

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Franciele Martins Santos Estevez

**O PAPEL DO EIXO CCL2-CCR2 NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS
MAYARO**

Belo Horizonte
2022

Franciele Martins Santos Estevez

**O PAPEL DO EIXO CCL2-CCR2 NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS MAYARO**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Vivian Vasconcelos Costa

Coorientador: Dr. Celso Martins Queiroz Junior

Belo Horizonte
2022

043

Estevez, Franciele Martins Santos.

O papel do eixo CCL2-CCR2 na patogênese da infecção pelo vírus Mayaro [manuscrito] / Franciele Martins Santos Estevez. – 2022.

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

Orientadora: Dra. Vivian Vasconcelos Costa. Coorientador: Dr. Celso Martins Queiroz Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Osteogênese. 3. Reabsorção Óssea. 4. Inflamação. 5. Quimiocina CCL2. 6. Receptores CCR2. 7. Infecções por Alphavirus. I. Costa, Vivian Vasconcelos. II. Queiroz Junior, Celso Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE FRANCIELE MARTINS SANTOS

247/2022 _ ENTRADA 1º/2018 _ 2018697522

Às dez horas do dia 18 de maio de 2022, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**O PAPEL DO EIXO CCL2-CCR2 NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO DO VÍRUS MAYARO**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Vivian Vasconcelos Costa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Vivian Vasconcelos Costa	UFMG	APROVADA
Dr. Flávio Almeida Amaral	UFMG	APROVADA
Dr. Thiago Moreno L. Souza	Fiocruz/RJ	APROVADA
Dr. Renato Santana de Aguiar	UFMG	APROVADA
Dra. Sandra Y Fukada	USP/Ribeirão Preto	APROVADA
Dr. Celso Martins Queiroz Júnior	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 18 de maio de 2022.**

Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa (Orientadora)

Dr. Flávio Almeida Amaral

Dr. Thiago Moreno L. Souza

Dr. Renato Santana de Aguiar

Drª. Sandra Y Fukada

Dr. Celso Martins Queiroz Júnior

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Yasuyo Fukada Alves, Usuário Externo**, em 20/05/2022, às 06:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Almeida Amaral, Professor do Magistério Superior**, em 20/05/2022, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 20/05/2022, às 10:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celso Martins Queiroz Junior, Membro de comissão**, em 20/05/2022, às 10:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 20/05/2022, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 20/05/2022, às 14:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Moreno Lopes e Souza, Usuário Externo**, em 25/05/2022, às 09:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1469904** e o código CRC **1B1A9742**.

Dedico esta tese à meu amado esposo Carlos e nossa família, que com muito amor, paciência e alegria me ajudam a buscar e realizar os sonhos de Deus. À minha mãe Neuza Aparecida, uma professora admirável, que com seu amor e exemplo sempre me incentivou a buscar o melhor e acreditar em mim. À meu pai José Francisco, por todo amor e apoio e à minha irmã Marina, pelo seu amor, amizade e companheirismo que foi a minha força ao longo da minha jornada profissional.

AGRADECIMENTOS

Neste pequeno espaço quero demonstrar a minha eterna gratidão a estes quatro anos do doutorado.

Mas antes iniciar meus agradecimentos, quero primeiramente partilhar com você a riqueza deste doutorado, que está muito além de ter chegado ao fim e alcançado o título. A beleza desses quatro anos eu desfrutei dia após dia, porque me ensinaram que a beleza de qualquer trajetória está ao longo do caminho. Por isso, pare, respire, olhe e aprecie o seu caminho. Ao descobrir isso, deixamos de viver apenas por um título ou para um grande dia, pois compreendemos que é no ordinário e nas coisas simples da nossa vida, que o extraordinário acontece. Valorize a sua rotina e não espere por grandes dias, pois só temos o hoje para ser feliz (aprendi isso com dois padres muito queridos, padre Célio de 93 anos e padre Samuel de 28 anos).

Não estou diminuindo a grandeza e a importância do título de doutora, apenas o ressignifiquei. Assim, quando olhar para ele me recordarei que muitas pessoas, momentos e acontecimentos fizeram parte dele e o tornaram mais especial. Posso dizer com toda certeza que foram os anos mais difíceis e mais belos da minha vida. Bem contraditório, não? Não! Pois, mar manso não faz marinheiro forte. E é no fogo que o ouro é provado.

Esses quatro anos de pós-graduação foram para mim uma jornada longa e árdua de reconstrução e construção na minha história, que só foi possível graças ao amor e misericórdia de Deus. A reconstrução ocorreu no meu interior, onde muita coisa precisou ser destruída para que uma nova Fran pudesse nascer, pois assim disse Jesus: “Necessário vos é nascer de novo” (Jo 3, 7). Já a construção, é tudo o que pela graça de Deus eu conquistei aqui em Belo Horizonte: amizades, relações profissionais, uma nova casa, um grupo de oração, uma comunidade, artigos e esta tese. Não me limitei apenas a construção de artigos científicos e uma tese, ultrapassei o objetivo único e inicial que me trouxe até aqui. Por isso, vá além dos muros, dos limites, mas não pensando apenas no sucesso, pelo contrário, ultrapasse-os para se permitir ser o lugar de encontro do outro com o amor e o acolhimento.

Agradeço,

À Deus pai, pelo seu grande amor, cuidado e proteção. Por sempre me conduzir e me dá a graça de sonhar e realizar os sonhos Dele na minha vida.

“A vossa bondade e misericórdia hão de seguir-me

Por todos os dias de minha vida.

E habitarei na casa do Senhor por longos dias”.

(Salmo 23, 6)

À *Jesus*, pela sua infinita misericórdia, amizade e presença. Agradeço por cada encontro no sacramento da comunhão e nas tardes no santíssimo. A cada encontro, o Teu amor me curou, me transformou e me fez uma nova criatura.

À *Nossa Senhora*, minha mãe, pelo seu cuidado e intercessão. Ela que sempre me protegeu e cuidou de todos os detalhes da minha vida.

À *minha mãe Neuza Aparecida*, um exemplo extraordinário de mãe, mulher e profissional, que com o seu amor, cuidado e conselhos me impulsionou a crescer e sempre me fez acreditar que podemos aprender tudo o que queremos.

À *meu pai José Francisco*, pelo seu amor e apoio. Do seu jeito e modo de ver a vida, bem diferente mim, sempre me ensinou que a vida não tem que ter pressa e a importância de viver o hoje e cada momento como se fosse o último.

À *minha irmã Marina*, carinhosamente Mama. O fato de sermos irmãs não nos forçou a sermos melhores amigas. Aprendemos nas dificuldades do dia-a-dia e decidimos sermos a melhor amiga e companheira uma da outra. Obrigada pelo seu SIM, pelo seu amor, sua presença, força e por tornar tudo tão divertido.

Ao *amado esposo Carlos*, por todo seu amor e cuidado. Você chegou no tempo certo e tudo ficou melhor depois que você chegou.

À *toda minha família*, os Martins e os Santos. Aqui eu incluo meus tios, tias, primos, primas, avós e avôs. A todos eles, eu agradeço as orações, torcida e principalmente pelos momentos que passamos juntos.

A *minha amiga Pri*, que esteve comigo desde o início e sempre me foi muito cuidadosa e atenciosa comigo, mesmo quando eu não conseguia me fazer presente. Agradeço também aos pais dela que sempre me acolheram como muito amor na casa deles. Obrigada por essa amizade que nasceu pela nossa fé.

Aos meus amigos Grazi, Sílvio e Gu, uma família linda, que sempre me acolhem muito amor da casa deles. Obrigada Gra pela amizade, pelas comidas deliciosas, carinho, conversas, força e orações.

A minha amiga, afilhada, coach e agora mamãe do Davi, Nanda. Obrigada por todas as conversas e pelos os conselhos cheios de sabedoria.

Aos meus amigos, Lay, Rosa, Josi, Aneli, Raissa por sempre se fazerem presentes com uma palavra, ligação, carinho e oração. Vocês estão no meu coração!

Ao grupo de oração Nossa Senhora das Graças, que me acolheu com muito amor e carinho. Em especial, agradeço a meninas do núcleo: Grazi, Nanda, Bela, Dani, Lili, Olga, Klélia e Bárbara pela amizade, apoio e orações.

Ao meu diretor espiritual padre Samuel, por todas as palavras sábias, conselhos e direcionamento.

As minhas amigas e companheiras de trabalho, Thaianne, Carla, Simone, Brenda e Camila. Obrigada pelo apoio, pelo carinho, pelo choro livre nas varandas do ICB, pelos cafés com chocolate, desabafos, noites de vinhos e pelas as melhores risadas deste doutorado. A presença de vocês tornou tudo mais leve e divertido.

Aos meninos da iniciação científica, Victor e Mateus, que são o bendito é o fruto entre as mulheres. Obrigada meninos por toda dedicação e empenho de vocês em todos os experimentos e atividades realizadas. Resistir em meio a cinco mulheres de temperamento forte (Eu, Thai, Carla, Simone e Vivi) não é foi fácil, mas com certeza os prepararam para qualquer desafio.

*Ao grupo *viviridae*, como o nome diz, uma família. As famílias não são perfeitas, mas os membros de uma família voltados para um propósito maior, deixam de lado as suas diferenças e decidem diariamente a caminharem juntos. E foi isso que vivi neste grupo ao longo destes quatros anos, a missão de crescermos em equipe.*

A Prof. Daniele, ou simplesmente Dani, por me permitir fazer parte da sua equipe e laboratório.

As técnicas Frank, Gil e Ilma, pela dedicação e atenção a nós alunos e aos nossos trabalhos, sempre nos proporcionando um melhor ambiente de trabalho. Agradeço em especial a Frank pela amizade e pelas nossas longas conversas.

Ao LIMHO, o laboratório da prof. Dani, que me acolheu com muito carinho. Como a Dani sempre disse durante esses quatro anos, você é aluna da Vivi, mas pertence ao LIMHO. E é assim que me sinto, parte deste laboratório. Obrigada a todos meus queridos colegas de trabalho do LIMHO.

Ao Celso, meu co-orientador, pela sua orientação, carinho, apoio, conversas e pela parceria ao longo deste tempo. Você foi muito importante para o meu crescimento pessoal e profissional. Que essa parceria seja para a vida!

A Prof^a. Vivian, ou carinhosamente Vivi, minha orientadora. Nossa! Chegamos ao fim desta jornada. Em poucas palavras será difícil expressar a minha gratidão e admiração por você. Vivi, muito obrigada pelo carinho, compreensão, orientação, conselhos e pelas deliciosas conversas na sua sala. Admiro muito a pesquisadora, mulher e mãe que você é e tem se tornado. Com certeza a força é a sua qualidade de maior destaque. Obrigada por ter aceitado me orientar e me ajudado a chegar até aqui hoje.

Ao professor Maurício Nogueira, pelas amostras de vírus concedidas.

Ao professor Pedro Guimarães, por ter nos concedido as nanopartículas de SiRNA.

Aos professores Flávio, Thiago, Renato, Sandra, Sérgio e Vanessa por terem aceitado fazer parte da minha banca de doutorado.

À CAPES, FAPEMIG, CNPq e INCT em dengue por todo o suporte financeiro.

À UFMG e ao ICB pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

*Compreendi que sem o **amor**, todas as obras são nada, mesmo as mais brilhantes."
(Santa Teresinha do Menino Jesus)*

RESUMO

O Vírus Mayaro (MAYV) pertence ao gênero *Alphavirus* e a família *Togaviridae*. O MAYV é responsável por surtos esporádicos de doença febril aguda em países da América do Sul. Os sinais clínicos da febre Mayaro, incluem dor de cabeça, febre, mialgia e artralgia, que pode ser persistente e debilitante. A doença causada pelos alfavírus é classificada como uma imunopatologia, e muitos mediadores inflamatórios têm sido descritos por terem um papel relevante na patogênese desses vírus, incluindo IL-6, TNF e CCL2. Assim, devido ao impacto que a doença do MAYV tem na qualidade de vida das pessoas e ao fato de ser pouco compreendida, o presente trabalho se propôs investigar e elucidar o papel do eixo CCL2-CCR2 na patogênese da infecção pelo Vírus Mayaro. Para isso, foram utilizados camundongos deficientes para as moléculas de interesse e técnica de silenciamento gênico. Inicialmente, foi realizada a padronização de um modelo de infecção por MAYV em camundongos WT C57BL/6 imunocompetentes, e em seguida a caracterização do papel do receptor CCR2 na infecção. Os resultados mostraram que o MAYV induziu uma doença inflamatória aguda, caracterizada por edema, hipernocicepção e miosite nos camundongos WT. O perfil de resposta imune no WT foi caracterizado por aumento na produção de mediadores inflamatórios, como IL-6, TNF, CCL2 e CCL5. Os altos níveis de CCL2 local e sistêmico foram seguidos por um recrutamento significativo de macrófagos CCR2⁺ e uma resposta celular orquestrada por essas células. Camundongos CCR2^{-/-} apresentaram níveis similares de edema, hipernocicepção e miosite quando comparado aos camundongos WT. Porém, mostraram um aumento nos níveis de CXCL1 significativamente diferente dos animais WT, seguido por uma substituição do infiltrado inflamatório de macrófagos por neutrófilos. Por outro lado, embora o silenciamento de *ccl2* não tenha impedido a migração celular e redução do infiltrado inflamatório, ele promoveu uma melhora significativa na hipernocicepção e reduziu expressão de importantes moléculas inflamatórias, como *ccl5*, *ccl7* e *Tnf*. Isto revela que CCL2 e TNF têm um papel relevante na nocicepção induzida pelo MAYV. De forma geral, pode-se concluir que a ausência do receptor CCR2 conferiu proteção aos animais frente à infecção pelo MAYV, a qual foi observada pela presença de sinais de doença mais leves, menor carga viral, menor dano tecidual e ausência de perda óssea. Os dados da cultura celular mostram que a infecção do MAYV induz um ambiente inflamatório que favorece a osteoclastogênese, mediada principalmente pelas citocinas TNF e IL-6. De acordo com esse dado, a infecção de camundongos IL-6^{-/-} resultou em um fenótipo de proteção da perda óssea. Portanto, a sinalização CCL2/CCR2 mostrou ter um papel importante na patogênese da perda óssea e da dor na infecção do MAYV, sendo, assim, um alvo terapêutico promissor para desenvolvimento de estratégias de tratamento específicas para a febre Mayaro.

Palavras-chaves: Perda óssea, alfavírus, osteoclastogênese, inflamação, eixo CCL2/CCR2 .

ABSTRACT

The Mayaro Virus (MAYV) belongs to the *Alphavirus* genus and the *Togaviridae* family. MAYV is responsible for sporadic outbreaks of acute febrile illness in South American countries. Clinical signs of Mayaro fever include headache, fever, myalgia and arthralgia, which can be persistent and debilitating. The disease caused by alphaviruses is classified as an immunopathology, and many inflammatory mediators have been described to play a relevant role in the pathogenesis of these viruses, including IL-6, TNF and CCL2. Thus, due to the impact that MAYV disease has on people's quality of life and being poorly understood, the present work aimed to investigate and elucidate the role of the CCR2-CCL2 axis in the pathogenesis of Mayaro Virus infection. For this, mice deficient for the molecules of interest and silencing technique were used. Initially, we first performed the standardization of an immunocompetent model in WT C57BL/6 mice, and then the characterization of the role of the CCR2 receptor in MAYV infection. The results showed that MAYV induced an acute inflammatory disease, characterized by edema, hypernociception and myositis in WT and CCR2^{-/-} mice. The immune response profile in WT was characterized by an increase in the production of inflammatory mediators, such as IL-6, TNF, CCL2 and CCL5. High levels of CCL2 at the local and systemic level were followed by a significant recruitment of CCR2⁺ macrophages and a cellular response orchestrated by these cells. CCR2^{-/-} mice showed similar levels of edema, hypernociception and myositis when compared to WT mice. However, they showed an increase in CXCL1 levels significantly different from WT mice, followed by a replacement of the inflammatory macrophage infiltrate by neutrophils. On the other hand, although the silencing of *ccl2* did not prevent cell migration and reduction of the inflammatory infiltrate, it promoted a significant improvement in hypernociception and reduced expression of important inflammatory molecules, such as *ccl5*, *ccl7* and *Tnf*. This reveals that CCL2 and TNF have a relevant role in MAYV-induced nociception. In general, it can be concluded that the absence of the CCR2 receptor conferred protection to the animals against MAYV infection, which was observed by the presence of milder signs of disease, lower viral load, less tissue damage and absence of bone loss. Cell culture data show that MAYV infection induces an inflammatory environment that favors osteoclastogenesis, mediated mainly by the cytokines TNF and IL-6. According to this data, infection of IL-6^{-/-} mice resulted in a protective phenotype of bone loss. Therefore, CCR2/CCL2 signaling showed to play an important role in the pathogenesis of the bone loss and pain in MAYV infection, so a promising therapeutic target for developing specific treatment strategies for Mayaro fever.

Keywords: Bone loss, alphavirus, osteoclastogenesis, inflammation, CCL2/CCR2 axis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura-1 Mapa da distribuição global do MAYV.....	22
Figure-2 Ocorrência de MAYV nos estados brasileiros.....	23
Figura-3. Curso clínico da Febre Mayaro.....	24
Figure-4. Estrutura da partícula viral, organização do genoma e estrutura geral do MAYV infeccioso determinada por crio-EM.....	27
Figura-5. Organização geral do ectodomínios das glicoproteínas E1 e E2 do MAYV.....	28
Figure-6. Ciclo de replicação do MAYV.....	30
Figure-7. Ciclo de transmissão do MAYV.....	31
Figure-8. Proporção de YLD para cada desordem musculoesquelética com base em GBD,2010.....	35
Figure 9. Fatores imunes promotores da osteoclastogênese.....	38
Figura 10. Diagrama do mecanismo de sensibilização à dor induzido por CCL2-CCR2.....	42

FIGURAS – METODOLOGIA

Figura 11. Estratégia experimental de infecção e avaliação dos parâmetros de doença para estabelecimento de um modelo animal para o MAYV em camundongos da linhagem C57/BL6j.....	46
Figura-12. Delineamento experimental do silenciamento da quimiocina CCL2 com SiMCP1.....	49

FIGURAS – RESULTADOS

Figura-13. A infecção do MAYV induziu edema e diminuiu o limiar de hipernocicepção em camundongos C57BL6.....	52
Figura-14. A infecção do MAYV induziu miosite em camundongos da linhagem C57BL6.....	53
Figura-15. Carga do MAYV em órgãos e tecidos.....	54
Figura-16. MAYV induziu a produção de mediadores inflamatórios locais e sistêmicos em camundongos C57BL6.....	55
Figura-17. MAYV induz perda óssea na tíbia de camundongos C57BL6.....	56
Figura-18. A infecção do MAYV afeta o osso trabecular.....	57
Figura-19. O MAYV causa perda óssea sistêmica em camundongos C57BL6.....	58

Figura-20. Marcação de células TRAP ⁺ na maxila.....	58
Figura-21. Análise da expressão de genes do metabolismo ósseo na maxila de camundongos C57BL6.....	59
Figura-22. O MAYV induz edema tardio e altera o limiar de hipernocicepção em camundongos CCR2 ^{-/-}	60
Figura-23. Quantificação da carga viral em órgãos e tecidos em camundongos WT e CCR2 ^{-/-}	61
Figura 24. O MAYV induz dano tecidual na pata de camundongos C57BL6 e CCR2 ^{-/-}	62
Figura-25. Avaliação do perfil de mediadores inflamatórios em camundongos C57BL6 e CCR2 ^{-/-} infectados com o MAYV.....	63
Figura-26. Análise de μ CT na tíbia de camundongos CCR2 ^{-/-} infectados com MAYV.....	64
Figura-27. Análise de μ CT na maxila de camundongos CCR2 ^{-/-} infectados com MAYV...65	
Figura-28. O silenciamento da quimiocina CCL2 promove melhora no limiar de hipernocicepção em camundongos infectados com o MAYV.....	66
Figura-29. O silenciamento de CCL2 altera o perfil de produção e expressão de mediadores inflamatórios em camundongos infectados com MAYV.....	66
Figura-30. O silenciamento de CCL2 não impediu migração de células inflamatórias e o dano tecidual na pata de camundongos infectados com o MAYV.....	67
Figura-31. Efeito do tratamento com SiMCP1 no comportamento de células mieloides na medula óssea e baço em camundongos infectados com MAYV.....	68
Figura-32. Perfil de células imunes na pata de camundongos WT e CCR2 ^{-/-} infectados com MAYV.....	71
Figura-33. Perfil de expressão do receptor CCR2 na população de células imunes mieloides.....	72
Figura-34. Perfil de células imunes linfoides na pata de camundongos WT e CCR2 ^{-/-} infectados com MAYV.....	73
Figura-35. Infecção e resposta de macrófagos primários a infecção pelo MAYV.....	75
Figura-36. Infecção e avaliação da resposta de osteoclastos primários a infecção pelo MAYV.....	76
Figura-37. Marcação de TRAP em culturas de osteoclastos primários diferenciados com RANKL(A) ou TNF (B).....	77
Figura-38. Avaliação da resposta de osteoblastos primários com sete dias de diferenciação a infecção do MAYV.....	77

Figura-39. Avaliação da resposta de osteoblastos primários com 14 dias de diferenciação a infecção do MAYV.....	78
Figura-40. Perfil de resposta de diferentes culturas de osteoblastos a infecção pelo MAYV e CHIKV.....	79
Figura-41. A Ausência da citocina IL-6 protege os animais contra a perda óssea induzida pelo MAYV.....	80
Figura-42. Mecanismo envolvido na osteoclastogênese induzida pelo MAYV.....	81

LISTA DE SIGLAS

AR – Artrite reumatóide
CCL – CC Chemokine ligand
CCR - CC Chemokine receptor
CF - Fixação do complemento
CHIKV – Vírus chikungunya
CTLA4 - Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
CXCL - CXC Chemokine ligand
DC – Células dendríticas
DENV – Vírus dengue
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK - Quinases reguladas por sinais extracelulares
FGF - Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico
FM – Febre Mayaro
GBD - Carga Global de Doenças
G-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF - Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HI - Inibição da hemaglutinação
IFN- α – Interferon alfa
IFN- γ – Interferon gama
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
JAK2 – Janus quinase
MAYV – Vírus Mayaro
M-CSF - Fator estimulador de colônia de macrófagos humano
MDSC - Células supressoras derivadas de mieloides
MIP-1 α - Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
MIP-1 β - Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta
NMDA - N-Metil-D-Aspartato
NRAMP - Proteínas de macrófagos associados à resistência natural
OA - Osteoartrite
OMS – Organização Mundial de Saúde

