pode exercer um fator pró-viral para ZIKV e antiviral para CHIKV.

A transmissão vertical transplacentária ocorre em camundongos BALB/c e a infecção de fêmeas no início da gestação pode induzir efeitos teratogênicos graves nos fetos.

Camundongos amamentados em fêmeas infectadas por CHIKV desenvolvem imunidade ativa humoral e celular contra CHIKV e são menos susceptíveis à infecção por esse vírus na idade adulta.

As glândulas mamárias de camundongos BALB/c são sítios de replicação de CHIKV e o leite desses animais é uma fonte de antígenos virais que são transmitidos aos neonatos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- 1- AAGAARD, K. M. *et al.* Primary human placental trophoblasts are permissive for Zika virus (ZIKV) replication. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-14, 2017.
- 2- AGARWAL, V. *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, v. 4, p. 1-38, 2015.
- 3- ARVOLA, M. *et al.* Immunoglobulin-secreting cells of maternal origin can be detected in B cell-deficient mice. **Biology of reproduction**, v.63, n.6, p.1817-1824, 2000.
- 4- BALLARD, A.; MORROW, A. L. Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics of North America**, v. 60, p. 49-74, 2013.
- 5- BAVIA, L. *et al.* A glance at subgenomic flavivirus RNAs and microRNAs in flavivirus infection. **Virology journal**, v. 13, n. 84, p. 1-20, 2016.
- 6- BESNARD, M. *et al.* Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill**, p. 1-4, 2014.
- 7- CAMPOS, A. L. R. *et al.* Tools for sequenced-based miRNA target prediction. **International journal of molecular sciences**, v. 17, p. 1-18, 2016.
- 8- CABINIAN, A. *et al.* Transfer of maternal immune cells by breastfeeding: maternal cytotoxic T lymphocytes present in breast milk localize in the Peyer's patches of the nursed infant. **Plos one**, p.1-18, 2016.
- 9- CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity. **Journal of the History of Medicine and Allied Sciences**, v. 26, n. 3, p. 243-262, 1971.
- 10- CARLIN, A. F. *et al.* Deconvolution of pro- and antiviral genomic responses in Zika virus-infected and bystander macrophages. **PNAS**, v. 115, n. 39, p. 9172-9181, 2018.
- 11- CAO, B. *et al.* Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. **The journal of experimental medicine**, v. 214, n. 8, p. 2303-2313, 2017.
- 12- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annual Review in Microbiology**, v. 44, p. 649-688, 1990.
- 13- CHIUPPESI, F. *et al.* Vaccine-derived neutralizing antibodies to the human cytomegalovirus gH/gL pentamer potently block primary cytotrophoblast infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 23, p. 11884-11898, 2015.
- 14- CONTOPOULOS-IOANNIDES, D. *et al.* Mother-to-child transmission of Chikungunya virus: a systematic review and meta-analysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, p.1-20, 2018.

- 15- CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, p. 1-15, 2016.
- 16- DAS, T. *et al.* Chikungunya fever: CNS infection and pathologies of a re-emerging arbovirus. **Progress in Neurobiology**, v. 91, n. 2, p. 121-129, 2009.
- 17- DELORME-AXFORD, E. *et al.* Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. **PNAS**, v. 110, n. 29, p. 12048-12053, 2013.
- 18- DICK GW, KITCHEN SF, HADDOW AJ. Zika virus: Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509-520, 1952.
- 19- DONKER, R. B. *et al.* The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. **Molecular Human Reproduction Journal**, v. 18, p. 417-424, 2012.
- 20- DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap island, federated states of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
- 21- ECONOMOPOULOU, A. *et al.* Atypical Chikungunya virus infections: Clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. **Epidemiology & Infection**, v.137, n.4, p.534-541, 2009.
- 22- EVANS-GILBERT, T. Vertically transmitted Chikungunya, Zika and Dengue virus infections: the pathogenesis from mother to fetus and the implications of co-infections and vaccine development. **International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine**, v.7, p.107-111, 2020.
- 23- FAN, Y. *et al.* miRNet – dissecting microRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis. **Nucleic acids research**, v. 44, p. 135-141, 2016.
- 24- FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas – Yet another arbovirus threat. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n.7, p. 601-604, 2016.
- 25- GÉRARDIN, P. *et al.* Multidisciplinary prospective study of mother-to-child Chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLOS Medicine**, v. 5, p. e60, 2008.
- 26- GHOSH, M. K. *et al.* Maternal milk T cells drive development of transgenerational Th1 immunity in offspring thymus. **Journal of immunology**, v.197, n.6, p.2290-2296, 2016.
- 27- GREGORY, C. J. *et al.* Models of transmission of Zika virus. **Journal of infectious diseases**, p. 875-883, 2017.