OPG - Osteoprotegerina

PHB1 - Receptor de laminina e proibitina 1

PPIA - Peptidilprolil Isomerase A

PRNT - Teste de neutralização por redução de placa

RANK – Receptor activator of NFkB / Receptor ativador de NF-kappa-B

RANKL - Receptor activator of NFkB ligand / Ligante do receptor ativador de NFkappa-B

RANTES - Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted

RPS18 – Proteína ribossomal 18S

RRV – Vírus Ross River

RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SINV – Vírus Sindbis

STAT3 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TNF – Fator de necrosetumoral

WT – Wild-type/ selvagem

YFV – Vírus da febre amarela

YLDs - Anos vividos com deficiência

ZIKV – Vírus Zika

SUMÁRIO

1.Revisão de literatura.....	21
1.1 Aspectos epidemiológicos da Febre Mayaro.....	21
1.3 Estrutura e ciclo de replicação.....	26
1.5 Fatores imunes associados à patogênese alfaviral	32
1.6 Fatores imunes associados à perda óssea em doenças reumáticas.	34
1.7 Eixo CCL2-CCR2.....	38
2. Justificativa.....	43
3. Hipótese	43
4. Objetivos.....	43
4.1 Objetivo geral.....	43
4.2 Objetivos específicos:.....	43
5. Materiais e métodos.....	45
5.1 Células, vírus e titulação	45
5.2 Declaração Ética	45
5.7 Análise de micro-CT	47
5.8 Análise histopatológica	47
5.10 Fenotipagem de leucócitos.....	48
5.11 Cultura de células.....	48
5.13 Transcrição reversa e análise por PCR em tempo real (RT-qPCR)	49
5.14 Análise estatística	50
6. Resultados.....	52
6.1 Caracterização da doença induzida pelo MAYV em camundongos C57BL6	52
6.2 A infecção pelo MAYV induz a perda óssea local e sistêmica	55
6.3 O receptor CCR2 e a quimiocina CCL2 desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença induzida por MAYV	60
6.4 A ausência de CCR2 está associada a uma alteração do perfil celular local caracterizada por uma redução de células mononucleares e aumento de polimorfonucleares resultando em melhor evolução da doença na infecção por MAYV.	68
6.5 Resposta de macrófagos, osteoclastos e osteoblastos à infecção por MAYV.....	74
6.6 Papel da citocina IL-6 na patogênese da perda óssea induzida pelo MAYV.....	79
7. Discussão.....	80
8. Referências	89
9.Produção científica e outras atividades.....	101

Artigos publicados:	101
Participação em eventos científicos	103
Educação e extensão	103
10.Anexos.....	105
ANEXO 1.-CEUA.....	105
ANEXO 2- Artigo.....	106
ANEXO 3.....	148
ANEXO 4.....	149
ANEXO 5.....	150
ANEXO 6.....	151
ANEXO 7.....	152
ANEXO 8.....	153
ANEXO 9.....	154

1. Revisão de literatura

1.1 Aspectos epidemiológicos da Febre Mayaro

O vírus Mayaro (MAYV) é o agente etiológico da Febre Mayaro (FM). Ele foi isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago em 1954 e, desde então tem sido responsável por surtos de FM em países da América do Sul, incluindo o Brasil, onde é considerado endêmico (ANDERSON et al., 1957; AUGUST et al., 2015). No entanto, dados epidemiológicos também têm sugerido a circulação do MAYV em outros países a exemplo da Guatemala, Costa Rica, Panamá e México (MOTA et al., 2015). Destaca-se a presença do MAYV no Caribe, que representa um relevante problema de saúde pública visto que vários arbovírus, como o vírus da Zika, da Dengue e da Chikungunya também emergiram dessa região e, subsequentemente se disseminaram para América Central e do Norte (MAVIAN et al., 2017; HOTEZ e MURRAY, 2017). Além disso, uma nova cepa do MAYV foi recentemente isolada no Haiti (LEDNICKY et al., 2016). Nos últimos anos, casos importados do MAYV têm se tornado mais frequentes, com relatos na Alemanha, Holanda, França e Suíça (**FIG. 1**). Isto tem levado a uma crescente preocupação com possíveis introduções deste vírus em regiões não endêmicas, seguido de grandes epidemias (HASSING et al., 2010; LLAGONNE-BARETS et al., 2016; RECEVEUR et al., 2010; NEUMAYR et al., 2012).

No Brasil, os casos de FM têm ocorrido na região Norte, nos estados do Pará e Amazonas, e na região Centro-Oeste, nos estados do Mato Grosso e Goiás (MOURÃO et al., 2012; ZUCHI et al., 2014; VIREIRA, et al., 2015; BRUNINI et al., 2017). Um estudo de meta-análise sobre a taxa de infecção do MAYV no Brasil entre os anos de 1955 e 2018, demonstrou que a taxa geral de exposição ao MAYV no país é de 10%, com maior incidência na região Norte com 13%, seguido pela região Centro-Oeste que apresentou 8% de incidência. Além disso, casos autóctones de MAYV também foram relatados no Sudeste (0,4%), no Rio de Janeiro, na cidade de Niterói. A ocorrência de casos de FM fora de áreas endêmicas tem sido relatada em São Paulo, Bahia e Paraíba (LIMA et al., 2021).

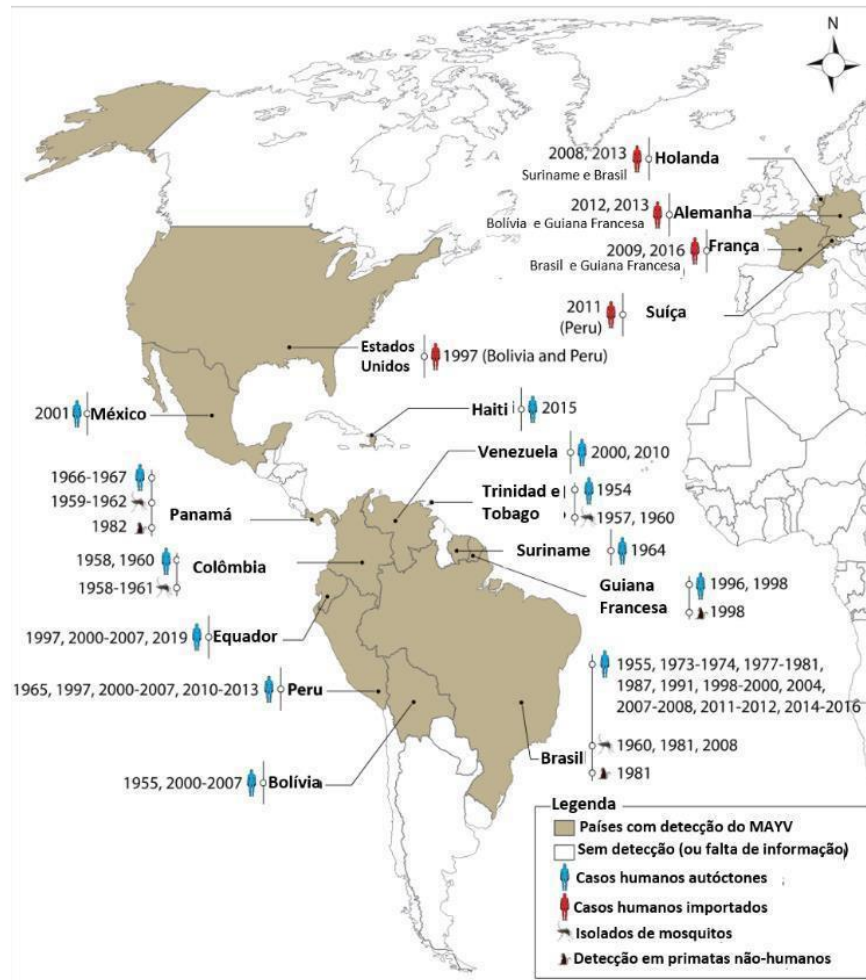


Figura 1. Mapa da distribuição global do MAYV. A distribuição espacial do MAYV foi baseada na sua detecção em vetores, humanos e primatas não-humanos.(Adaptado de Diagne et al, 2020).

Estudos de vigilância epidemiológica realizados em Manaus e Mato Grosso revelaram que a maioria dos casos de infecção pelo MAYV são mascarados por outras arboviroses e não são diagnosticados, o que tem levado ao desconhecimento real do números de casos e da circulação do MAYV pelo território Brasileiro (MOURÃO et al., 2012; ZUCHI et al., 2014). Além disso, a identificação de casos de FM e dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus* naturalmente infectados pelo MAYV em áreas urbanas de Cuiabá, juntamente com a evidência de circulação do MAYV em outras cidades brasileiras, como Manaus, Brasília, Niterói e Goiânia, destaca uma real preocupação com a propagação do MAYV pelo restante do território brasileiro (FIG. 2) (SERRA et al, 2016; LIMA et al., 2021).

De acordo com o Ministério da Saúde, entre dezembro de 2014 e janeiro de 2016, foram registrados 343 casos suspeitos de infecção pelo MAYV em 11 estados brasileiros.

Entre os casos notificados apenas 70 foram confirmados, sendo 60 em Goiás, nove em Tocantins e um no Pará (SANTOS et al, 2017). Em 2019, até a semana epidemiológica 35, foram detectados 5 casos de febre Mayaro no estado do Pará. Todos esses casos foram relatados em indivíduos do sexo masculino, sendo que casos dois ocorreram em crianças, com uma delas precisando ser hospitalizada. Além disso, dois adultos evoluíram para a fase crônica (Ministério da Saúde, 2019). Ressalta-se que devido à ausência de diagnóstico e a co-circulação de outros arbovírus, o número de casos de infecção por MAYV provavelmente é bastante subestimado.

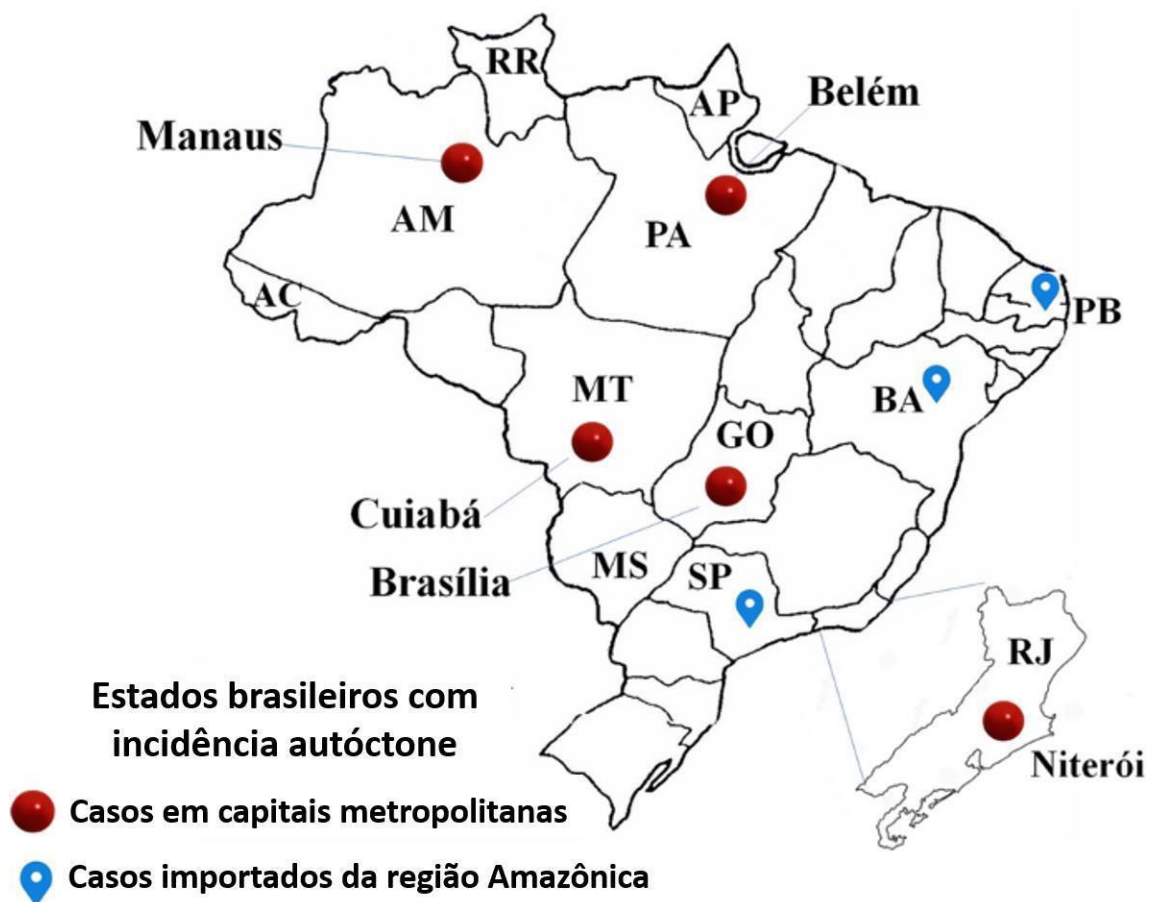


Figure 2. Ocorrência de MAYV nos estados brasileiros. Meta-análise dos casos de MAYV no Brasil entre os anos de 1955 e janeiro de 2020. (Adaptado de Lima et al., 2021).

1.2 Febre Mayaro: aspectos clínicos e patogênese

A FM é uma doença febril aguda semelhante à dengue, de caráter autolimitado, que pode variar de leve a moderadamente grave. A fase aguda da doença apresenta um curto período de viremia com duração de 3-7 dias e tipicamente inclui febre alta (usualmente entre 39°C e 40°C),

dor de cabeça, fotofobia, dor atrás dos olhos, vômito, diarreia, erupções cutâneas, mialgia e artralgia. Em alguns casos, manifestações hemorrágicas como petéquias, epistaxis e sangramento gengival também podem ocorrer. Além disso, complicações graves decorrentes da infecção pelo MAYV, como miocardite, manifestações neurológicas e morte têm sido relatadas. Seguindo a fase aguda, tem-se o início da fase de convalescência que é acompanhada por fraqueza e artralgia, a qual pode durar algumas semanas. O estágio crônico da doença ocorre quando a dor articular persiste por mais de 3 meses após o início dos sintomas (**FIG. 3**) (NEUMAYR et al., 2012; MOURÃO et al., 2012; MOTA et al., 2015; ACOSTA- AMPUDIA et al., 2018; SANTOS et al., 2020).

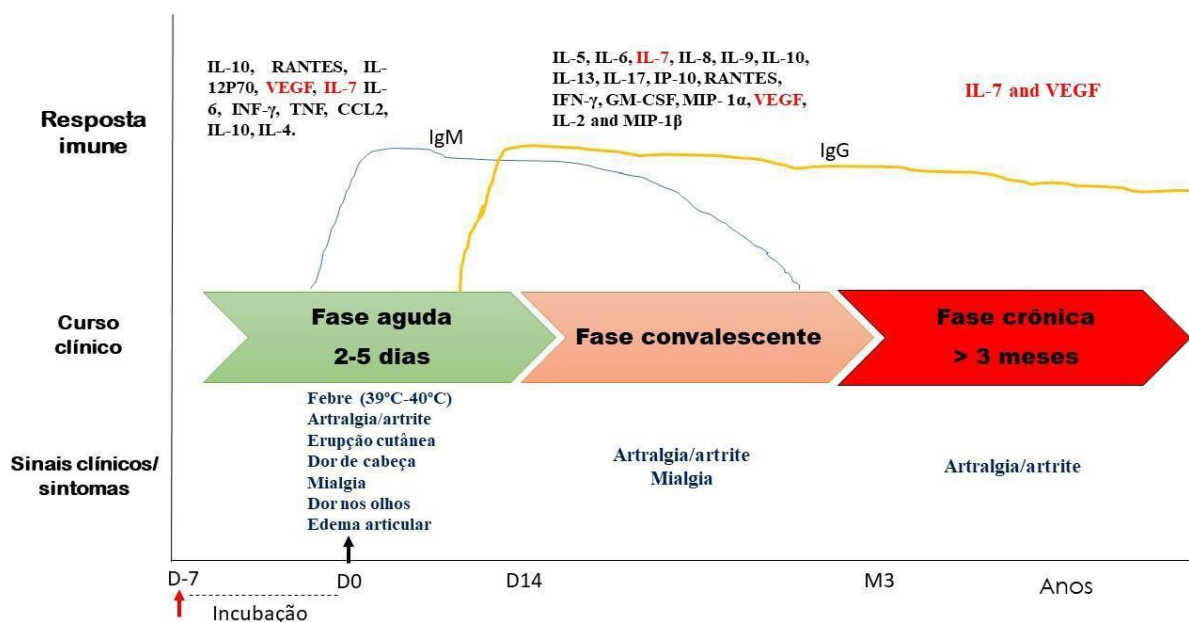


Figure 3. Curso clínico da Febre Mayaro. Após o período de incubação do MAYV, a fase aguda da doença inicia abruptamente com febre alta e inclui outros sintomas gerais. A resposta imune nessa fase é caracterizada pela produção de vários mediadores pró- inflamatórios, e a produção de IgM com 3 dias pós-infecção. A fase convalescente da doença pode durar algumas semanas, e é caracterizada pela mialgia e artralgia. Em alguns pacientes é observado muitos mediadores imunes elevados nessa fase. Em 50% dos casos a doença pode evoluir para o estágio crônico, o qual inclui a artralgia/mialgia persistentes. As citocinas IL-7 e VEGF foram descritas por estarem elevadas no soro de pacientes com artralgia persistente desde o início da infecção, podendo ser usados como marcadores de gravidade da doença. (Adaptada de Santos et al., 2020).

Assim como na infecção causada por outros alfavírus, a artralgia altamente debilitante e persistente é uma característica marcante na infecção pelo MAYV, acometendo de 50-75% dos pacientes infectados. A artralgia afeta principalmente as articulações dos punhos, cotovelos, joelhos e pequenas articulações das mãos e pés. A dor articular crônica induzida pela infecção por alfavírus tem grande impacto socioeconômico, pois frequentemente causa limitações na realização de atividades de vida diária e profissionais pelo indivíduo acometido. A emergência

dos alfavírus artritogênicos torna-se mais preocupante, em razão de não haver ainda nenhuma terapia específica ou vacina licenciada disponíveis, sendo o tratamento sintomático por meio do uso de analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroidais para alívio da dor e febre (NEUMAYR et al., 2012; HALSEY et al., 2013; ESPOSITO et al., 2017, ARENÍVAR et al., 2019).

Um estudo longitudinal realizado em amostras de pacientes com infecção confirmada pelo MAYV pelo período de um ano, demonstrou que o MAYV induz uma robusta resposta imune, acompanhada por uma forte resposta de anticorpos neutralizantes e a secreção de vários mediadores pró-inflamatórios. Durante a fase aguda foi observado aumento nos níveis de vários mediadores inflamatórios. A quimiocina CCL2 atingiu o pico durante a fase aguda e permaneceu elevada até 6 meses após a infecção em pacientes com artralgia persistente. Os níveis de IL-2 e IL-9 elevaram-se na fase convalescente e permaneceram por até 3 meses pós-infecção. Em pacientes com artralgia persistente os níveis de IL-13 foram elevados na fase convalescente e os níveis IL-7 e VEGF foram elevados em todos os pontos avaliados, sugerindo que esses fatores podem ser considerados marcadores de gravidade nos estágios iniciais da doença. A fase crônica foi marcada também por níveis elevados de IL-1 β , IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-17, interferon IFN- γ e TNF (SANTIAGO et al., 2015). Em um outro estudo com pacientes, realizado por Tappe et al. (2016), foi demonstrado que os níveis de IL-10, RANTES, IL-12P70 e VEGF estavam significativamente elevados na fase aguda. Enquanto que na fase de recuperação os seguintes mediadores apresentavam-se em maiores concentrações: IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IP-10, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , GM-CSF e IFN- γ .

Adicionalmente, na infecção pelo MAYV tem sido descrito o estabelecimento de uma resposta humoral relevante. O IgM é detectado com 3 dias após o início dos sintomas e persiste por até 3 meses, sendo em seguida substituído por IgG, que pode persistir por anos (SANTOS et al., 2020). A detecção e tempo de persistência de IgM e IgG são importantes para o diagnóstico, vigilância da doença e estudos epidemiológicos do MAYV, respectivamente (SANTOS et al, 2020).

A atual co-circulação do MAYV e CHIKV na América Latina é um grande desafio para o diagnóstico sorológico e a vigilância epidemiológica, uma vez que ambos pertencem ao complexo sorológico Similike Forest e o reconhecimento cruzado de anticorpos pode ocorrer, devido à alta identidade de sequência traduzida entre os domínios genômicos codificadores de proteínas (FISCHER et al, 2020). Além disso, a presença de outras arboviroses como dengue e zika também leva para subnotificações de casos e erros de diagnóstico (SMITH et al, 2018). Como

os alfavírus têm um período de viremia de curta duração, os testes sorológicos apresentam-se como a melhor escolha para os laboratórios de saúde pública realizarem o diagnóstico do paciente e também para estudos soropidemiológicos (FISCHER et al, 2020).

Dentre os testes sorológicos atualmente disponíveis para o diagnóstico de alfavírus em geral, tem-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) que é técnica mais comumente utilizada e o teste de neutralização por redução de placa (PRNT), considerado o método sorológico padrão ouro no diagnóstico de infecções por alfavírus. Outras técnicas também utilizadas, incluem o isolamento viral em cultura, RT-PCR, inibição da hemaglutinação (HI), fixação do complemento (CF) e os ensaios de imunofluorescência também são úteis para a detecção de anticorpos anti-MAYV (SANTOS et al, 2020).

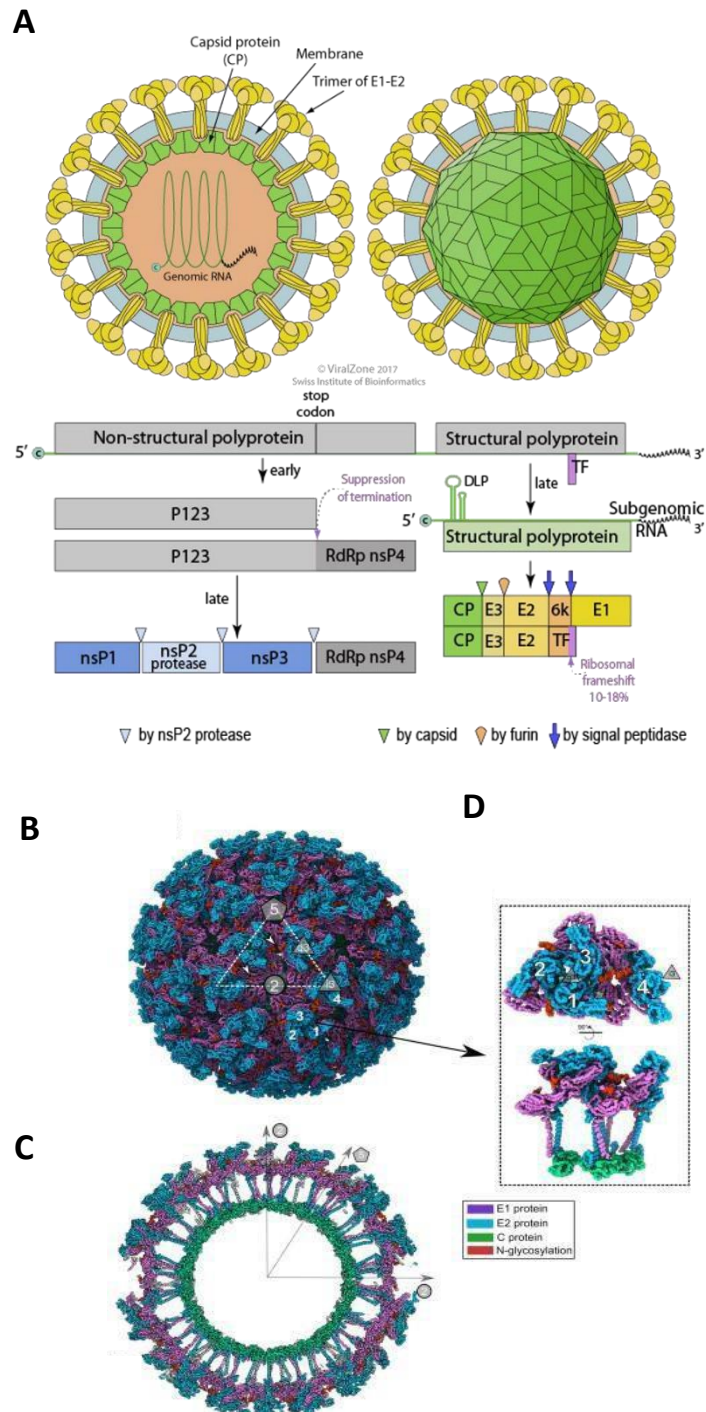
Fischer et al. (2020) demonstraram que a realização de testes individuais de ELISA e PRNT para CHIKV e MAYV não são eficazes para diferenciação e conseqüentemente afetam o resultado do diagnósticos e vigilância epidemiológica. No entanto, a combinação de ELISAs permitiu um solução fácil e eficiente para diferenciar as duas infecções. Os resultados mostraram, por exemplo, que ELISAs para CHIKV e MAYV em paralelo aumentaram significativamente os valores preditivos positivos (VPP) entre todas as coortes de 35,3% para 88,2% para IgM e de 61,3% para 96,8% para IgG.

O desenvolvimento de novos métodos com uma abordagem de alto rendimento seria enormemente vantajoso para detectar respostas de anticorpos a vários alfavírus dentro do mesmo ensaio e na vigilância da doença, além de permitir rastrear a emergência de novos patógenos. Com base nisso, Smith et al (2018) desenvolveram um ensaio de alto rendimento baseado em microarrays de proteínas, o qual eles incluíram antígenos recombinantes das proteínas C, E1 e E2 de diferentes alfavírus. Os resultados mostraram que resposta de anticorpos de múltiplos alfavírus podem ser quantificadas especificamente dentro do mesmo ensaio, usando antígenos de proteínas recombinantes selecionados e que as infecções pelo MAYV resultam em respostas únicas às proteínas do envelope viral (SMITH et al, 2018).

1.3 Estrutura e ciclo de replicação

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus emergente, membro da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*. As partículas virais apresentam um nucleocapsídeo icosaédrico, são envelopadas e com aproximadamente 70 nm de diâmetro. O envelope é formado por uma bicamada lipídica, no qual estão inseridas as glicoproteínas E1 e E2, que se associam em heterodímeros e esses em trímeros, formando as espículas virais (**FIG. 4**). A proteína E1

estruturalmente é composta por 3 subdomínios: I, II e III, enquanto a proteína E2 apresenta 4 subdomínios, denominados A, B, C e D, que são mais segregados espacialmente. Os ectodomínios de E1 e E2 interagem entre si e mantêm a estrutura da espícula viral (**FIG. 5**). E2 e E1 são responsáveis pelo reconhecimento do vírus a seu receptor e entrada do mesmo nas células alvo por fusão de membrana, respectivamente (STRAUSS e STRAUSS, 1994; LEUNG et al., 2011; RIBEIRO-FILHO et al, 2021).



(continuação da legenda da figura 4) mapa de densidade. (C) Corte transversal central do modelo atômico. (D) Unidade assimétrica do MAYV formada por 4 heterodímeros E1-E2, seguindo a triangulação icosaédrica T=4. Fonte: expasy.com / Viral Zone 2010 Swiss Institute of Bioinformatics. Figuras B, C e D (Adaptadas de Ribeiro-Filho et al., 2021)

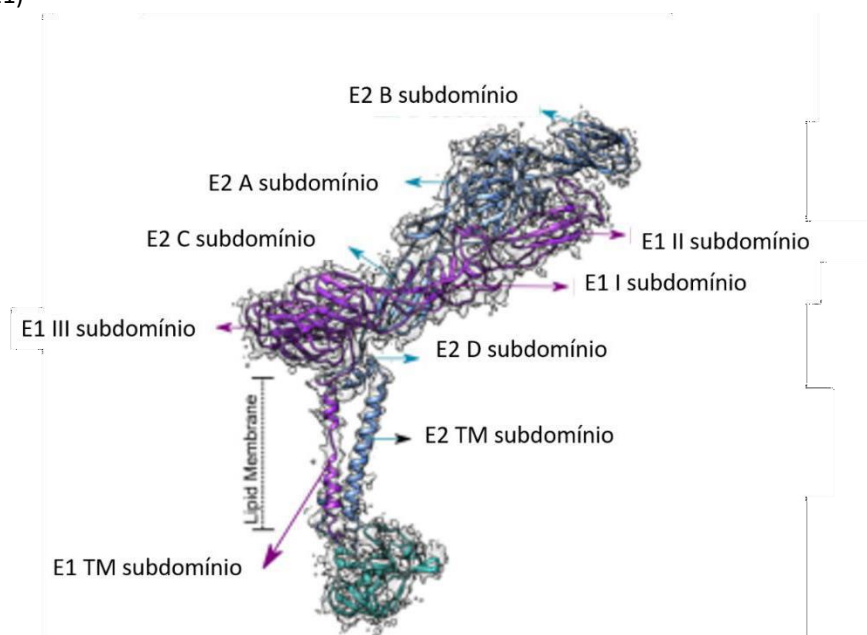


Figura 5. Organização geral do ectodomínios das glicoproteínas E1 e E2 do MAYV.

O genoma dos alfavírus compreende um RNA de fita simples, com polaridade positiva e aproximadamente 12 Kb de comprimento. O RNA é dividido em duas ORFs (Open reading frame), que codificam as proteínas não estruturais (nsP1-nsP4), que medeiam a tradução viral, replicação viral e subversão e evasão do hospedeiro, e as proteínas estruturais (C, E1, E2, E3 e 6K) (STRAUSS e STRAUSS, 1994; LEUNG et al., 2011).

Recentemente, a estrutura geral de partículas infectivas e maduras do MAYV foi descrita e observaram-se algumas particularidades estruturais e funcionais importantes. As proteínas E1 e E2 do MAYV quando comparadas ao CHIKV, apresentaram algumas diferenças, como a perda de três resíduos e a presença de vários resíduos não conservados. Essas diferenças implicam em alterações de epítomos conformacionais ou sequenciais, que podem ser exploradas para diagnóstico, uma vez que poderia ser usado no desenho racional de anticorpos para diferenciar MAYV de CHIKV. Além disso, identificou-se que a N-glicosilação da proteína E2 (N262) forma uma configuração que não foi observada em outros alfavírus e que esse sítio de glicosilação pode ter um papel importante na interação com o receptor MXRA8 (RIBEIRO-FILHO et al, 2021).

Para iniciar a infecção, os alfavírus precisam primeiramente se ligar a célula-alvo e em seguida interagir com um receptor de entrada. Essa ligação inicial dos alfavírus as células-alvo ocorre por meio da interação do vírus com moléculas de superfície celular expressas

ubiquamente, denominadas de fatores de fixação. Destes os fatores de fixação descritos para os alfavírus, inclui o sulfato de heparan, lectinas do tipo C e receptores fosfatidilserina. Apesar de facilitarem enormemente o contato inicial à célula, ligação e internalização do vírus ainda podem ser observadas na ausência desses fatores. Estes fatores de fixação podem ter papel importante na patogênese viral, uma vez que eles aumentam a interação com a célula-alvo e diminuem a quantidade de tempo que o vírus fica livre no meio extracelular, impedindo que ele seja inativado (HOLMES et al, 2020).

Por outro lado, os receptores são responsáveis pela internalização dos vírus antes da fusão endossômica. A etapa de internalização dos alfavírus inicia após a ligação da espícula viral (proteínas E1 e E2) ao receptor da célula alvo (LEUNG et al., 2011; HOLMES et al, 2020). A proteína MXR8 foi recentemente identificada como um receptor comum para vários alfavírus artritogênicos, incluindo CHIKV, RRV, MAYV e ONNV. Este receptor está presente na superfície de células epiteliais, mesenquimais e mieloides. Além disso, outros receptores tem sido propostos para atuar no processo de infecção dos alfavírus, como proteínas de macrófagos associados à resistência natural (NRAMP), receptor de laminina e proibitina 1 (PHB1) (ZHANG et al., 2018).

Os alfavírus são internalizados principalmente via endocitose mediada por clatrina e entregues ao compartimento endossomal. Já no interior do citoplasma, o pH do endossoma diminui e induz uma alteração conformacional na glicoproteína E1, o qual então medeia a fusão da membrana vírus-hospedeiro. Após a fusão, ocorre a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma, que sofre processo de desmontagem e liberação do RNA genômico. No início da infecção, o RNA genômico é primeiramente traduzido na poliproteína não estrutural P1234. A poliproteína P1234 é então clivada, gerando P123 e nsP4, o qual formam o complexo de replicação instável, que é responsável por sintetizar a fita de RNA negativa. Essa fita servirá como molde para síntese do RNA genômico e do RNA subgenômico. Em seguida, P123 é clivado em nsP1 e P23, então os produtos nsP1, P23 e nsP4 formam um complexo de replicação dentro de vacúolos citopáticos induzidos por vírus (CPV I). Esse segundo complexo é responsável pela síntese da fita negativa, do RNA genômico, mas não da síntese do RNA subgenômico. Após a clivagem completa em nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, a síntese de fita negativa é inativada e o complexo de replicação agora estável passa a sintetizar o RNA genômico e subgenômico (LEUNG et al., 2011; MOTA et al., 2015).

A tradução do RNA subgenômico produz a poliproteína estrutural. A clivagem da

poliproteína estrutural inicia pela proteína do capsídeo (C), que sofre autoclivagem. A proteína C livre se associa com RNA genômico recém sintetizado, formando novos nucleocapsídeos. A poliproteína remanescente PE2-6k-E1 é direcionada para o retículo endoplasmático. Após a síntese, PE2, precursor da glicoproteína E2, e E1 interagem para formar os heterodímeros. Os complexos PE2-E1 são transportados para o Complexo de Golgi e em seguida direcionados para a membrana celular por meio de vesículas. No interior das vesículas, PE2 sofre clivagem, produzindo E2 e E3. A montagem de novas partículas virais ocorre próximo à membrana celular, na qual a interação entre a proteína C e glicoproteína E2 conduzem o processo de brotamento (**FIG. 6**) (LEUNG et al., 2011; MOTA et al., 2015).

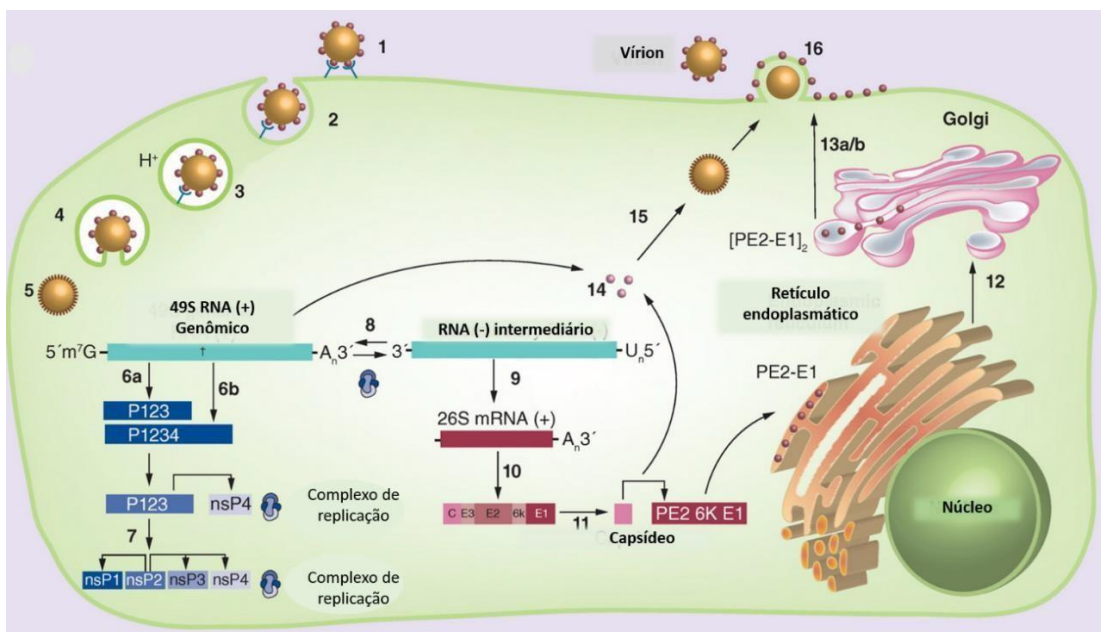


Figure 6. Ciclo de replicação do MAYV. (1) Reconhecimento e ligação ao receptor celular; (2) Internalização da partícula viral via processo de endocitose mediado por clatrina; (3) Acidificação do vacúolo; (4) A redução do pH induz mudança conformacional em E1, que medeia a fusão de membrana; (5) Desmontagem do nucleocapsídeo e liberação do RNA genômico no citoplasma; (6a) Tradução; (6b) Tradução de leitura; (7) Processamento da poliproteína não-estrutural e montagem dos complexos de replicação; (8) Transcrição; (9) Transcrição; (10) Tradução; (11) Processamento da poliproteína estrutural, com liberação da proteína C; (12) Processamento e maturação das glicoproteínas PE2 e E1; (13) Transporte das glicoproteínas processadas para a membrana plasmática e clivagem de PE2; (14) Empacotamento de RNA genômico pela proteína C; (15) Montagem do nucleocapsídeo; (16) Brotamento de partículas virais. (Adaptado de Mota et al., 2015).

1.4 Ciclo de transmissão e fatores associados a emergência

O MAYV é mantido na natureza em ciclos zoonóticos que envolvem primariamente o mosquito *Haemagogus janthinomys* como vetor e primatas não humanos como hospedeiros, no entanto, outros vetores secundários (*Culex sp*, *Sabethessp*, *Psorophora sp*, *Coquillettidia sp* and *Aedes sp*) e vertebrados silvestres (marsupiais, roedores e aves) podem atuar na manutenção do ciclo e serem importantes para disseminação do MAYV

(FIG. 7). Como o MAYV apresenta um ciclo de transmissão basicamente silvestre, os casos de infecções em humanos geralmente são esporádicos e acidentais, afetando principalmente indivíduos que estão em contato com ambientes de florestas (CALISHER et al., 1974; HOCH et al., 1981; DE THOISY et al., 2003; MOTA et al., 2015).

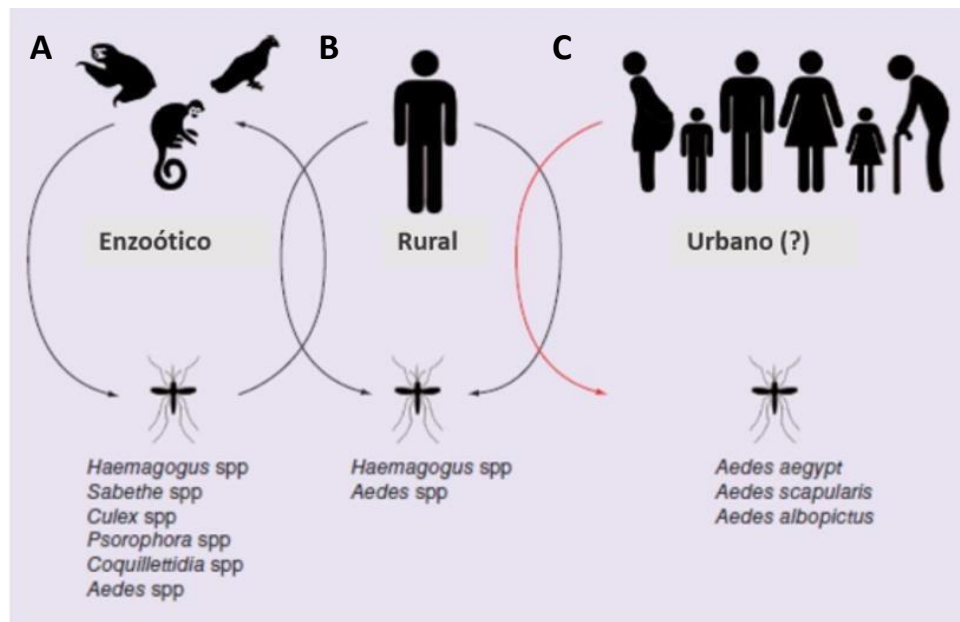


Figure 7. Ciclo de transmissão do MAYV. (A) O ciclo de manutenção do MAYV na natureza é um ciclo silvestre, o qual inclui o mosquito *Haemagogus janthinomys* como vetor e primatas não humanos como hospedeiros. Mas outras espécies de vertebrados e mosquitos podem atuar no ciclo de transmissão silvestre do MAYV. (B) O ciclo de transmissão rural do MAYV envolve pessoas que estão em contato com ambientes silvestres. (C) O MAYV tem um grande potencial de invadir centros urbanos, e estabelecer um ciclo de transmissão urbano mosquito-homem-mosquito, uma vez que tem sido demonstrado que mosquitos do gênero *Aedes sp.* tem capacidade de transmiti-lo.

No entanto, a introdução do MAYV em áreas urbanas e o estabelecimento de um ciclo de transmissão mosquito-homem-mosquito, é uma possibilidade cada vez mais forte, principalmente com os recentes relatos de casos de MAYV em áreas urbanas (MOURÃO et al., 2012; SERRA et al., 2016; LIMA et al., 2021). Dentre os fatores que podem favorecer a urbanização do MAYV, a competência dos vetores urbanos em transmitir o MAYV é crucial para esse processo. Alguns estudos em laboratório sobre a competência vetorial de mosquitos antropofílicos para o MAYV, demonstraram que o *Ae. albopictus* e *Ae. aegypti* são capazes de transmitir o MAYV (SMITH e FRANCY et al., 1991; LONG et al., 2011; WIGGINS et al., 2018). Brustolini et al. (2018) mostraram recentemente que diferentes espécies do gênero *Anopheles* são vetores de laboratório mais competentes para transmitir o MAYV que mosquitos do gênero *Aedes*. Além disso, podem ser importantes na invasão e propagação de MAYV em diversas regiões do mundo. Dado essas evidências, é importante o monitoramento da evolução do

MAYV, associado a implementação de medidas preventivas que sejam capazes de impedir que o MAYV se torne futuramente um grande problema de saúde pública, como ocorreu com outros arbovírus (DIAGNE et al., 2020).

Os arbovírus CHIKV, DENV, ZIKV e YFV tiveram um processo de urbanização/emergência bem sucedido, e acredita-se que o MAYV possa seguir o mesmo padrão. Muitos fatores relacionados com a urbanização e emergência do MAYV, incluem: (1) a forte homologia entre MAYV com CHIKV, um alfavírus com uma história de urbanização bem sucedida; (2) a ocorrência regular de casos de MAYV próximo as principais cidades tropicais onde *A. aegypti* é endêmico; (3) relatos de propagação do MAYV através de viajantes doentes ou aves migratórias; (4) atividades humanas como, agricultura, atividades agroindustriais, urbanização, crescimento populacional, más condições sanitárias, desmatamento e migração humana; (5) mutações do vírus, as quais podem favorecer adaptações a novos vetores e hospedeiros; (6) expansão do mosquito *Haemagogus* em áreas de alta densidade populacional humana, gerando novos focos potenciais para a transmissão de MAYV; (7) mudanças climáticas, as quais favorecem a invasão de mosquitos vetores em novas regiões geográficas não endêmicas (LORENZ et al., 2019; DIAGNE et al., 2020).

1.5 Fatores imunes associados à patogênese alfaviral

A doença musculoesquelética causada pelos alfavírus artritogênicos, como os vírus Chikungunya (CHIKV), Ross River (RRV) e Sindbis (SINV) tem sido considerada um distúrbio inflamatório imunomediado, uma vez que além dos efeitos diretos causados pela replicação do vírus nos tecidos e nas células do hospedeiro, diversos trabalhos têm demonstrado que a resposta imune decorrente dessa replicação exerce um papel importante no dano tecidual (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al, 2013).