- 28- HAMMOND, S. M. An overview of microRNAs. **Advanced drug delivery reviews**, p. 1-30, 2016.
- 29- HONGPAISAN, J. Inhibition of proliferation of contaminating fibroblasts by D-valine in culture of smooth muscle cells from human myometrium. **Cell Biology International**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.
- 30- HU, Y. L. HOXA9 regulates miR-155 in hematopoietic cells. **Nucleic Acids Research**, v. 14, n. 1, p. 1-7, 2010.
- 31- HUANG, H. Y. *et al.* miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA-target interaction database. **Nucleic acids research**, v. 48, p. 148-154, 2019.
- 32- IRELAND, D. D. C. *et al.* Long-term persistence of infectious Zika virus: inflammation and behavioral sequela in mice. **Plos pathogens**, v. 16, n. 12, p. 1-26, 2020.
- 33- KING, A. *et al.* Cell culture models of trophoblast II: Trophoblast cell lines – A workshop report. **Placenta**, v. 21, supplement A; **Trophoblast Research**, v. 14, S113 – S119, 2000.
- 34- KOZOMARA, A. *et al.* miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. 155-162, 2019.
- 35- KUMMERER, B. M. *et al.* Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. **Journal of general virology**, v. 93, p. 1991-1995, 2012.
- 36- KUNO, G. *et al.* Phylogeny of the genus Flavivirus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73-83, 1998.
- 37- KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 1, p. 687-696, 2007.
- 38- LACKEY, K. A. SARS-CoV-2 and human milk: What is the evidence? **Maternal and child nutrition**, v. 16, p. 1-12, 2020.
- 39- LANGMEAD, B. *et al.* Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. **Genome Biology**, v. 10, p. 1-10, 2009.
- 40- LAWRENCE, R. M; LAWRENCE, R. A. Breast milk and infection. **Clinics in perinatology**, v. 31, p. 501-528, 2004.
- 41- LENGKET, Y. *et al.* Chikungunya infection in pregnancy: evidence for intrauterine infection in pregnant women and vertical transmission in the parturient. *Survey Reunion*

- Island outbreak. **Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction**, v.35, n.6, p.578-583, 2006.
- 42- LI, L.; SCHUST, D. J. Isolation, purification and “*in vitro*” differentiation of cytotrophoblast cells from human term placenta. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, n.71, p. 1-9, 2015.
- 43- LI, X. F. Complete genome sequence of a Chikungunya virus isolated in Guangdong, China. **Journal of Virology**, v. 86, n. 16, p. 8904-8905, 2012.
- 44- MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet.journal**, v. 17, n. 1, p. 10-12, 2011.
- 45- MARTINS, M. M. Zika virus in Brazil and worldwide: a narrative review. **Pediatrics and international child health**, p. 1-8, 2020.
- 46- MCCONKEY, C. A. *et al.* A three dimensional culture system recapitulates placental syncytiotrophoblast development and microbial resistance. **Microbiology**, v. 2, p. 1 – 9, 2016.
- 47- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue e febre de chikungunya até a semana epidemiológica 15, 2015. Acesso em 28 de novembro de 2016. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/maio/04/2015-016---Boletim-Dengue-SE15-2015.pdf>
- 48- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 37, 2016. Acesso em 12 de dezembro de 2016. Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/outubro/18/2016-029-Dengue-publicacao-n-34.pdf>.
- 49- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes* (Dengue, Chikungunya e Zika), semanas epidemiológicas de 1 a 52, 2020. Acesso em 19 de dezembro de 2020. Disponível em <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>
- 50- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes aegypti* (Dengue, Chikungunya e Zika) semanas epidemiológicas de 1 a 32, 2020. Acesso em 19 de dezembro de 2020. Disponível em

<https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/31/Boletim-epidemiologico-SVS-34.pdf>