Os macrófagos e seus produtos pró-inflamatórios, CCL2, TNF- α e IFN- γ são considerados os principais mediadores associados ao desenvolvimento da miosite e artrite induzida por RRV e CHIKV. Em modelos animais, a depleção dos macrófagos e/ou a neutralização dos seus produtos resultou na redução da gravidade da doença (LIDBURY et al, 2008; RULLI et al, 2009; RULLI et al, 2011). Além disso, eles são apontados como as células alvos da replicação do CHIKV, RRV e SINV, e são as principais células envolvidas nas infecções persistentes observadas na doença crônica (LABADIE et al., 2010; NAYAK et al, 2019). Recentemente foi demonstrado queo MAYV também replica em macrófagos e induz a produção de TNF, uma citocina pró-inflamatória importante na artrite (CAVALHEIRO et al., 2016). Além disso,

Bengue et al. (2019) recentemente descreveram o potencial do MAYV se replicar em osteoblastos humanos (HOB), em condrócitos humanos (HC) e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (HFLS), células importantes para o desenvolvimento da osteoartrite. A infecção dos condrócitos resultou na expressão de metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas que podem estar envolvidas na destruição tecidual decorrente da infecção pelo MAYV.

A citocina IL-6 e as quimiocinas CCL2, CCL8 e CCL7 têm sido descritas por estarem envolvidas na osteoclastogênese durante a infecção alfaviral (CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015). Ainda, IL-6 e CCL2 têm sido detectadas no líquido sinovial de pacientes infectados com RRV e CHIKV. Estudos *in vitro* demonstraram que a infecção de osteoblastos pelo RRV e CHIKV, induz a expressão de IL-6, a qual, por sua vez, leva ao aumento na expressão de CCL2 e altera a razão citocina pró-osteoclastogênica RANKL/osteoprotegerina OPG (razão RANKL:OPG). A elevada razão RANKL:OPG promove a perda óssea (NORET et al., 2012; CHEN et al., 2014a; CHEN et al., 2014b). Por fim, uma meta-análise comparando o perfil de mediadores imunes durante a fase aguda da infecção por CHIKV identificou as citocinas pró-inflamatórias IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-18; citocinas anti-inflamatórias tais como IL-1Ra, IL-4 e IL-10; quimiocinas CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL3, CCL4; Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (FGF) e Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) como uma assinatura imune específica, que define a infecção aguda por CHIKV (TENG et al., 2015).

A quimiocina CCL2, a principal quimioatraente de monócitos e macrófagos, tem sido identificada como um fator patogênico fundamental na artrite induzida por RRV e CHIKV. Níveis elevados de CCL2 têm sido detectados na maioria dos estudos clínicos com alfavírus (KELVIN et al., 2011; CHAAITANYA et al., 2011; LIDBURY et al., 2008). Camundongos infectados com RRV ou CHIKV que foram tratados com Bindarit, um inibidor de CCL2 (e também de CCL7 e CCL8), apresentaram redução do dano musculoesquelético e infiltrado inflamatório. Além disso, o tratamento com Bindarit também foi capaz de reduzir a perda óssea induzida por CHIKV (RULLI et al., 2009; RULLI et al., 2011; CHEN et al., 2015).

CCL2 exerce suas funções biológicas ao interagir com o receptor CCR2. O papel do receptor CCR2 na artrite induzida pelo CHIKV foi recentemente demonstrado pela infecção de camundongos CCR2^{-/-}. Diferentemente ao encontrado para o bloqueio da quimiocina CCL2, a ausência do receptor CCR2 resultou em artrite mais grave, prolongada e erosiva, devido a substituição do infiltrado inflamatório de macrófagos por neutrófilos e alteração do perfil de mediadores inflamatórios produzidos, como por exemplo CXCL1, CXCL2, G-CSF, IL-1 β e IL-

10. Isso mostra que os macrófagos parecem exibir um papel dual durante a patogênese da infecção, contribuindo tanto para o aumento da inflamação, quanto para prevenir uma patologia excessiva através do controle da replicação viral (POO et al., 2014).

O modelo animal para MAYV recentemente desenvolvido por SANTOS et al. (2019) demonstrou que o MAYV induziu uma forte resposta inflamatória, mediada pelas citocinas TNF, IL-6 e IFN- γ e a quimiocina CCL2 (ou MCP1). Esses mediadores também têm sido produzidos em modelos animais para RRV e CHIKV. Corroborando estes achados, esses mediadores também foram detectados no soro de pacientes com FM, sendo a fase agudamarcada pela alta expressão de MCP-1/CCL2 (LIDBURY et al., 2008; GARDNER et al., 2010; SANTIAGO et al., 2015; SANTOS, 2017). Figueiredo et al (2019) demonstraram que fatores do hospedeiro, como a idade, a imunidade inata e adaptativa são importantes na patogênese do MAYV. Esses fatores mostraram ter um papel importante na replicação do MAYV. Além disso, os resultados também mostraram que a resposta imune adaptativa pode contribuir para o dano tecidual.

1.6 Fatores imunes associados à perda óssea em doenças reumáticas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as condições musculoesqueléticas compreendem mais de 150 doenças que atingem milhões de pessoas em todo o mundo. Um estudo realizado pelo Global Burden of Disease (GBD) em 187 países e 21 regiões do mundo entre os anos de 1990 e 2010, definiu cinco principais condições de distúrbio musculoesquelético, incluindo: a artrite reumatóide, osteoartrite, gota, dor lombar e dor no pescoço (MARCH et al., 2014). Essas condições são consideradas as doenças musculoesqueléticas mais comuns e incapacitantes (**FIG. 8**). Em estudo do GBD em 2017, as desordens musculoesqueléticas foram as que mais contribuíram para a deficiência global, sendo a dor lombar a causa principal de anos vividos com deficiência no mundo (Years Lived with Disability (YLDs)), desde que foi medida pela primeira vez em 1990 (JAMES et al., 2018; Organização Mundial de Saúde, 2019).

De forma geral, as condições musculoesqueléticas são caracterizadas pela dor persistente e redução da mobilidade, limitando as pessoas a realizarem suas atividades diárias, particularmente no trabalho. Essas desordens implicam em um grande custo para as pessoas afetadas, devido à redução na produtividade e os gastos com a saúde, assim como também para toda sociedade (MARCH et al., 2014; Organização Mundial de Saúde, 2019).

Algumas infecções virais são responsáveis por aproximadamente 1% de todos os casos de artrite aguda. No mundo todo, o parvovírus B19, hepatite B e C, HIV e os alfavírus estão entre as causas mais importantes de artrite mediada por vírus (MARKS e MARKS, 2016). Além

disso, tem sido relatado que a infecção pelo parvovírus B19 e o vírus da hepatite C pode desencadear a artrite reumatóide (AR). O CHIKV e outros alfavírus artritogênicos estão associados com o desenvolvimento de artrite inflamatória persistente e debilitante. Semelhante ao que ocorre na AR e na osteoartrite, a infecção pelos alfavírus também induzem uma grave destruição articular e em alguns casos perda óssea (CHEN et al., 2015). Devido ao grande potencial de causar grandes epidemias e serem globalmente distribuídos, os alfavírus podem contribuir significativamente para a carga de desordens musculoesqueléticas no mundo (CHEN et al., 2015). Na Índia, por exemplo, um estudo do COPCORD demonstrou que houve um aumento na porcentagem de doenças musculoesqueléticas reumáticas em certas comunidades após o surto de CHIKV em 2006 (ATUKORALA et al., 2014).

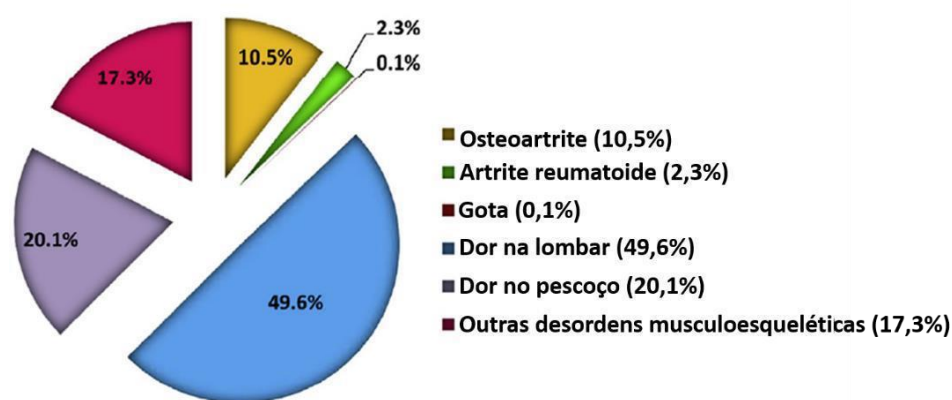


Figura 8. Proporção de YLD para cada desordem musculoesquelética com base em GBD, 2010.

(Adaptado de March et al., 2014).'

A fisiopatologia da AR e da artrite induzida pelos alfavírus artritogênicos apresentam uma forte semelhança, sendo caracterizadas pelo acúmulo de células inflamatórias nas articulações e a participação de muitas citocinas pró-inflamatórias (ALETAHA et al., 201; CHEN et al., 2015). A inflamação do tecido sinovial na RA está associada a várias vias de sinalização, como por exemplo, a via de sinalização RANK e Wnt, as quais favorecem a reabsorção excessiva do osso circundante e a desregulação da homeostase óssea (VISCONTI et al., 2019).

O principal mecanismo envolvido na perda óssea observada na AR, assim como em outras doenças reumáticas inflamatórias, é a inflamação. Em estudos pré-clínicos, tem sido observado que existe uma ligação clara entre a inflamação induzida por alfavírus e a perda óssea

periarticular e sistêmica. As citocinas inflamatórias produzidas pelas células da imunidade inata e adaptativa aumentam a ativação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea, e inibem a formação óssea (CHEN et al., 2015; COURY et al., 2019). Em seguida, descrevemos o conhecimento atual acerca do papel das principais células e medidores imunes, que estão envolvidos na osteoclastogênese de doenças reumáticas inflamatórias (**FIG. 9**).

Células T

As células T são reconhecidas por terem um papel principal em orquestrar a perda óssea na artrite, atuando por mecanismos diretos ou indiretos. Basicamente todos os subtipos de células T (TCD4⁺ helper – Th1, Th2 e Th17 e Treg; TCD8⁺) podem influenciar as células ósseas, principalmente os osteoclastos. As células TCD4⁺ são essenciais para o desenvolvimento da doença, mas não para a fase inflamatória (MELLADO et al., 2015). No tecido sinovial as células TCD4⁺ se diferenciam principalmente em células efectoras Th1, as quais produzem as citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN- γ , além disso promovem a ativação de macrófagos (CHEMIM et al., 2019). Durante a inflamação as células T são importantes produtoras de RANKL, um regulador chave da diferenciação de osteoclastos e reabsorção óssea (DANKS et al., 2016). No entanto, o subtipo Th1 também tem um efeito inibitório na osteoclastogênese por meio da sua citocina IFN- γ , que suprime as respostas de célula Th17, um subconjunto exclusivamente pró-osteoclastogênico (COURY et al., 2019). O subtipo Th17 tem sido proposto como a principal célula T promotora da osteoclastogênese, principalmente pela produção de IL-17 e IL-23. A citocina IL-17 atua nos fibroblastos sinoviais e osteoblastos induzindo a expressão de RANKL e M-CSF, enquanto em paralelo aumenta a expressão de RANK em células precursoras de osteoclastos. Por outro lado, as células Th2 e Treg inibem a osteoclastogênese. O efeito inibitório de Th2 é realizado através da citocina IFN- γ e IL-4, enquanto a inibição das células Treg é mediada por citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, ou através da sinalização do Antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA4) (MATEEN et al., 2016; COURY et al., 2019).

Macrófagos

Os macrófagos e seus mediadores são importantes para a perda óssea em doenças inflamatórias. Na AR os macrófagos são os principais produtores de mediadores inflamatórios, incluindo TNF, IL-1 β e IL-6. Estas citocinas têm um papel importante, promovendo a ativação de células endoteliais, inflamação da membrana sinovial e a osteoclastogênese. Além disso, os macrófagos são células precursoras dos osteoclastos. O RANKL presente no microambiente

articular atua sobre os macrófagos e induzem a sua diferenciação em osteoclastos. Dado o papel destrutivo dos macrófagos no tecido ósseo, eles são considerados alvos terapêuticos promissores em doenças ósseas inflamatórias (GU et al., 2017).

Mediadores inflamatórios

Muitas citocinas pró-inflamatórias têm sido descritas por estimularem direta ou indiretamente a diferenciação, atividade e sobrevivência dos osteoclastos (BRAUN e ZWERINA, 2011). O RANKL é membro da família TNF de citocinas. A expressão de RANKL é estimulada por várias citocinas, como IL-6, TNF e IL-17, e é produzido principalmente por osteoblastos, células sinoviais, células T e células B. A sinalização RANK/RANKL é o regulador primário da diferenciação e ativação de osteoclastos. Uma outra molécula importante nessa regulação da osteoclastogênese, é a osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel do RANKL, prevenindo a sinalização osteoclástica (VISCONTI et al., 2019). A citocina IL-1 β é uma forte estimuladora da reabsorção óssea. Ela atua aumentando a expressão de RANKL, estimulando a atividade dos osteoclastos por promover a produção de M-CSF e inibe a apoptose de osteoclastos. Além disso, tem sido reportado que a IL-1 β inibe a atividade dos osteoblastos (RUSCITTI et al., 2015).

O TNF é produzido principalmente por macrófagos ativados, mas também poder ser produzido por outras células, como fibroblastos, mastócitos, células T, células B, células NK, osteoblastos e osteoclastos. Ele pode estimular a osteoclastogênese de duas maneiras, diretamente por um mecanismo independente de RANKL, ou indiretamente, promovendo expressão de RANK em pré-osteoclastos, e aumento na produção de RANKL e M-CSF por osteoblastos e células T ativadas (AZUMA et al., 2000; KOMINE et al., 2001; MATTEN et al., 2016).

A sinalização de IL-6 está associada com um aumento na reabsorção óssea, no número e atividade de osteoclastos. Essa citocina pode estimular a diferenciação de osteoclastos por mecanismos dependente ou independente de RANKL. *In vitro* tem sido demonstrado que a IL-6 estimula a secreção de RANKL por osteoblastos, e juntamente com o TGF- β e IL-1 induz a diferenciação de células Th17 (BRAUN e ZWERINA, 2011).

Outras moléculas com papel importante na perda óssea em condições ósseas patológicas, são as quimiocinas, moléculas responsáveis pela migração, localização e função das células imunes durante a inflamação. As quimiocinas CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CCL11 têm sido implicadas no recrutamento de precursores de osteoclastos e na diferenciação dessas células (CHEN et al., 2015). A quimiocina CCL2 está elevada no soro e fluido sinovial

de pacientes com AR e OA, duas relevantes doenças reumáticas inflamatórias. CCL2 é conhecida como uma quimiocina CC que recruta principalmente monócitos/macrófagos para o sítio da inflamação (STANKOVIC et al., 2009; ZAREBSKA et al., 2017).

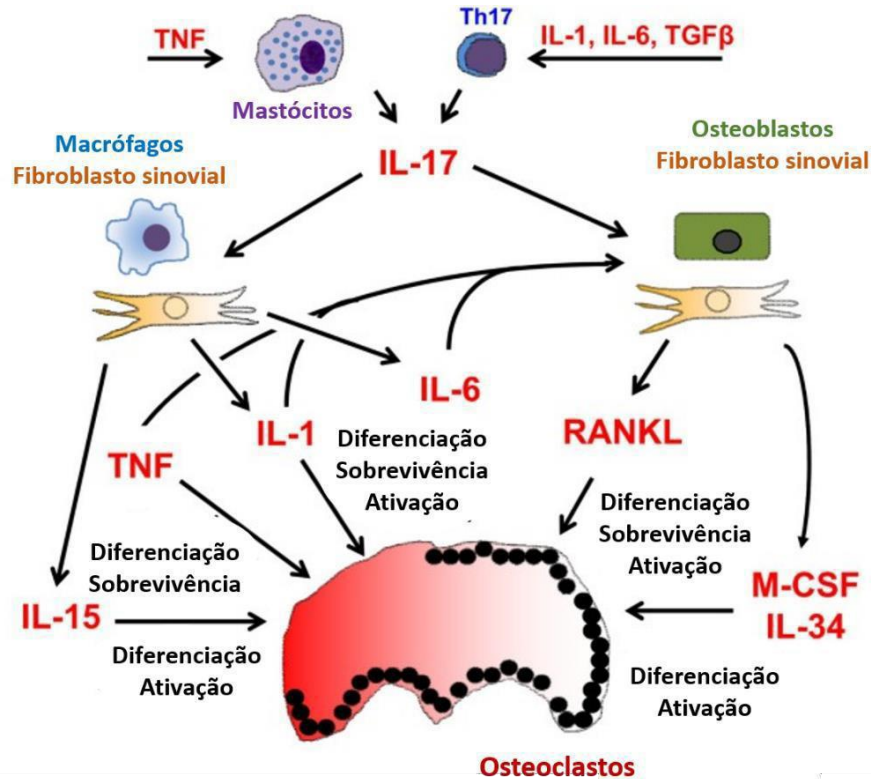


Figure 9. Fatores imunológicos promotores da osteoclastogênese. No microambiente ósseo de doenças reumáticas as citocinas inflamatórias IL1, IL-6, TNF e IL-17, produzida pelas células da imunidade inata e adaptativa, superregulam a expressão de RANKL nos osteoblastos e fibroblastos sinoviais. O RANKL promove a diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Algumas citocinas inflamatórias podem atuar diretamente sobre os osteoclastos (Adaptado de Braun e Zwerina, 2011).

De forma geral, todas essas informações refletem a forte comunicação que há entre o sistema imunológico e ósseo, o qual tem sido explorado dentro do campo da osteoimunologia, a fim de compreender melhor as vias moleculares envolvidas na patologia da perda óssea, possibilitando a descoberta de moléculas alvo e o desenvolvimento de novas terapias (COURY et al., 2019).

1.7 Eixo CCL2-CCR2

A sinalização CCL2-CCR2 é bem conhecida pelo seu importante papel na migração de leucócitos, particularmente monócitos e macrófagos, durante a defesa imune fisiológica e em condições patológicas, como artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas, aterosclerose,

doenças infecciosas, obesidade, diabetes e vários tipos de câncer (BOSE and CHO, 2013; GSCHWANDTNER et al, 2019).

A quimiocina CCL2, também referida como MCP1 (Monocyte chemoattractant protein 1), é membro da grande família de citocinas quimiotáticas, que inclui proteínas básicas de ligação a heparina e de baixo peso molecular (8 a 10 kDa) (CHARO et al, 1994). Além disso, com base no arranjo das duas primeiras cisteínas, CCL2 é classificada na subfamília de quimiocinas CC (YADAV et al, 2010). CCL2 é produzida por vários tipos celulares, incluindo células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, células epiteliais, astrócitos, células T e células mieloides, sendo os monócitos e macrófagos a principal fonte de CCL2. A expressão de CCL2 pode ocorrer constitutivamente ou após a indução por estímulos, como estresse oxidativo, citocinas (IL-1, IL-6, IL-4, TNF, IFN γ) e fatores de crescimento (Fator de Crescimento Transformador β (TGF β), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos (M-CSF) e Fator de Colônia de Granulócitos-Macrófagos (GM-CSF)) (YADAV et al, 2010; GSCHWANDTNER et al, 2019).

Além da sua potente ação na quimiotaxia de monócitos, CCL2 também induz a migração de células T, células B, células NK, basófilos, macrófagos, células dendríticas (DCs) e neutrófilos em condições específicas de homeostase ou patogênicas (GSCHWANDTNER et al, 2019). CCL2 exerce os seus efeitos sobre as células-alvo através da ligação e ativação do seu principal receptor, o receptor de quimiocina do tipo 2 (CCR2). Mas, ela também pode se ligar a outros receptores, conhecidos como receptores de quimiocinas atípicos AKR1 (DARC), AKR2 (D6) e US28. Em geral, o sistema quimiocina/receptor de quimiocina é altamente redundante, uma vez que maioria dos receptores liga a diferentes quimiocinas e a maioria das quimiocinas liga a vários receptores (FROBERG et al, 2001; PATTERSON et al, 2002; PRUENSTER et al, 2009; BONNECHI e GRAHAM, 2016; VACCHINI et al, 2016).

O CCR2 é um receptor caracterizado por sete domínios transmembrana acoplado a proteína G, e dessa forma a sua ativação está associada a um conjunto de reações que resultam na formação do trifosfato de inositol, liberação de cálcio e ativação de PKC (YADAV et al, 2010). A ligação de CCL2 ao CCR2 dispara diferentes vias de transdução de sinal, incluindo a sinalização JAK2/transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (JAK2/STAT3), sinalização MAP quinase (ERK1 e ERK2), quinases ativadas por estresse JNK1 e p38, duas isoformas de PI3-quinase (p85/p110 e C2 α) e liberação de cálcio mediada por fosfolipase C. A ativação dessas vias está associada a muitos dos efeitos que o eixo CCL2-CCR2 exerce sobre as células

mieloides (monócitos, macrófagos, osteoclastos, mastócitos, células dendríticas (DCs), basófilos e células supressoras derivadas de mieloides (MDSC)), como migração celular, sobrevivência celular, imunossupressão, inflamação, angiogênese, expressão de moléculas de adesão, endocitose e fagocitose, biogênese de corpos lipídicos e diferenciação de osteoclastos mediada por TNF (CAMBIEN et al, 2001; GSCHWANDTNER et al, 2019).

O eixo CCL2-CCR2 é bem conhecido pelo seu papel central no recrutamento de células CCR2⁺, especialmente de monócitos, durante a defesa fisiológica do hospedeiro em condições inflamatórias, como infecções ou dano tecidual. No entanto, quando ocorre um aumento anormal na expressão de CCL2, a resposta inflamatória inicial é sustentada e exacerbada devido a infiltração excessiva de monócitos, e isso contribui para uma inflamação tecidual persistente, que é implicada na patogênese de muitas doenças (GSCHWANDTNER et al, 2019; MOADAB et al, 2021). Na artrite reumatoide (AR), por exemplo, muitos estudos têm relatado que CCL2 está aumentada no soro e fluido sinovial de pacientes com AR, e isto está associado com o nível de atividade da doença. Os altos níveis de CCL2 no tecido sinovial promove uma infiltração excessiva de monócitos e estas células podem se diferenciar em macrófagos e osteoclastos, resultando em erosão óssea e destruição articular (STANKOVIC et al, 2009; LIOU et al, 2020, MOADAB et al, 2021).