- 51-MLAKAR, J. *et al.* Zika virus associated with microcephaly. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951-958, 2016.
- 52-MORALES-PRIETO, D. M. *et al.* MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. **Placenta**, v. 33, p. 725 – 734, 2012.
- 53-POWERS, A. M. *et al.* Reemergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 2, p. 471-479, 2000.
- 54-QUICKE, K. M. *et al.* Zika virus infects human placental macrophages. **Cell Host & Microbe**, v. 20, p. 83-90, 2016.
- 55-RAPER, J. *et al.* Long-term alterations in brain and behavior after postnatal Zika virus infection in infant macaques. **Nature communications**, v. 11, p. 1-12, 2020.
- 56-RAMFUL, D. *et al.* Mother-to-child transmission of Chikungunya virus infection. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 26, p. 811-815, 2007.
- 57-RAUSALU, K. *et al.* Chikungunya virus infectivity, RNA replication and non-structural polyprotein processing depend on the nsP2 protease's active site cysteine residue. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-17, 2016.
- 58-ROSS, R. W. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **The Journal of Hygiene (Lond)**, v. 54, n. 2, p. 177-191, 1956.
- 59-ROUHA, H. *et al.* Functional microRNA generated from a cytoplasmic RNA virus. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 22, p. 8328-8337, 2010.
- 60-SENANAYAKE, M. P. *et al.* Vertical transmission in Chikungunya infection. **Ceylon Medical Journal**, v. 54, p. 47-50, 2009.
- 61-SECTION ON BREASTFEEDING. Breastfeeding and the use of human milk. **Pediatrics**, v. 129, n. 3, p. e827–41, 2012.
- 62-SHAPIRO, J. S. *et al.* Evidence for a cytoplasmic microprocessor of pri-miRNAs. **RNA**, v. 18, p. 1338-1346, 2012.
- 63-SHRIVASTAVA, A. *et al.* Management of a vertically transmitted neonatal Chikungunya thrombocytopenia. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 78, p. 1008-1009, 2011.

- 64- SORIANO-ARANDES, A. *et al.* What we know and what we don't know about perinatal Zika virus infection: a systematic review. **Expert Rev Anti Infect Ther**, p. 243-254, 2018.
- 65- STOCKHOLM: EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2015. Rapid risk assessment: Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome. Acesso em 3 de dezembro de 2016 <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-virus-americas-association-with-microcephalyrapid-risk-assessment.pdf>.
- 66- SOUZA, I. N. O. *et al.* Late neurological consequences of Zika virus infection: risk factors and pharmaceutical approaches. **Pharmaceuticals**, v. 12, n. 60, p. 1-21, 2019.
- 67- TABATA, T. *et al.* Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. **Cell Host & Microbe**, v. 20, p. 1-12, 2016.
- 68- TANG, H. *et al.* Zika virus infects human cortical neural progenitors and attenuates their growth. **Cell stem cell**, v. 18, p. 1-4, 2016.
- 69- TESH, R. B. Arthritides caused by mosquito-borne viruses. **Annual Review of Medicine**, v. 33, p. 31-40, 1982.
- 70- TRIBOULET, R. *et al.* Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. **Science**, v. 315, n. 5818, p. 1579-1582, 2007.
- 71- van den Pol, A. N. *et al.* Zika virus targeting in the developing brain. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 8, p. 2161-2175, 2017.
- 72- VEJNAR, C. E. *et al.* mirMap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 22, p. 11673-11683, 2012.
- 73- WEAVER, S. C. Arrival of Chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2921, 2014.
- 74- WINGETT, S.W.; ANDREWS, S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. **F1000Research**, v. 7, n. 1338, p. 1-13, 2018.
- 75- WONG, N. *et al.* miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. **Nucleic acids research**, v. 43, p. 146-152, 2014.
- 76- ZHANG, S. *et al.* Chloroquine inhibits endosomal viral RNA release and autophagy-dependent viral replication and effectively prevents maternal to fetal transmission of Zika virus. **Antiviral research**, v. 169, p. 1-8, 2019.