Assim como na AR, muitas doenças também estão associadas com processos de perda óssea, tais como osteoartrite (OA), osteoporose, periodontite e artrites induzidas por infecções. A compreensão da fisiopatologia da reabsorção óssea nestas diferentes condições tem avançado e muitos fatores da resposta inflamatória têm sido identificados como moléculas chaves no mecanismo de perda óssea, incluindo IL-6, TNF, CCR2 e CCL2 (BINDER et al. 2009; RAGHU et al, 2017; SHEN et al. 2020; MOADAB et al, 2021). Recentemente, Flegar e colaboradores (2021), usando um modelo murino de artrite induzida por colágeno, demonstraram que a sinalização CCL2-CCR2 é responsável pela migração de células precursoras de osteoclastos (CPO), particularmente do subconjunto CCR2⁺, para os tecidos articulares e aumento da sua atividade osteoclastogênica. Além disso, o bloqueio farmacológico do eixo CCL2-CCR2 nos tempos iniciais da artrite mostrou-se altamente promissor, uma vez que reduziu a frequência de CPO e a reabsorção óssea nos animais (FLEGAR et al, 2021). Raghur et al. (2017) também relataram o papel patogênico da sinalização CCL2/CCR2 na patogênese da OA, no qual a ausência de CCL2 ou CCR2 protegeu os animais contra o desenvolvimento de OA, por promover uma redução no acúmulo de monócitos/macrófagos no tecidos articulares (RAGHU et al, 2017).

Em modelos animais de artrite induzidas por alfavírus, como RRV e CHIKV, o bloqueio de CCL2 com o Bindarit, um inibidor da sua síntese, promoveu uma melhora significativa no dano tecidual e reduziu a perda óssea (RULLI et al, 2009; Chen et al, 2014).

A dor é o sintoma mais relevante nas formas mais comuns de artrite (AR e OA) e considerada a principal causa de incapacidade, relatada por pacientes com essas condições (DANSEREAU et al, 2021). Na artrite induzida por alfavírus, a dor é também um sintoma clínico característico e altamente debilitante (HALSEY et al., 2013). Apesar das diferenças entre essas doenças, acredita-se que a inflamação desempenha um papel chave na sensibilização periférica e central da dor (SCHAIBLE et al, 2002). Além disso, tem se tornado cada vez mais evidente que a interação entre células imunes, glia e neurônios é importante para alterar a sensibilidade à dor e mediar a transição da dor aguda para a crônica. Dentre os fatores imunes associados ao comportamento da dor, a sinalização CCL2-CCR2 é a mais bem caracterizada com relação à sua capacidade de modular nocicepção (DANSEREAU et al, 2021).

A quimiocina CCL2 é descrita por ser liberada por vesículas sinápticas neuronais na medula espinhal e é um importante mediador de inflamação local e dor após lesão de nervo periférico (MORDILLO-MATEOS et al, 2019). A sua ligação ao CCR2, expresso por neurônios sensoriais, pode excitar diretamente estas células, contribuindo para comportamentos de dor aguda e crônica (ZAREBSKA et al, 2017). Muitos trabalhos tem demonstrado que a administração de CCL2 na medula espinhal induz hipersensibilidade mecânica dolorosa sustentada (TANAKA et al, 2004; KWIATKOWSKI et al, 2019). Enquanto que o bloqueio do CCR2 promove efeitos analgésicos em ratos neuropáticos, confirmando a importância desse eixo na nocicepção (KWIATKOWSKI et al, 2017).

Os mecanismos celulares pelo qual CCL2 induz sensibilização à dor ainda não são completamente compreendidos. No entanto, Zhang e colaboradores recentemente revelaram um mecanismo específico de sensibilização a jusante do eixo CCL2/CCR2. Eles mostraram que o eixo CCL2-CCR2 aumenta as correntes do NMDA, através ativação da cascata de sinalização ERK, que subsequente aumenta a função da subunidade GluN2B, induzindo a dor (**FIG. 10**). O NMDA (N-Metil-D-Aspartato) é um subtipo bem conhecido de receptor ionotrópico de glutamato abundantemente expresso na via de dor e o GluN2B é conhecido por desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção de dor crônica. Além disso, mostraram que o bloqueio da sinalização CCL2-CCR2 ou diretamente da via ERK pode reduzir a sensibilização central e a ocorrência de dor crônica (ZHANG et al, 2020).

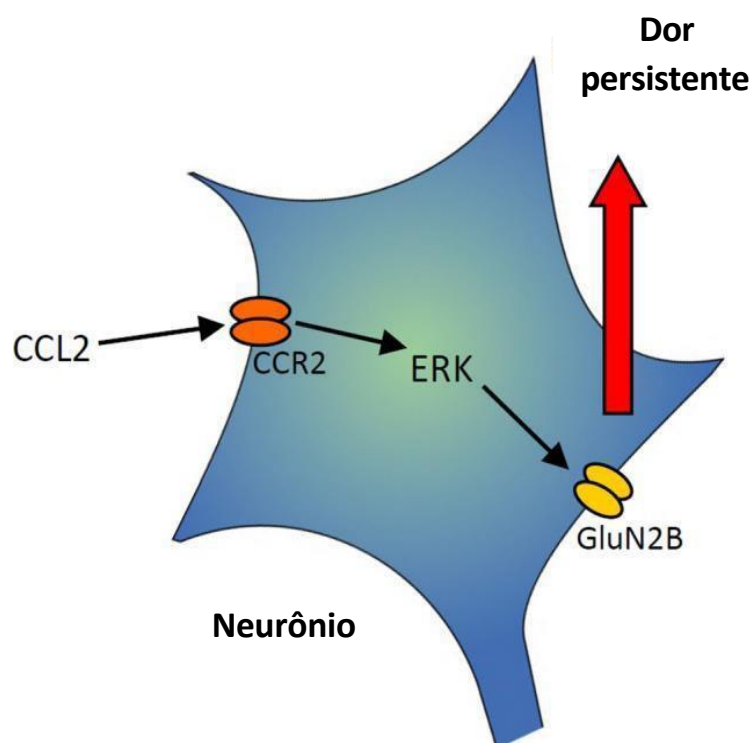


Figura 10. Diagrama do mecanismo de sensibilização à dor induzido por CCL2-CCR2. A ligação de CCL2 ao CCR2 ativa a sinalização ERK, que subsequentemente regula positivamente a expressão de GluN2B na membrana celular, induzindo a dor crônica. (Adaptado de Zhang et al, 2020)

2. Justificativa

O MAYV é atualmente considerado um relevante problema de saúde pública, uma vez que apresenta um grande potencial para emergência e é causador de doença reumática altamente debilitante. Os mecanismos celulares e moleculares associados a doença musculoesquelética e dor causada pelos alfavírus são ainda pouco compreendidos, e apesar da literatura sugerir que a resposta imune do hospedeiro contribui para o desenvolvimento da artrite e miosite para CHIVK e RRV, nenhum dado ainda foi demonstrado para o MAYV. Desta forma, a compreensão dos mecanismos e mediadores imunoinflamatórios envolvidos na fisiopatologia da infecção pelo MAYV é necessária, afim de se identificar possíveis alvos terapêuticos na prevenção e tratamento dessa importante doença humana.

3. Hipótese

A resposta inflamatória do hospedeiro mediada principalmente pelo eixo CCL2-CCR2 é responsável pelo desenvolvimento da doença induzida pelo MAYV.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do eixo CCR2-CCL2 na patogênese da infecção pelo Vírus Mayaro.

4.2 Objetivos específicos:

I-Padronizar um modelo de infecção por MAYV em camundongos da linhagem C57BL6j

I.1 Caracterizar os parâmetros clínicos de edema, hipernocicepção e dano tecidual;

I.2 Analisar o potencial do MAYV induzir perda óssea em camundongos WT;

I.3 Avaliar a resposta inflamatória (citocinas e quimiocinas), durante a cinética da infecção pelo MAYV;

I.4 Caracterizar o perfil celular inato e adaptativo, e a expressão do receptor de quimiocina CCR2 nessas células durante a cinética da infecção pelo MAYV camundongos;

II-Avaliar o papel do receptor CCR2 na doença induzida pelo MAYV, utilizando animais CCR2^{-/-};

I.5 Determinar a influência de CCR2, comparando animais CCR2^{-/-} e WT, nos parâmetros clínicos de doença: edema, hipernocicepção e dano inflamatório tecidual;

I.6 Analisar o papel de CCR2, comparando animais CCR2^{-/-} e WT, na perda óssea;

I.7 Definir o perfil de resposta imune, mediadores e células, nos animais CCR2^{-/-} durante a cinética de infecção;

III. Avaliar o tropismo do MAYV e a resposta à infecção, *in vitro*, de macrófagos, osteoclastos e osteoblastos primários isolados a partir de animais selvagens e nocautes para o CCR2.

IV. Avaliar *in vivo* o papel da citocina pró-inflamatória e osteoclastogênica IL-6 na perda óssea induzida pelo MAYV.

5. Materiais e métodos

5.1 Células, vírus e titulação

A cepa do vírus Mayaro é um isolado humano do Peru (2001) obtido do Centro de Referência Mundial para Vírus Emergentes e Arbovírus da Universidade do Texas Medical Branch. Os estoques de MAYV foram produzidos em células Vero CCL-81 (linhagem de células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano) obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Resumidamente, as células Vero foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Cultilab, Brasil) e 1% de Penicilina/Estreptamicina/Glutamina (GIBCO), e mantidas em um incubadora umidificada a 37°C com atmosfera de 5% CO₂ por 4 dias. O sobrenadante celular foi coletado, centrifugado (2000 rpm por 10 min) e depois concentrado usando um concentrador centrífugo Vivacell 100 (Sartorius). Para a titulação do MAYV, as células Vero foram plaqueadas em placas de 24 poços (3x10⁵ células por poço) e incubadas a 37°C com 5% de atmosfera de CO₂. Após as células atingirem 90% de confluência, o meio das placas foi removido e 100ul de cada diluição seriada de 10 vezes foi adicionada. As placas foram incubadas por 72 horas (37°C com 5% de atmosfera de CO₂), e então fixadas com formaldeído 10% e coradas com cristal violeta 1%. As placas foram contadas a olho nu e a carga viral foi expressa em PFU/ml (Unidade formadora de Placa).

5.2 Declaração Ética

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as normas de ética e experimentação animal do governo brasileiro (Lei 11.794/2008). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, Protocolo nº 160/2018). Os procedimentos invasivos foram realizados sob anestesia com cetamina/xilazina e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais. (ANEXO2)

5.3 Infecção de animais

Camundongos C57/BL6j machos com quatro semanas de idade (tipo selvagem - WT) foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG. Camundongos deficientes para o receptor CCR2 (CCR2^{-/-}) e IL-6 (IL-6^{-/-}) foram obtidos do Biotério de Imunofarmacologia da UFMG. Camundongos WT e CCR2^{-/-} foram infectados no coxim plantar pata direita traseira com 1x10⁶ PFU/ml de MAYV, com um volume final de 30µl. Os grupos controles foram inoculados com 30µl de sobrenadante de cultura de células C6/36.

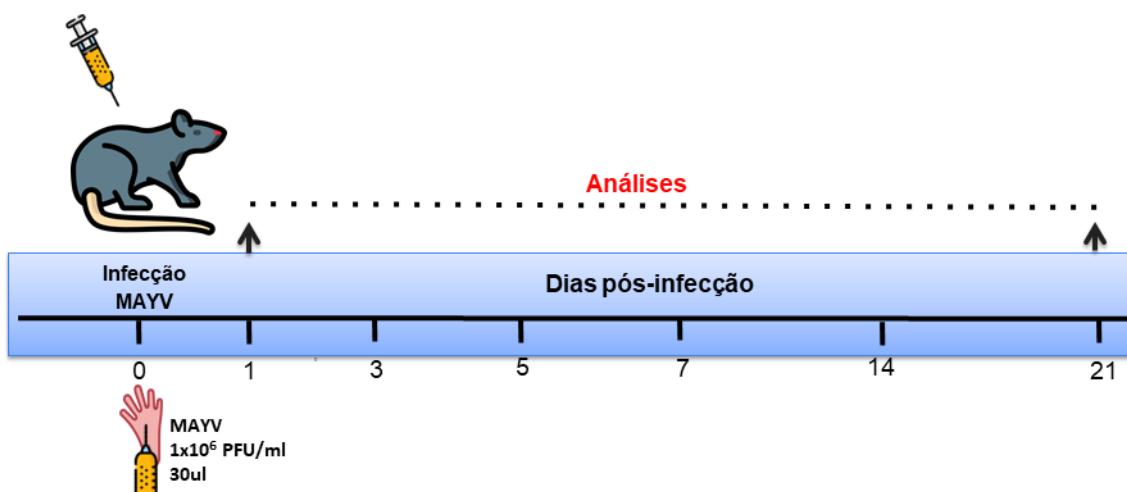


Figura 11. Estratégia experimental de infecção e avaliação dos parâmetros de doença para estabelecimento de um modelo animal para o MAYV em camundongos da linhagem C57/BL6j.

5.4 Avaliação dos parâmetros da doença

Os camundongos foram observados durante 21 dias após a infecção. Durante esse período, a cada 24 horas, os camundongos foram avaliados quanto a sinais de doença, como perda de peso e piloereção. Além disso, os animais também foram avaliados quanto ao aparecimento de edema na pata. O edema foi quantificado com o auxílio de um paquímetro e as medidas foram realizadas na pata infectada (pata direita) nos tempos 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21 dias após a infecção.

5.5 Avaliação da hipernocicepção por um teste de medidor de pressão eletrônico modificado pelo método de von Frey

A técnica de von Frey baseia-se na utilização de um aparelho que possui um transdutor de pressão adaptado a uma ponta de polipropileno padrão grande ($0,5 \text{ mm}^2$) (INSIGTH Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil), conectado a um contador de força digital expresso em gramas (g). A hipernocicepção foi avaliada conforme descrito por Costa et al., 2012. Resumidamente, os camundongos foram colocados em caixas de acrílico com piso de arame não maleável por 15 minutos para aclimação. Em seguida, os limiares nociceptivos foram determinados exercendo uma pressão crescente no centro da pata do animal com o transdutor de pressão, até induzir o reflexo de flexão da articulação do joelho, seguida de uma resposta de retirada da pata. O medidor de pressão registra automaticamente o valor da pressão quando a pata é removida. Foram realizadas duas medidas a cego por animal em cada tempo analisado e foi utilizada a média. As medições de todos os grupos foram realizadas inicialmente antes da infecção (medida basal, tempo 0) e nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 pós- infecção.

5.6 Ensaio ELISA

Para avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas durante a infecção, o plasma e tecidos de interesse foram coletados em diferentes tempos pós-infecção e avaliados por ELISA usando anticorpos comercialmente disponíveis e de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C até o processamento. Os tecidos foram macerados em tampão de citocinas, centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado até a realização do ELISA. Os resultados foram expressos em pg/mL ou pg/100 mg de tecido. O limite de detecção dos ensaios ELISA estava na faixa de 4–8 pg/ml.

5.7 Análise de micro-CT

Após a eutanásia, a pata traseira direita e a maxila dos camundongos foram removidas, fixadas em formol 10% por 24h e então transferidas para álcool 70%, onde foram mantidas até a análise no micro-CT. As amostras foram digitalizadas em um scanner micro-CT compacto de mesa (SkyScan 1174, Bruker micro-CT, Bélgica) operando a 50 kV de tensão de fonte, corrente de fonte de 800 μ A, tamanho de pixel de 14,59 μ m e um filtro de Al de 0,5 mm. As amostras foram fixadas em uma platina que girava 180° com imagens adquiridas a cada 0,7°. As projeções de sombra adquiridas (formato TIFF de 16 bits) foram posteriormente reconstruídas em fatias 2D usando a interface do software NRecon. Análises 3D foram realizadas na ferramenta SkyScan CTAn, e modelos 3D foram observados na interface SkyScan CTVol.

5.8 Análise histopatológica

Após a eutanásia, os tecidos de interesse foram removidos e fixados em formol 10%. Para análise da articulação do tornozelo as amostras foram descalcificadas em EDTA 10%, pH 7,0. Em seguida, os tecidos foram incluídos em parafina e foram realizados cortes de 5 μ m. A análise do dano tecidual e do infiltrado inflamatório foi realizada em lâminas coradas de hematoxilina e eosina (H & E). Para avaliar a osteoclastogênese, lâminas selecionadas das articulações do joelho foram coradas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e contrastadas com hematoxilina de acordo com as instruções do fabricante.

5.9 Isolamento de células imune da pata para imunofenotipagem

O coxim da pata e a articulação do tornozelo de camundongos controle e infectados com MAYV foram coletadas em 1 e 7 dias após a infecção. Para o isolamento das células do coxim plantar e do tornozelo, os tecidos foram retirados e colocados em 1 mL de meio de digestão contendo Colagenase VIII (1 mg/mL; Sigma-Aldrich) em meio DMEM completo. Os tecidos foram mantidos por 1h em banho-maria a 37°C. Em seguida, os tecidos digeridos foram

depositados em um filtro de células de 40µm e foram adicionados 3 ml de meio DMEM completo. Os tecidos digeridos foram macerados contra o filtro com um êmbolo de seringa de 3mL, fazendo movimentos circulares para liberar o maior número de células no meio. As células foram então centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos a 4°C e suspensas em 1mL de meio completo. A viabilidade celular foi avaliada com Trypan Blue.

5.10 Fenotipagem de leucócitos

As células isoladas da pata foram plaqueadas em uma placa de 96 poços com fundo em forma de U para realizar a marcação. Primeiramente, a placa foi centrifugada a 2.000 rpm por 10 min a 4°C para remoção do meio. As células foram suspensas em 20µl de bloqueador Fc (BD Biosciences) por 15 minutos. A marcação foi realizada utilizando anticorpos conjugados com fluoróforos anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD69, -CD44, -CD62L, -CCR2, -CD11c, -F4/80, -CD11b, -Ly6G, -Ly6C, -MHCII, -CD80, por 30 min. Em seguida, foram adicionados 200 µl de BSA a 1% e as células foram centrifugadas para remover o excesso de anticorpo. As células foram suspensas em 200 µl de 1% BSA e os dados foram adquiridos usando um BD FACS CANTO II e a análise realizada usando o software FlowJo.

5.11 Cultura de células

Para realizar as culturas primárias de osteoblastos, osteoclastos e macrófagos, células de medula óssea derivadas de camundongos WT e CCR2^{-/-} foram isoladas e mantidas em cultura para crescimento, em meio α -MEM com 10% SBF a 37°C e 5% CO₂. Para a cultura de osteoblastos as células foram então plaqueadas em placas de 96 (3x10³) ou 24 poços (1x10⁴) e a diferenciação foi induzida com meio osteogênico (meio α -MEM 10% mais ácido ascórbico 100µM e fosfato de potássio 1,8nM – KH₂PO₄) por 7 ou 14 dias. A cada dois dias o meio foi substituído por um novo meio. Após a diferenciação, as células foram infectadas com MAYV (MOI1) e o sobrenadante celular coletado em diferentes momentos pós-infecção. Para avaliar o efeito do bloqueio de CCR2 na cultura de osteoblastos, as células foram primeiramente tratadas 1h antes da infecção com antagonista RS504393 a uma concentração de 300nM por poço. Várias análises foram realizadas, incluindo titulação viral, ELISA, viabilidade celular (MTT) e marcação com fosfatase alcalina. Para cultura de macrófagos as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (3x10³) e a diferenciação foi induzida com 50 ng/ml de M-CSF por 3 dias. Após a diferenciação, as células foram infectadas com MAYV (MOI1) e o sobrenadante celular coletado em diferentes momentos pós-infecção para análise. Para a cultura de osteoclastos as células foram então plaqueadas em placas de 96 poços (3x10³) e a diferenciação foi induzida com 50ng/ml de M-CSF e 50ng/ml de RANKL (R&D Systems) por 5 dias. A cada dois dias o meio foi substituído por um novo meio com M-CSF e RANKL. Após a diferenciação, as células

foram infectadas com MAYV (MOI 1) e o sobrenadante celular coletado em diferentes momentos pós-infecção. Diversas análises foram realizadas, incluindo titulação viral, ELISA, viabilidade celular (MTT) e coloração com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA).

5.12 Silenciamento da quimiocina *ccl2* com siRNA

Nanopartículas que transportam SiRNA-MCP1 (NP-SiRNA-CCL2) foram sintetizadas de acordo com Krohn-Grimberghe et al (2020). Para o silenciamento da quimiocina CCL2, animais C57BL6j de 4 semanas de idade foram divididos em 3 grupos experimentais: i) Sham: Recebeu apenas PBS; ii) MAYV: Infectado e III) MAYV + SiRNA-CCL2: infectado e tratado. Os animais foram tratados com 1mg/kg de SiRNA-CCL2 por via intravenosa. A estratégia de tratamento incluiu um pré-tratamento durante 3 dias, em intervalos de 24h, antes da infecção e tratamentos pós-infecção nos dias 2 e 5. Após a infecção, os animais foram avaliados para parâmetros de doença, como edema e hipernociceção em tempos definidos. No dia 7 PI, realizada a eutanásia dos animais e os tecidos de interesse foram removidos para as seguintes análises, carga viral, histologia, elisa, citometria de fluxo e expressão gênica (FIG. 12).

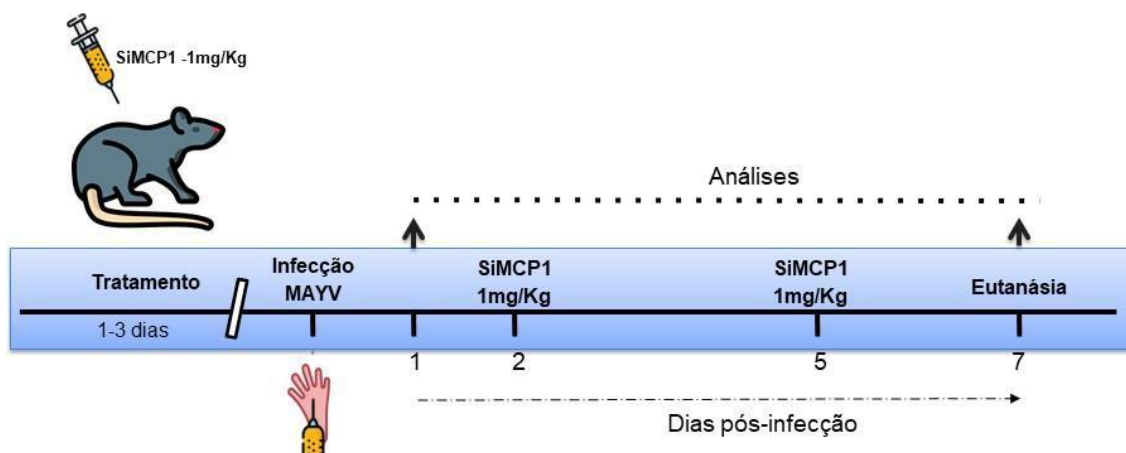


Figura 12. Delineamento experimental do silenciamento da quimiocina CCL2 com SiMCP1.

5.13 Transcrição reversa e análise por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os camundongos WT foram infectados e após a eutanásia a maxila e pata foram removidas e armazenadas a -80°C até o processamento. Para extração de RNA total, as amostras foram primeiramente trituradas em nitrogênio líquido e seguidas de extração com Trizol de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada com iniciadores aleatórios e seguindo as orientações do iScript cDNA Synthesis Kit- Bio-Rad. A reação de PCR em tempo real foi realizada da seguinte forma: 2 μl de produto RT (concentração de 50ng), 1 μl de cada primer, 5 μl de Syber Green (qPCR Master Mix - Bio-Rad) e 2 μl de água. As condições para PCR foram as seguintes: 95 C – 2 min, seguido de 40 ciclos de 95 C – 15 s; 60

C – 1 min e 72 C – 20 s. Os valores de eficiência/inclinação obtidos de todos os genes investigados estavam próximos dos valores ótimos necessários para a análise 2(-Delta Ct). Os valores de Ct foram registrados para cada gene e os resultados referentes aos genes de interesse foram normalizados aos resultados obtidos com o gene de controle interno, GAPDH, PPIA ou RPS18. Os valores de $\Delta\Delta\text{CT}$ foram calculados e os resultados foram expressos como aumento de vezes, conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). A sequência de cada iniciador usado nas reações está descrita na tabela abaixo:

Tabela 1. Sequência iniciadores

Iniciador	Sequência
GAPDH	F5'ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA3' R5'CTCCCTTCGATCCTACAGTAATG3'
CathepsinaK	F5'CTCCCTTCGATCCTACAGTAATG3' R5'TCAGAGTCAATGCCTCCGTTTC3'
Osteocalcina	F 5'AAGCCTTCATGTCCAAGCAGG3' R5'TTTGTAGGCGGTCTTCAAGCC3'
Periostina	F5'AAACCTCAGCAGGCGCTT3' R5'CCCCTGGATTACCCTTGAGAA3'
RANKL	F5'GTACTIONTCGAGCGCAGATGG3' R5'CCAGAGTCGAGTCCTGCAA3'
OPG	F5'ACCCAGAAACTGGTCATCAGC3' R5'CTGCAATACACACTCATCACT3'
PPIA	F:5'CAAACACAAACGGTCCAG3' R:TTCACCTTCCCAAAGACCAC3'
RPS18	F:5'TAGCCTTTGCCATCACTGCC3' R:5'CATGAGCATATCTCCGGCCC3'
CCL7	F:5'TGGGAAGCTGTTATCTTCAAHACA3' R:5'CTCGACCCACTTCTGATGGG3'
CCL2	F5'-TAAAAACCTGGATCGGAACCAA3' R5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT-3'
TNF	F5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT3' R5'-GCTACGACGTGGGCTACAG3'
IL-6	F5'-TGTTCTCTGGGAAATCGTGAA3' R5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATA3'
CCL5	F5'-CAAGTGCTCCAATCTTGCAGTC3' R5'-TCCTCTGGGTTGGCACACAC3'

5.14 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad PRISM 6.0 (GraphPad Software, EUA). Resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos. As diferenças

foram comparadas usando análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou teste t não pareado.

6. Resultados

6.1 Caracterização da doença induzida pelo MAYV em camundongos C57BL6

O primeiro passo deste trabalho foi caracterizar a doença induzida pelo MAYV em camundongos C57BL6 jovens. Para esse fim, camundongos de 4 semanas de idade foram infectados com MAYV e avaliados quanto a sinais de doença, incluindo hipernocicepção, cargas virais, disseminação de patógenos e danos nos tecidos durante o curso da infecção. O MAYV induziu edema significativo da pata traseira e reduziu o limiar nociceptivo logo após 1 dia pós-infecção (PI) (FIG. 13A e 1B). O edema da pata traseira atingiu o pico no dia 5PI e persistiu por até 15 dias PI (FIG. 13A). O limiar nociceptivo permaneceu baixo por um longo período após a infecção, retornando aos níveis basais no dia 35.

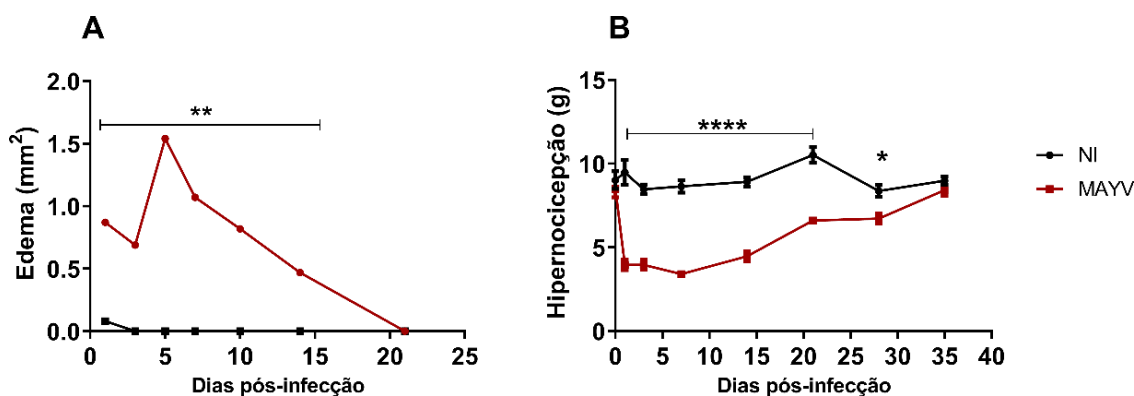


Figura 13. A infecção do MAYV induziu edema e diminuiu o limiar de hipernocicepção em camundongos C57BL6. Camundongos com 4 semanas de idade foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU e o grupo controle recebeu sobrenadante de células C6/36. (A) As medidas do edema foram realizadas na pata infectada (pata direita) com o auxílio de um paquímetro. A análise estatística foi realizada com teste t não pareado (P valor $< 0,05$). (B) A avaliação do limiar de hipernocicepção foi realizada pelo método de von Frey. A análise estatística foi realizada com Two-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni (P valor $< 0,05$). As análises são representativas de pelo menos 5 animais por grupo.

Os sinais clínicos apresentados pelos animais foram associados a danos inflamatórios nos tecidos da pata traseira (FIG. 14A e B). O MAYV induziu infiltração de células inflamatórias no local da infecção, predominantemente de células mononucleares, e também miosite, com perda da arquitetura tecidual. O pico de dano tecidual ocorreu no dia 7 PI (FIG. 14A, B v e vi). Nos dias 14 e 21 PI ainda havia presença de infiltrado inflamatório, mas o início da recuperação tecidual já era evidente, conforme indicado pela presença de fibras musculares em regeneração (FIG. 14B vii-x). A análise de carga viral demonstrou que o MAYV infectou e se espalhou para diferentes tecidos do hospedeiro, incluindo a articulação e músculo contralateral, persistindo nas articulações do tornozelo, quadríceps, pata, olho e maxila (FIG 15A e B).

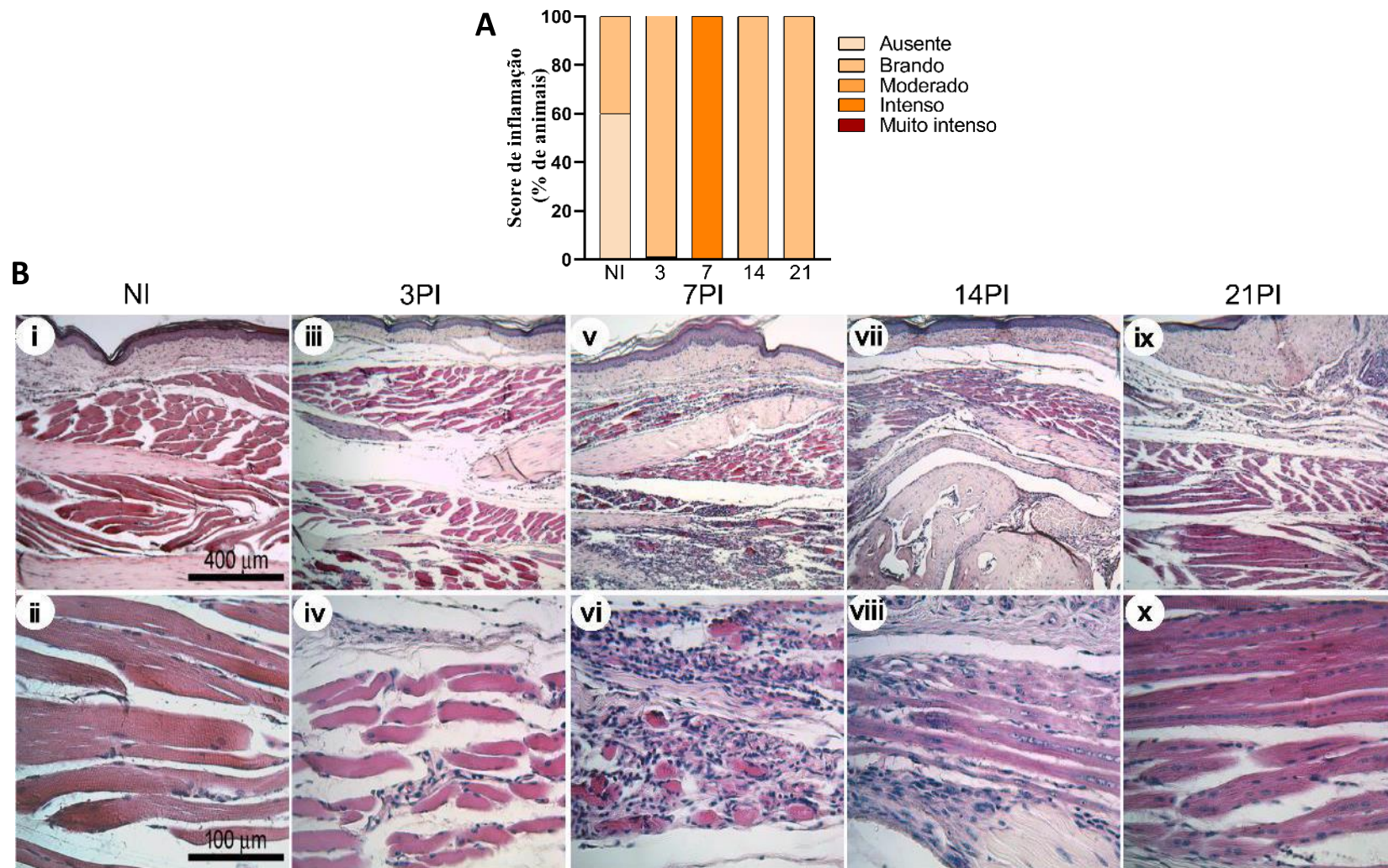


Figura 14. A infecção do MAYV induziu miosite em camundongos da linhagem C57BL6. Camundongos com 4 semanas de idade foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU e o grupo controle recebeu sobrenadante de células C6/36. (Continua na seguinte página)

(continuação da legenda da Figura 14) (A) Avaliação da intensidade de inflamação. Nos dias 3, 7, 14 e 21 dias p.i. os camundongos foram sacrificados e os tecidos da pata foram removidos, embebidos em parafina e seções de 5 μm foram geradas e coradas com HE. O painel B mostra o controle negativo (i e ii); infecção por MAYV no dia 3PI (iii e iv); infecção por MAYV no dia 7PI (v e vi); infecção por MAYV no dia 14PI (vii e viii); Infecção por MAYV no dia 21PI (ix e x). Imagens i, iii, v, vii and ix (aumento de 100X, barra de 400 μm); imagens ii, iv, vi, viii and x (aumento de 400X, barra de 100 μm). As análises são representativas de pelo menos 5 animais por grupo.

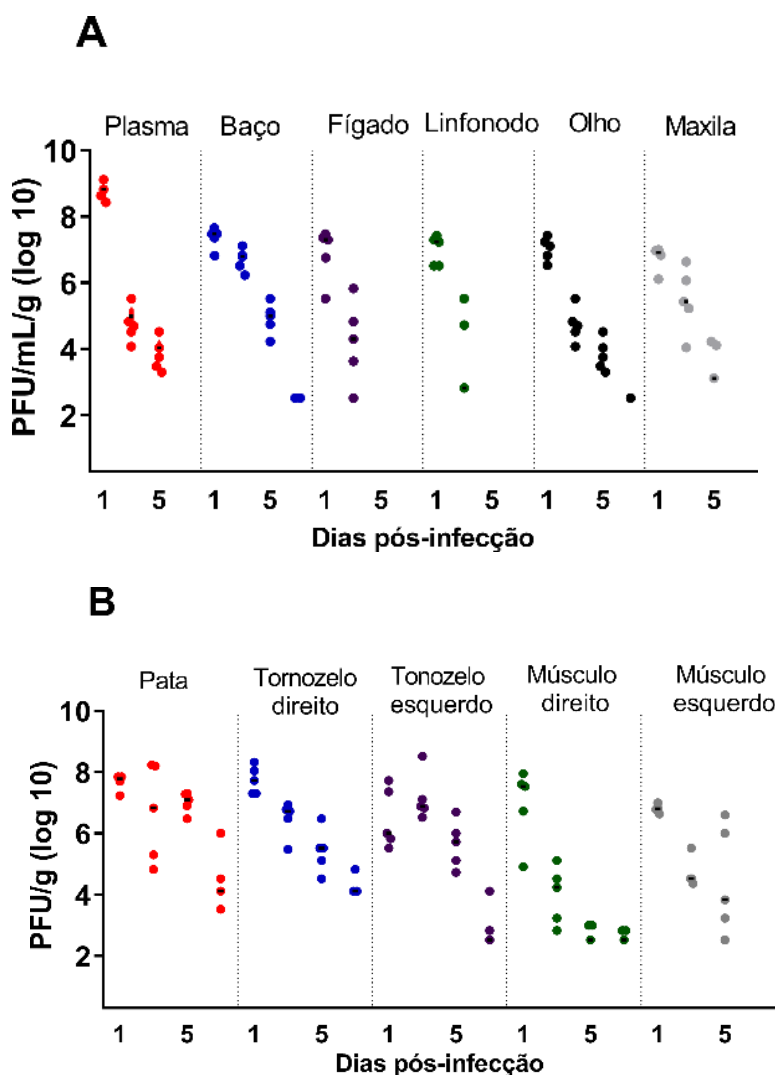


Figura 15. Carga do MAYV em órgãos e tecidos. Camundongos com 4 semanas de idade foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU e o grupo controle recebeu sobrenadante de células C6/36. (A e B) Nos dias 1, 3, 5 e 7 PI o plasma e os tecidos de interesse foram coletados, homogeneizados e a quantidade de vírus infeccioso foi determinada por ensaio de placa em células Vero. N=5 animais por grupo.

A infecção pelo MAYV induziu um aumento acentuado nos níveis locais (FIG 16A) e sistêmicos (FIG 16E-H) de CCL2, permanecendo elevado até 14 dias PI na pata, maxila, músculo e baço. A quimiocina CCL5 foi detectada nos tecidos do quadríceps e da pata (FIG 16B e I). A presença das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF foi detectada apenas no coxim plantar com pico no dia 7PI (FIG 16C e D).

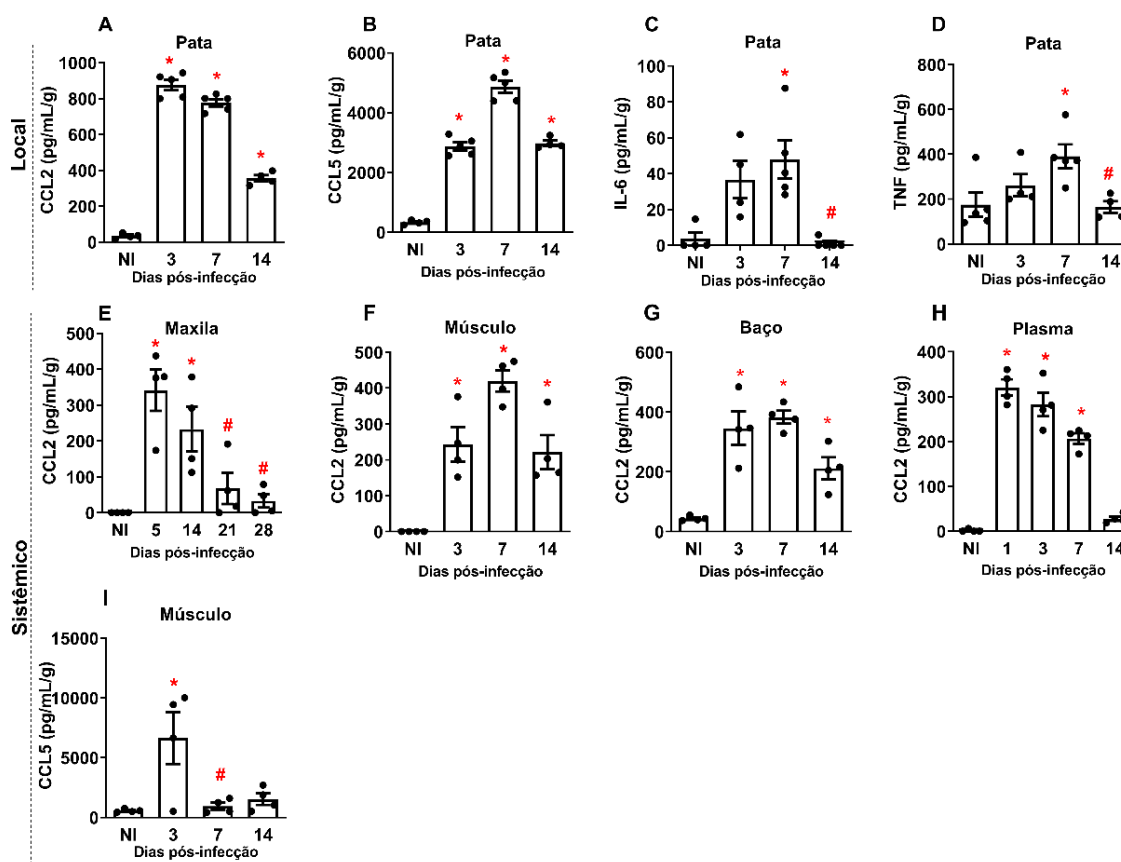


Figura 16. MAYV induziu a produção de mediadores inflamatórios locais e sistêmicos em camundongos C57BL6. O perfil local de citocinas foi caracterizado por um aumento inicial nos níveis das quimiocinas CCL2 (A) e CCL5 (B), seguido pela produção das citocinas inflamatórias IL-6 (C) e TNF (D). A análise do perfil de mediadores inflamatórios sistêmico detectou a presença da quimiocina CCL2 em diferentes tecidos, como maxila (E), músculo (F), baço e plasma (H) e CCL5 no músculo (I). A análise estatística foi realizada com One- way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos quatro camundongos por grupo.

6.2 A infecção pelo MAYV induz a perda óssea local e sistêmica

A resposta inflamatória induzida pela infecção do MAYV foi caracterizada por um forte perfil osteoclastogênico, como demonstrado pelo aumento da expressão local de IL-6, TNF e CCL2, e alta expressão sistêmica de CCL2. Para avaliar o impacto da infecção pelo MAYV no tecido ósseo, as amostras foram submetidas à análise de microtomografia computadorizada (μ CT) nos dias 14 e 21 PI na tíbia e 21 dias PI na maxila. As análises de μ CT demonstraram que MAYV induziu perda óssea na região da metáfise tibial distal e na maxila dos camundongos, sugerindo que o MAYV é capaz de induzir perda óssea sistêmica. Na tíbia houve redução de aproximadamente 5% do volume ósseo (FIG. 17A) e 20% da espessura trabecular (FIG. 5B), acompanhada de aumento da porosidade (FIG. 17C, D e E). Além disso, as análises histológicas da tíbia proximal também mostraram uma redução no osso trabecular (FIG. 18A) e um aumento no número de células TRAP⁺ em animais infectados (FIG. 18B).

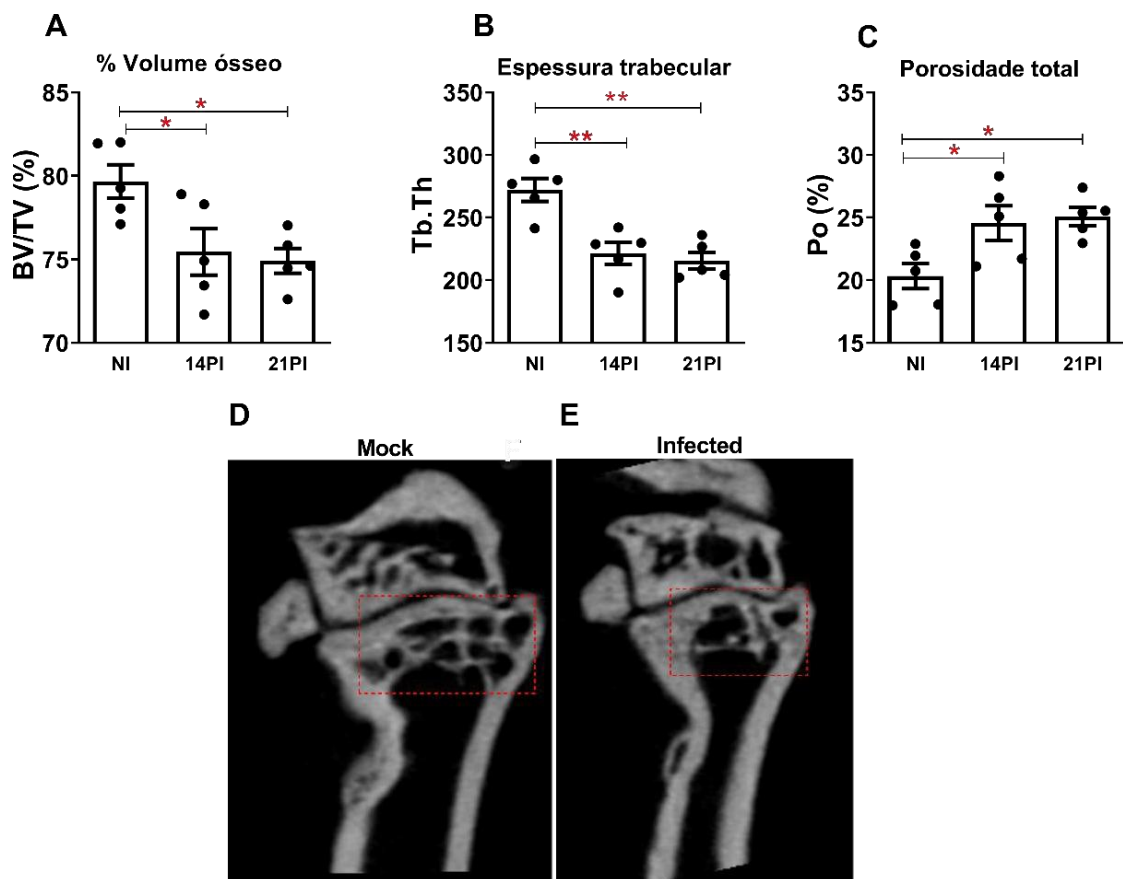


Figura 17. MAYV induz perda óssea na tíbia de camundongos C57BL6. Camundongos de 4 semanas de idade foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU de MAYV. O grupo controle foi inoculado com sobrenadante de células C6/36. Nos dias 14 e 21 PI os animais foram eutanasiados e a tíbia foi removida para análise de microCT. (A) Fração do volume ósseo trabecular. (B) Espessura trabecular. (C) Número trabecular. (D) reconstrução 2D da tíbia distal de animais não infectados. (E) reconstrução 2D da tíbia distal de animais infectados. Quadro vermelha: região de análise. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

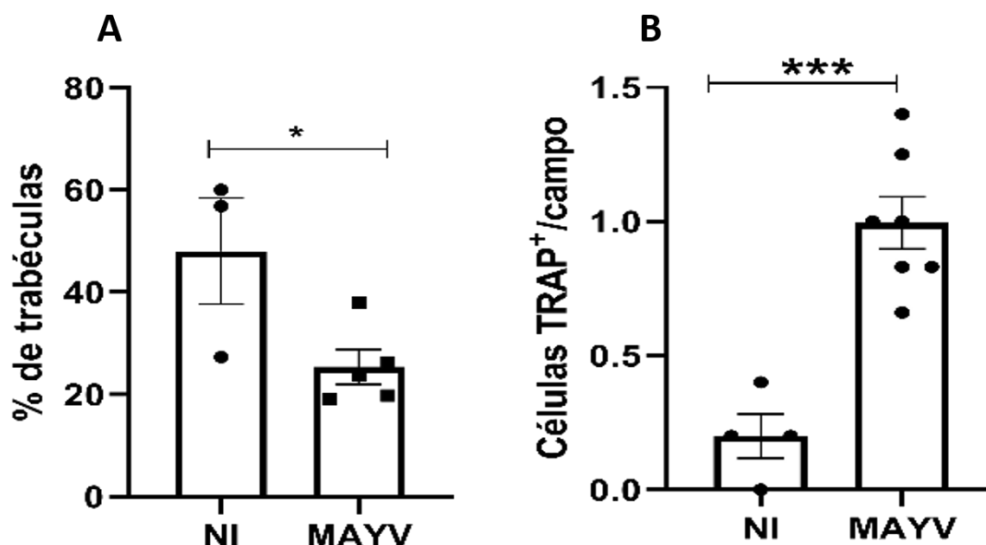


Figura 18. A infecção do MAYV afeta o osso trabecular. Análise da porcentagem de trabéculas e células TRAP⁺ em camundongos WT infectados e controle. (A) A contagem do número de trabéculas foi realizada por meio do programa ImageJ. (B) Contagem de células TRAP⁺ na tíbia proximal. A análise estatística foi realizada usando o teste t de Student.

Na maxila não houve redução significativa do volume ósseo total (FIG. 19A), porém observamos diminuição da espessura trabecular (FIG. 19B) e aumento da porosidade óssea (FIG. 19C, D e E). A presença de células TRAP⁺ na maxila foi significativamente maior aos 7 d.p.i, indicando que a diferenciação e atividade dos osteoclastos ocorre no início da infecção (FIG. 20).

A análise gênica associada ao metabolismo ósseo na maxila demonstrou que a infecção pelo MAYV afetou a homeostase tecidual. Com 21 dias PI observou-se aumento na expressão da catepsina K, enzima produzida pelos osteoclastos e associada à reabsorção óssea (FIG. 21A). Paralelamente, também houve aumento nos níveis de expressão da periostina a partir do 14º dia PI, um fator associado à atividade osteoblástica na formação óssea (FIG. 21B). No entanto, a razão RANKL:OPG e a expressão de mRNA de osteocalcina, também fatores importantes no metabolismo ósseo, não foram afetados pela infecção do MAYV (FIG. 21 C e D).

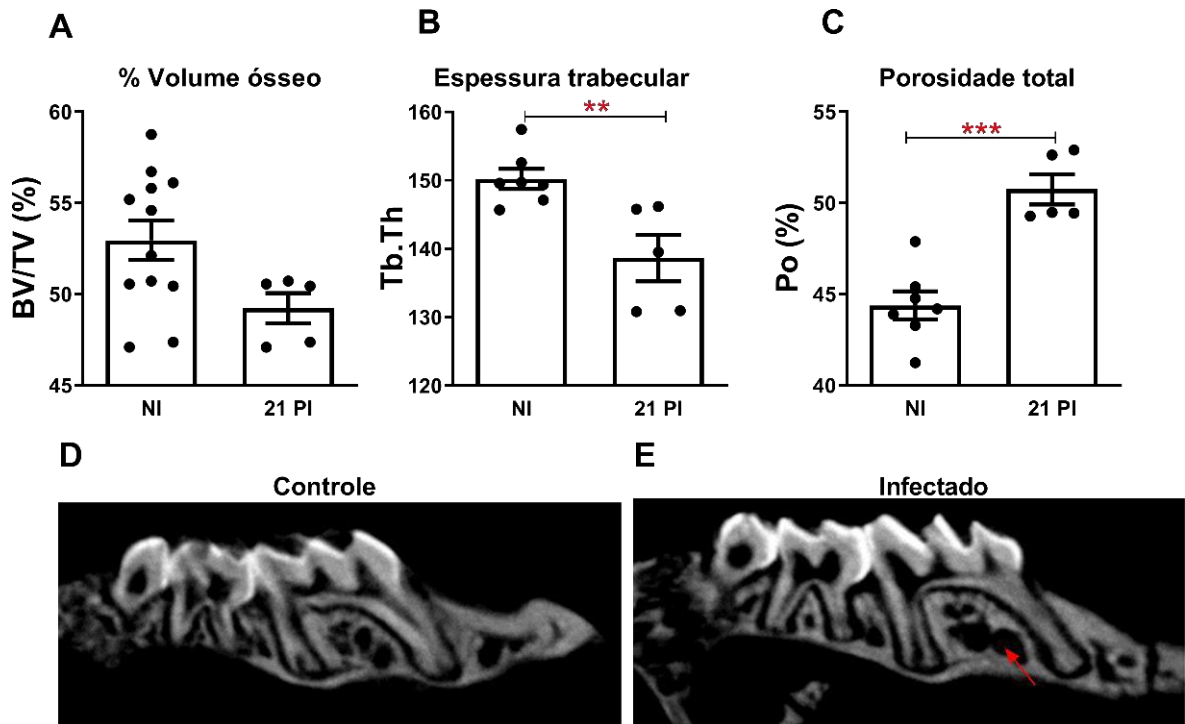


Figura 19. O MAYV causa perda óssea sistêmica em camundongos C57BL6. Camundongos de 4 semanas de idade foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU de MAYV. O grupo controle foi inoculado com sobrenadante de células C6/36. No dia 21 PI os animais foram eutanasiados e a maxila foi removida para análise de microCT. (A) Fração do volume ósseo trabecular. (B) Espessura trabecular. (C) Número trabecular. (D) Reconstrução 2D da maxila de animais não infectados. (E) Reconstrução 2D da maxila de animais infectados. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

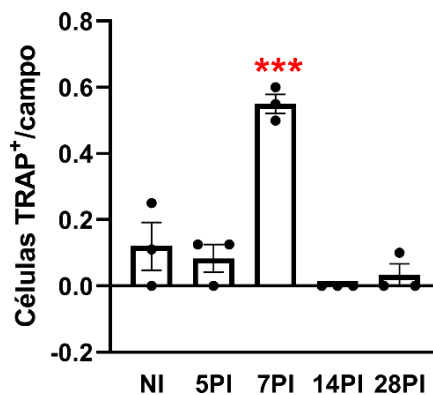


Figura 20. Marcação de células TRAP⁺ na maxila. Contagem de células TRAP⁺. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos três animais por grupo.

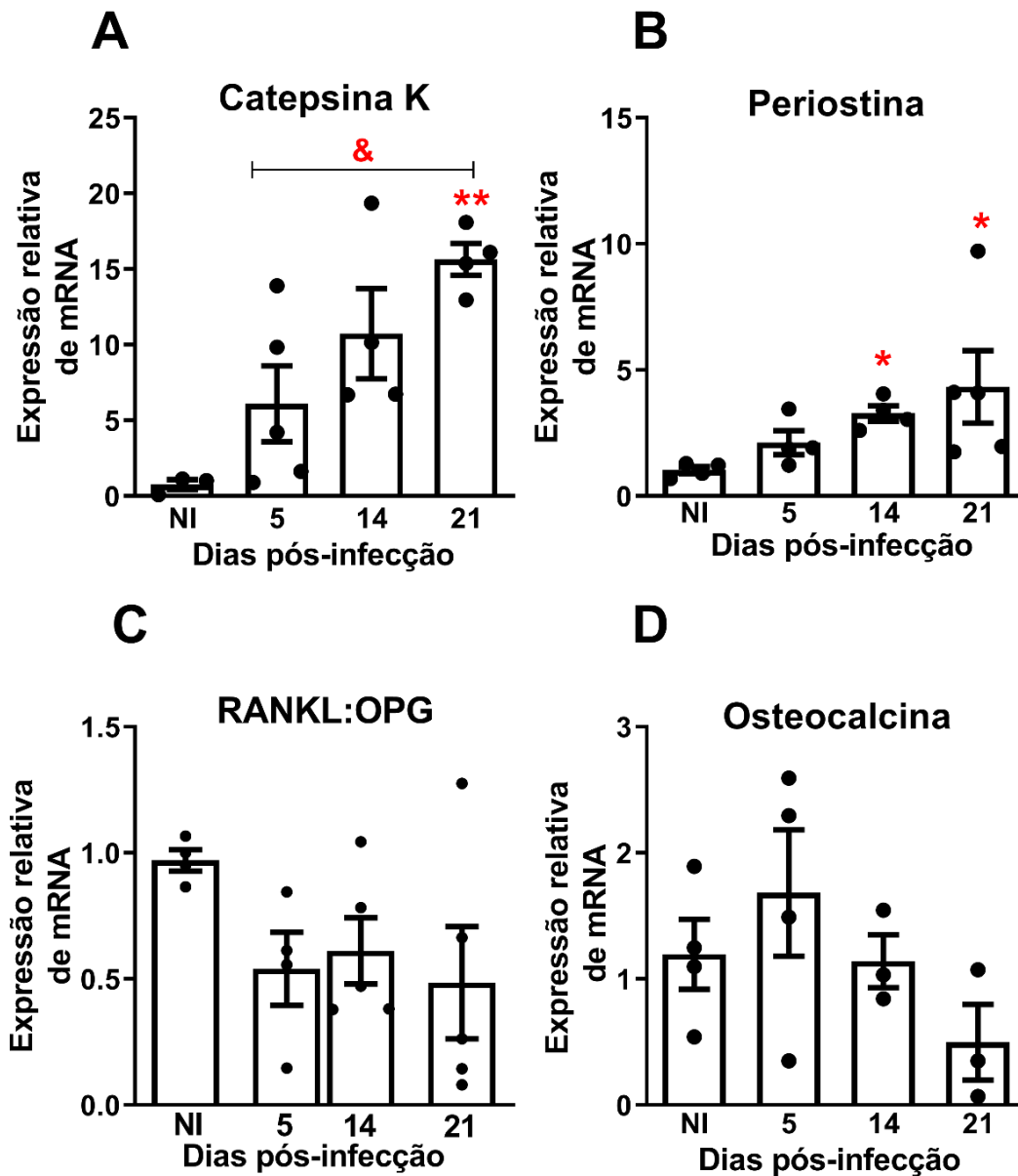


Figura 21. Análise da expressão de genes do metabolismo ósseo na maxila de camundongos C57BL6. Camundongos de 4 semanas de idade foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU de MAYV. O grupo controle foi inoculado com sobrenadante de células C6/36. No dia 21 PI os animais foram eutanasiados e a maxila foi removida para extração de RNA. A análise de qRT-PCR foi realizada pela expressão relativa dos genes de interesse em relação ao endógeno GAPDH. (A) Catepsina K. (B) Periostina. (C) Relação RANKL: OPG. (D) Osteocalcina. A análise estatística foi realizada com One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

6.3 O receptor CCR2 e a quimiocina CCL2 desempenham um papel importante no desenvolvimento da doença induzida por MAYV

Para entender o papel do eixo CCR2-CCL2 na patogênese do MAYV, primeiramente camundongos WT e CCR2^{-/-} de 4 semanas de idade foram infectados com o MAYV para avaliar o desenvolvimento da doença. Diferentemente do observado nos animais WT, os animais CCR2^{-/-} apresentaram edema tardio de pata, com pico no dia 10 PI (FIG. 22A). A análise de hipernocicepção revelou uma redução no limiar de hipernocicepção em ambos os camundongos WT e CCR2^{-/-} infectados no dia 3PI (FIG. 22B), sem diferença entre os grupos. No entanto, a partir do 7º dia PI, os animais CCR2^{-/-} se recuperaram e retornaram aos seus níveis basais, enquanto os animais WT começaram a se recuperar aos níveis basais a partir do 15º dia PI.

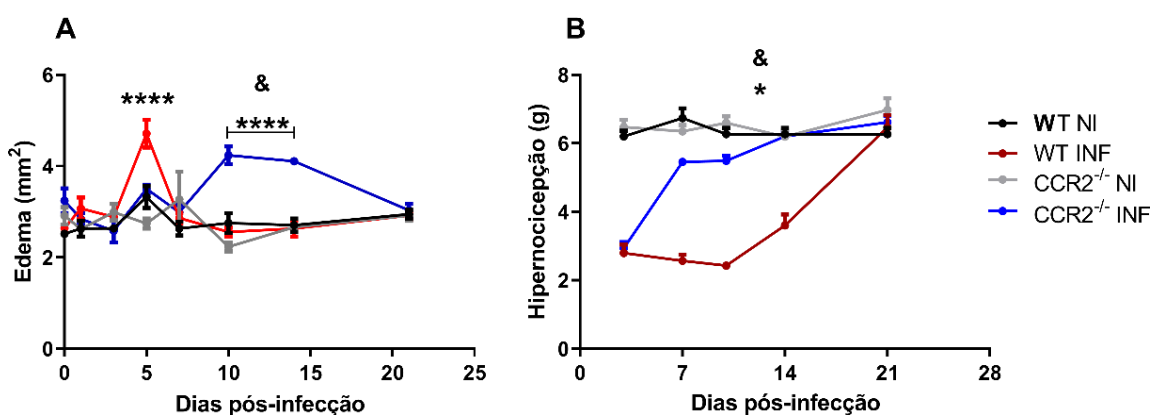


Figura 22. O MAYV induz edema tardio e altera o limiar de hipernocicepção em camundongos CCR2^{-/-}. Camundongos com 4 semanas de idade WT e CCR2^{-/-} foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10⁶ PFU de MAYV. O grupo controle foi inoculado com sobrenadante de C6/36. (A) Medição do edema plantar. (B) Medição do limiar de hipernocicepção. A análise de estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Como observado nos animais WT, o MAYV também foi detectado no plasma e em vários órgãos e tecidos dos animais CCR2^{-/-}, no entanto, os títulos de carga viral foram significativamente menores no plasma, baço, fígado, articulação direita, articulação esquerda, músculo direito, músculo esquerdo e na pata em relação aos animais WT (FIG. 23A e B).

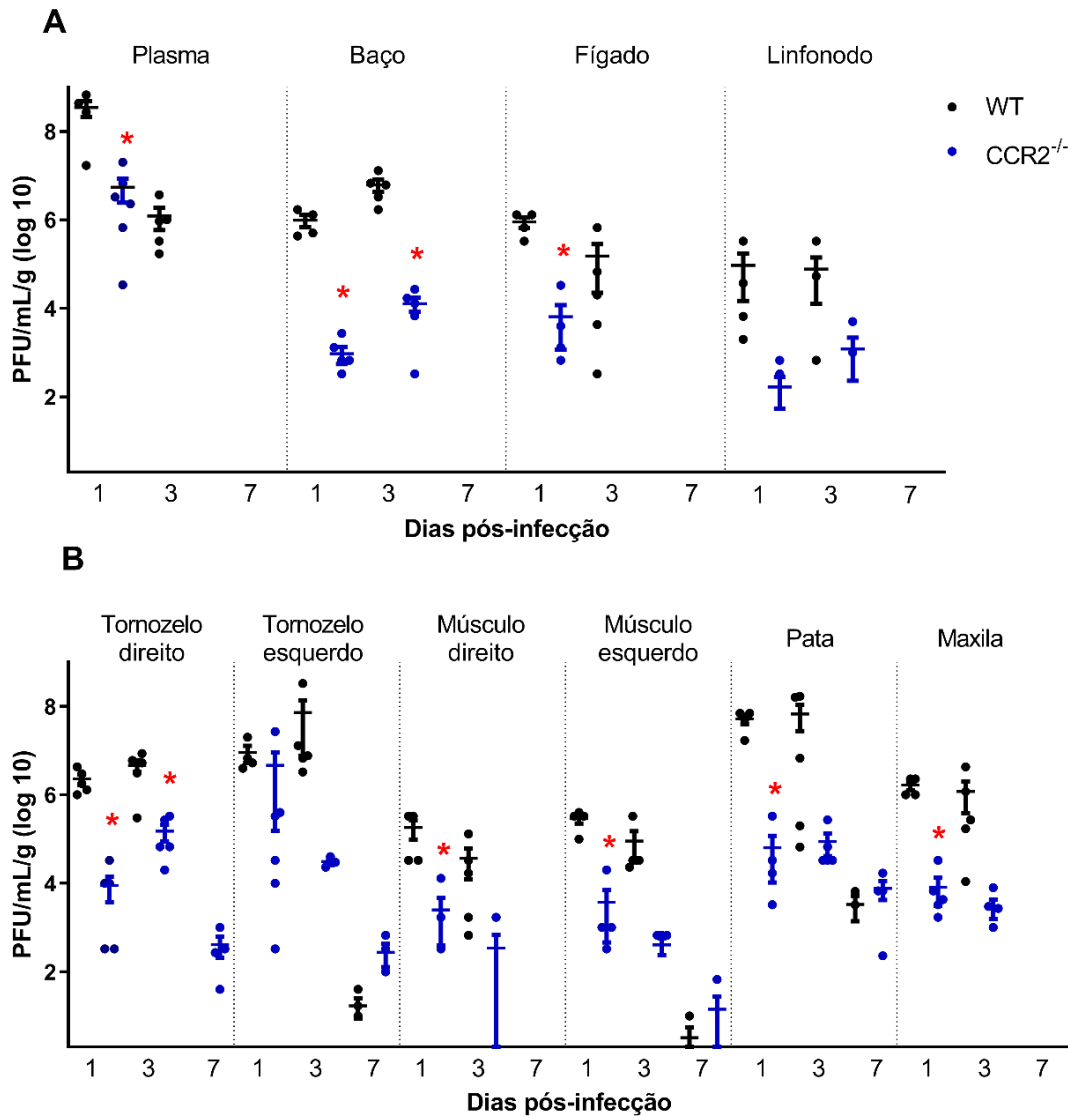


Figura 23. Quantificação da carga viral em órgãos e tecidos em camundongos WT e CCR2^{-/-}. Camundongos com 4 semanas de idade WT e CCR2^{-/-} foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10⁶ PFU de MAYV. (A e B) Nos dias 1, 3 e 7 PI, o plasma e os tecidos de interesse foram colhidos, homogeneizados e a quantidade de vírus infeccioso determinada por ensaio de placa em células Vero. A análise de estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

A inflamação induzida pelo MAYV em animais CCR2^{-/-} começou no 3º dia PI, com o pico no 7º e 14º dias após a inoculação do vírus (FIG. 24A e B). Comparando com os camundongos WT, o processo inflamatório foi menos intenso nos animais CCR2^{-/-}, mas por outro lado, persistiu por mais tempo nos animais nocautes (FIG.24). No 14º dia PI, ainda havia a presença de fibras em degeneração e miofagocitose no tecido dos animais nocautes (FIG. 24), com a recuperação tecidual iniciando aos 21 dias PI, o qual foi acompanhada por redução das células inflamatórias e regeneração do tecido lesado. Diferentemente, nos animais WT a recuperação tecidual ocorreu mais cedo, no 14º dia PI (FIG. 24).

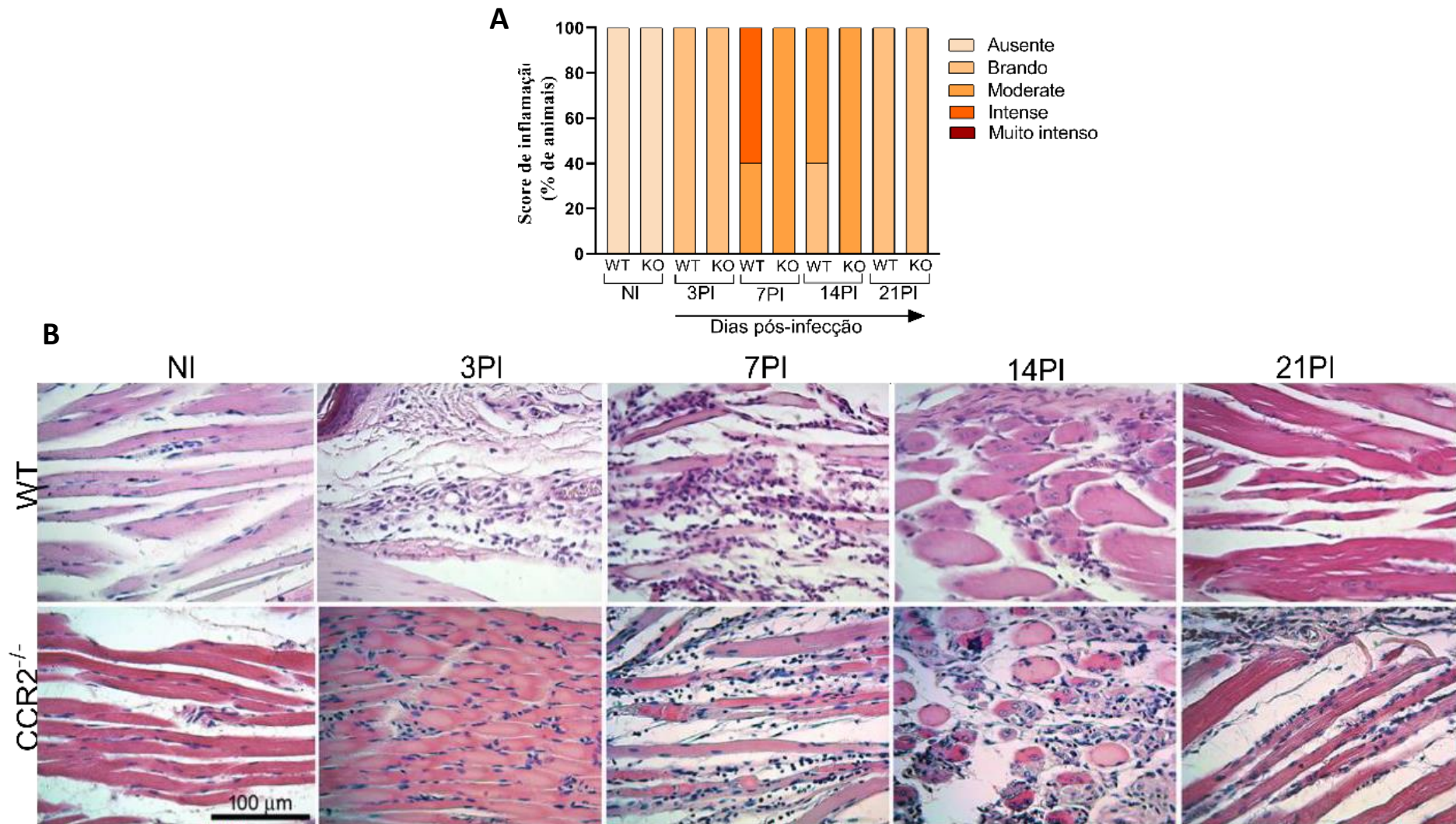


Figura 24. O MAYV induz dano tecidual na pata de camundongos C57BL6 e CCR2^{-/-}. (Continua na seguinte página)

(continuação da figura 24) Camundongos com 4 semanas de idade WT e $CCR2^{-/-}$ foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU de MAYV. Nos dias 3, 7, 14 e 21 PI, os camundongos foram sacrificados e os tecidos da pata removidos, embebidos em parafina e seções de 5 μ m foram geradas e coradas com HE. (A) Avaliação da intensidade de inflamação. (B) Os painéis mostram controle negativo (i e ii); infecção pelo MAYV no 3 dia PI (iii e iv); infecção pelo MAYV no dia 7 PI (v e vi); infecção por MAYV no 14 dia PI (vii e viii); Infecção pelo MAYV no 21 PI (ix e x). Imagens com ampliação de 400X, barra de 100 μ m. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

Até o momento, os resultados demonstram que os camundongos $CCR2^{-/-}$ infectados com MAYV apresentam sinais clínicos e inflamação tecidual reduzidos. Em relação aos mediadores inflamatórios, não foram observadas diferenças significativas na cinética de expressão dos mediadores CCL3 (FIG. 25A), CCL5 (FIG. 25B) e TNF (FIG. 25C). Enquanto isso, os níveis de CCL2 mostraram um perfil semelhante nos dias 3 e 7PI, mas permaneceram altos no dia 14PI nos animais nocautes (FIG. 25D). A quimiocina CXCL1, um promotor do recrutamento de neutrófilos, apresentou níveis elevados no dia 7PI em camundongos nocautes quando comparados com os animais WT (FIG. 25E).

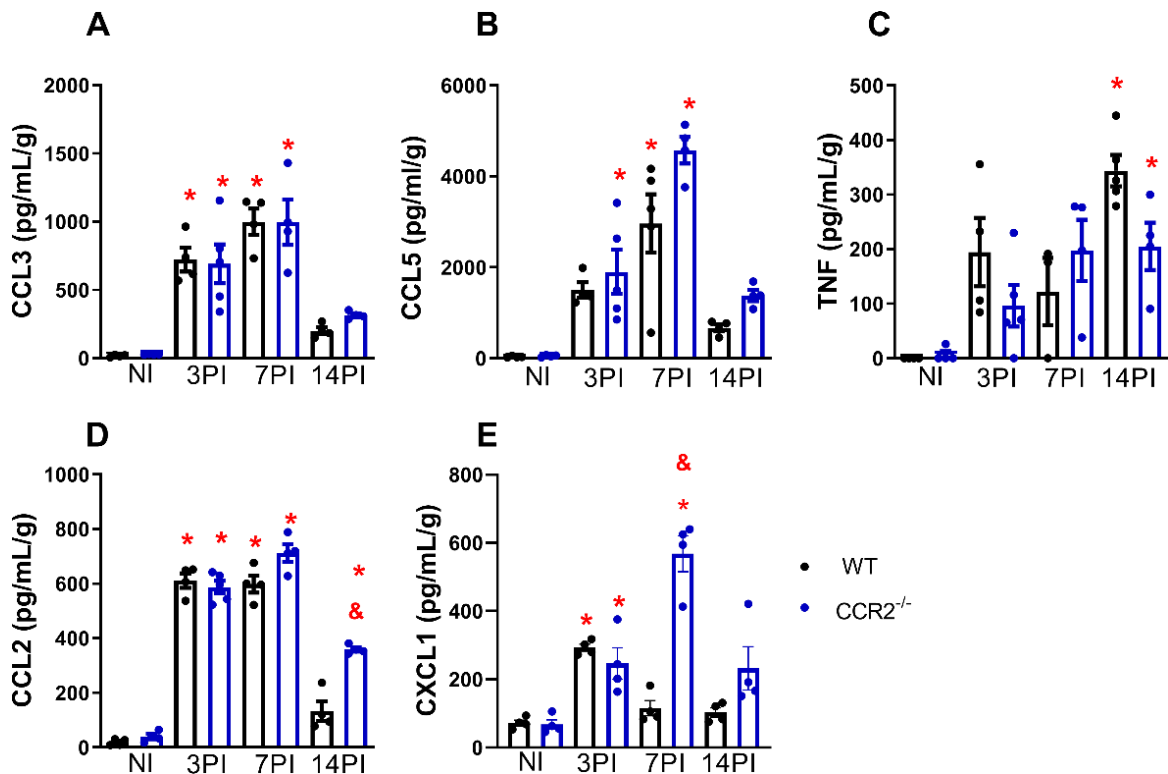


Figura 25. Avaliação do perfil de mediadores inflamatórios em camundongos C57BL6 e $CCR2^{-/-}$ infectados com o MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade WT e $CCR2^{-/-}$ foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU de MAYV. A cinética dos mediadores inflamatórios na pata dos animais foi realizada nos dias 3, 7 e 14 PI, sendo detectados CCL3 (A), CCL5 (B), TNF (C), CCL2 (D) e CXCL1 (E). A análise estatística foi realizada com o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

De acordo com os dados de remodelação óssea dos camundongos WT, amostras de tíbia e maxila dos camundongos $CCR2^{-/-}$ com 21 dias PI também foram submetidas a análise de μ CT. Diferentemente do que foi observado nos animais WT, a homeostase óssea em animais $CCR2^{-/-}$ não foi afetada pela infecção pelo MAYV, como demonstrado pelos resultados de μ CT, em que não houve fenótipo de reabsorção óssea significativo na tíbia (FIG. 26A-D) e no osso alveolar da maxila (FIG. 27A-D) de camundongos $CCR2^{-/-}$.

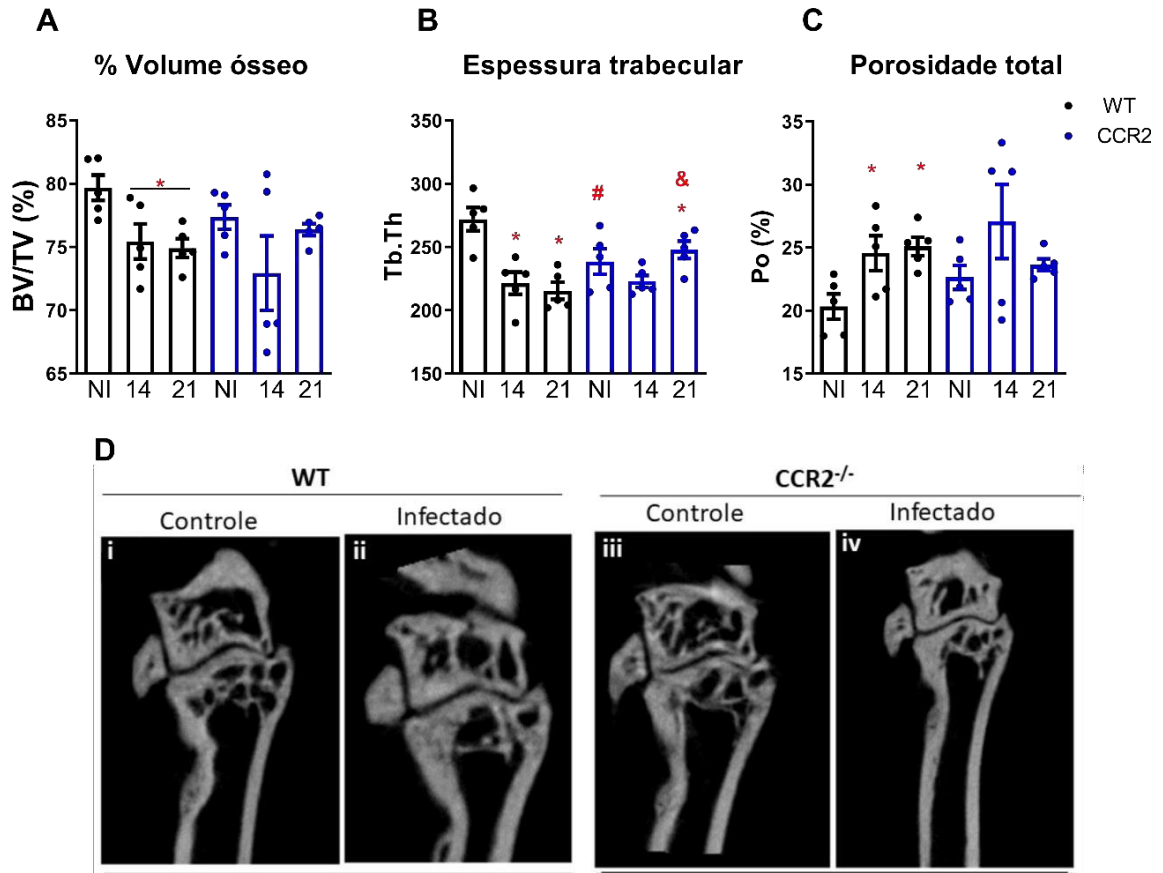


Figura 26. Análise de μ CT na tíbia de camundongos $CCR2^{-/-}$ infectados com MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade WT e $CCR2^{-/-}$ foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU de MAYV. No dia 21 PI, os animais foram sacrificados e a tíbia foi removida para análise de micrCT. (A) Fração do volume ósseo trabecular, (B) Espessura trabecular, (C) Porosidade na tíbia. Reconstrução 2D da tíbia. A estatística foi realizada com One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

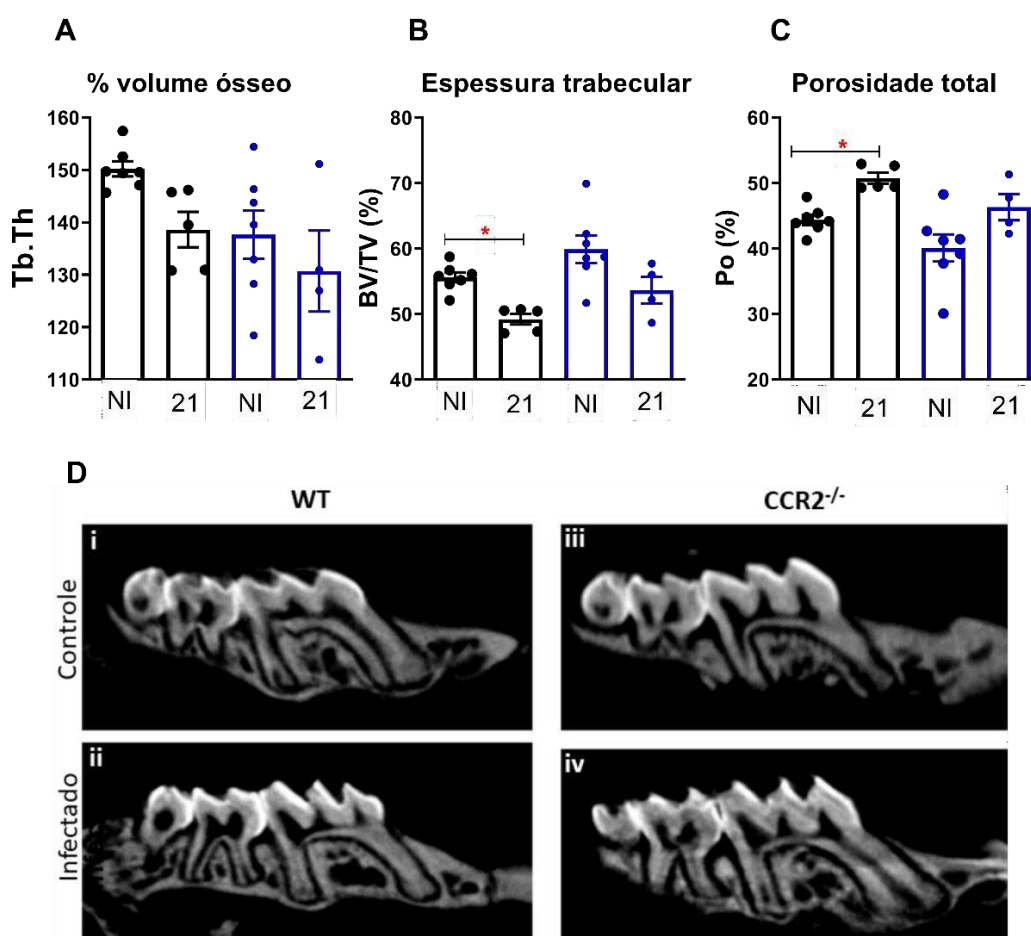


Figura 27. Análise de μ CT na maxila de camundongos CCR2^{-/-} infectados com MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade WT e CCR2^{-/-} foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU de MAYV. No dia 21 PI, os animais foram sacrificados e a maxila foi removida para análise de micrCT. (A) Fração do volume ósseo trabecular, (B) Espessura trabecular, (C) Porosidade na tíbia. (D) Reconstrução 2D da maxilar. A estatística foi realizada com One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

Em um experimento complementar, siRNA-CCL2 complexado de nanopartícula polimérico-lipídica (NP-siRNA-CCL2) foi usado para silenciar a expressão da quimiocina CCL2 para apoiar a descobertas encontradas até o momento com o CCR2. As medições de DLS mostraram que o diâmetro médio de NP-siRNA-CCL2 foi de 121,3 nm (SD 0,55 nm) e PDI 0,15 (SD 0,01) e potencial zeta em torno de -0,51 mV (SD 0,18 mV). Os animais WT tratados com NP-siRNA-CCL2 apresentaram uma melhora significativa na hipernocicepção (FIG. 28 A), como observado para os animais nocautes para o receptor CCR2, mas não observamos diferença no edema entre o grupo tratado com NP-siRNA-CCL2 e os demais grupos (FIG. 28 B). Isso foi acompanhado por uma redução significativa na produção de CCL2 e na expressão de *ccl2*, *ccl5*, *ccl7* e *Tnf* (FIG. 29A, B, C e D). No entanto, não foi observada diferença no infiltrado inflamatório e dano histológico na pata (FIG. 30A e B).

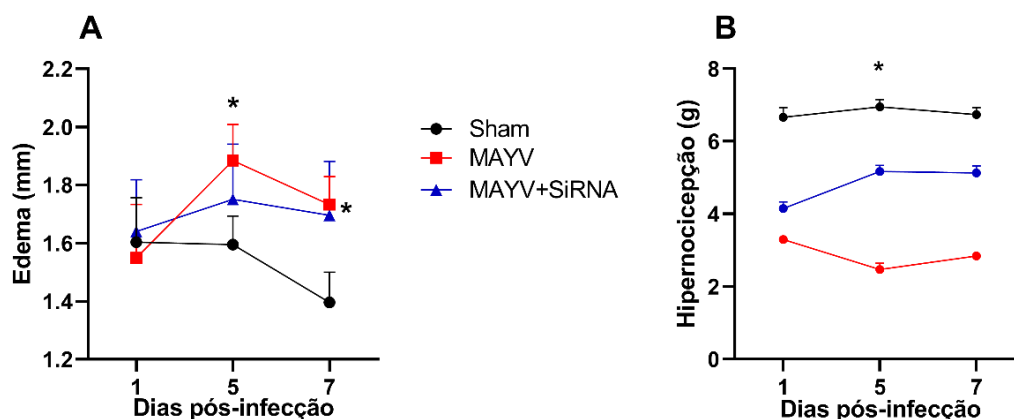


Figura 28. O silenciamento da quimiocina CCL2 promove melhora no limiar de hipernociceção em camundongos infectados com o MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade foram tratados por 3 dias antes da infecção com SiMCP1 e nos dias 2 e 5 pós-infecção. Os animais foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU e o controle foi inoculado com sobrenadante de células C6/36. (A) As medidas de edema foram realizadas na pata infectada (pata direita) com o auxílio de um paquímetro nos dias 1, 5 e 7 pós-infecção. (B) A avaliação do limiar de hipernociceção foi realizada pelo método de von Frey. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos oito camundongos por grupo.

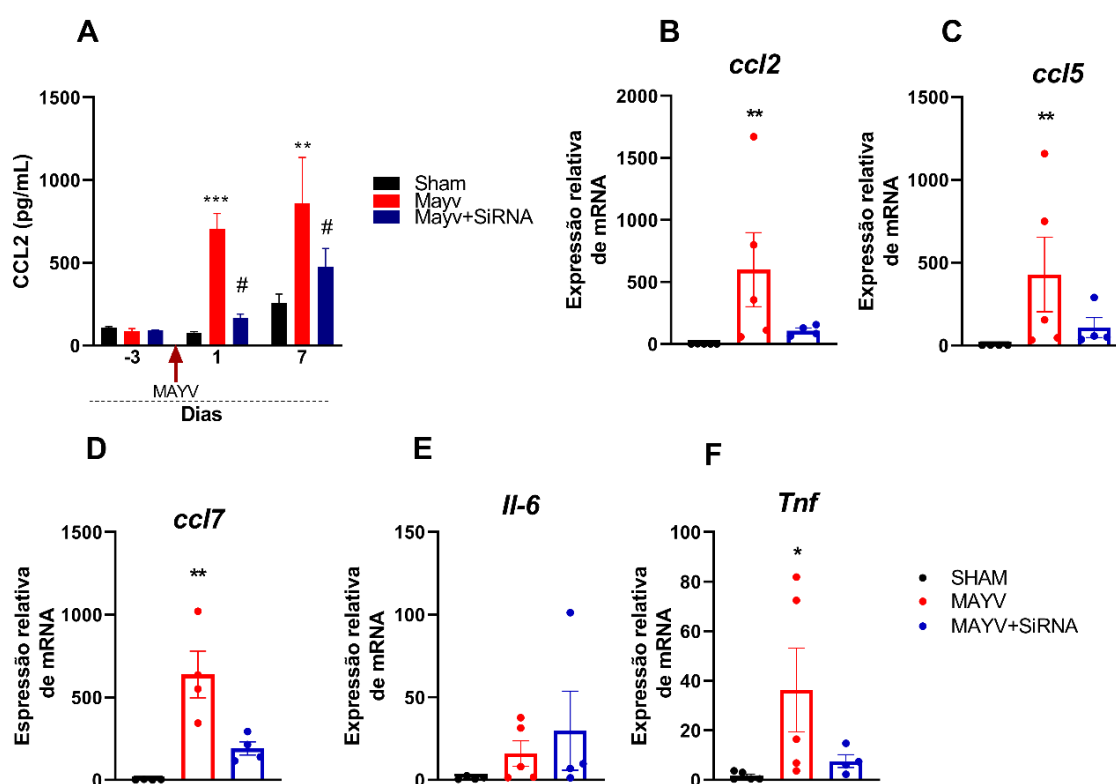


Figura 29. O silenciamento de CCL2 altera o perfil de produção e expressão de mediadores inflamatórios em camundongos infectados com MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade foram tratados por 3 dias antes da infecção com SiMCP1 e nos dias 2 e 5 pós-infecção. Os animais foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU e o controle foi inoculado com sobrenadante de células C6/36. (A) Níveis séricos de CCL2 nos dias -3 (antes da infecção) e 1 e 7 pós-infecção. Análise de qRT-PCR da expressão relativa das quimiocinas *ccl2* (B), *ccl5* (C), *ccl7* (D) e citocinas *Il-6* (E) e *Tnf* (F) na pata. A análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis. As análises são representativas de pelo menos cinco animais por grupo.