ANEXOS



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Transmissão transplacentária de arbovírus brasileiros em humanos

Pesquisador: Juliano de Paula Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 90357018.4.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.748.420

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa avaliar se a infecção pelos arbovírus ZIKV, CHIKV e OROV altera a expressão desses microRNAs em células trofoblásticas humanas, bem como avaliar se os exossomos secretados por essas células possuem atividade antiviral contra os arbovírus ZIKV, CHIKV e OROV.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar alterações no transcriptoma de microRNA em culturas primárias de células trofoblásticas infectadas "in vitro" por ZIKV, CHIKV e OROV e investigar a participação de microRNAs de células trofoblásticas na regulação de uma resposta protetora contra infecção por esses três arbovírus em linhagens celulares de mamíferos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A pesquisa não oferece riscos para as doadoras de placenta ou para o recém-nascido, pois serão utilizados apenas fragmentos de placenta que seriam descartados após o parto. As amostras de placenta serão devidamente transportadas para o laboratório de Patogênese Viral do Centro de Pesquisa em Virologia (FMRP/USP) e processadas de acordo com as normas de biossegurança para manipulação de material biológico.

Benefícios: As infecções placentárias por arbovírus são ainda muito pouco estudadas, e os mecanismos moleculares e vias relacionadas com a teratogênese não são completamente entendidos. Portanto, o presente projeto visa investigar os efeitos da infecção por ZIKV, CHIKV e OROV em células de placenta humana, com ênfase especial no papel do transcriptoma de miRNAs.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 2.748.420

e nas vias alteradas durante a infecção viral. Portanto, esse estudo se trata de uma avaliação da biologia básica dos mecanismos celulares e moleculares da transmissão transplacentária desses arbovírus, gerando conhecimento para sustentar pesquisas aplicadas no desenvolvimento de intervenções terapêuticas (vacinas e antivirais, entre outros) que impeçam esse tipo de transmissão durante a infecção de uma gestante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Devido a características geográficas e ambientais, o Brasil é um país propício à propagação de diversos arbovírus que infectam o homem, especialmente aqueles transmitidos pela picada de insetos urbanos como *Aedes aegypti* e *Culicoides paraensis*. Exemplo recente disso foi a emergência do vírus Zika (ZIKV), que se disseminou rapidamente pelo continente americano, com especial impacto no Brasil, pela ocorrência de síndromes congênitas, incluindo microcefalia. Outros arbovírus de grande importância epidemiológica no Brasil são Chikungunya (CHIKV) e Oropouche (OROV). Dados da literatura já documentaram a transmissão vertical e efeitos teratogênicos induzidos por ZIKV e CHIKV em seres humanos, e observações feitas durante epidemias de OROV sugerem que há transmissão vertical resultando em aborto espontâneo em mulheres infectadas no início da gestação. No entanto, muito ainda precisa ser estudado no que se refere à infecção congênita transplacentária e a teratogênese causada por esses vírus. Já foi demonstrado que microRNAs secretados via exossomos por células trofoblásticas da placenta são capazes de inibir infecção por certos vírus de DNA e RNA. No presente projeto, é proposta a avaliação de alterações no transcriptoma de miRNA de células trofoblásticas infectadas "in vitro" por ZIKV, CHIKV, OROV e outros arbovírus de ocorrência no Brasil, utilizando sequenciamento em larga escala. Também será realizado o estudo de como a inibição da produção de exossomos de placenta alteram a susceptibilidade e permissividade das células a esses vírus. Paralelamente, exossomos derivados de células trofoblásticas serão purificados e usados para tratar células de diversas linhagens em cultura, para analisar seus efeitos antivirais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 2.748.420

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_709118.pdf	25/05/2018 13:37:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	25/05/2018 13:36:51	Juliano de Paula Souza	Aceito
Orçamento	Aprovacao_de_orcamento_UPC.pdf	23/05/2018 01:24:49	Juliano de Paula Souza	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	20/05/2018 03:29:11	Juliano de Paula Souza	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	20/05/2018 02:59:06	Juliano de Paula Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/05/2018 02:44:01	Juliano de Paula Souza	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	05/02/2018 11:29:30	Juliano de Paula Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 02 de Julho de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: “*Avaliação da transmissão vertical transplacentária e pós-natal do vírus Chikungunya em modelo animal de camundongos BALB/c*”, registrado com o número do protocolo **112/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 29 de março de 2021.

Colaboradores: Juliano de Paula Souza

Thais Melquiades de Lima

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade			() Ensino (X) Pesquisa Científica	
Vigência da autorização			29/03/2021 a 01/05/2022	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso/Idade	Sexo	Origem
Camundongo / Balb c	30	20g / 45 dias	Fêmea	Serviço de Biotério
Camundongo / Balb c	06	25g / 45 dias	Macho	Serviço de Biotério

Ribeirão Preto, 29 de março de 2021

Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP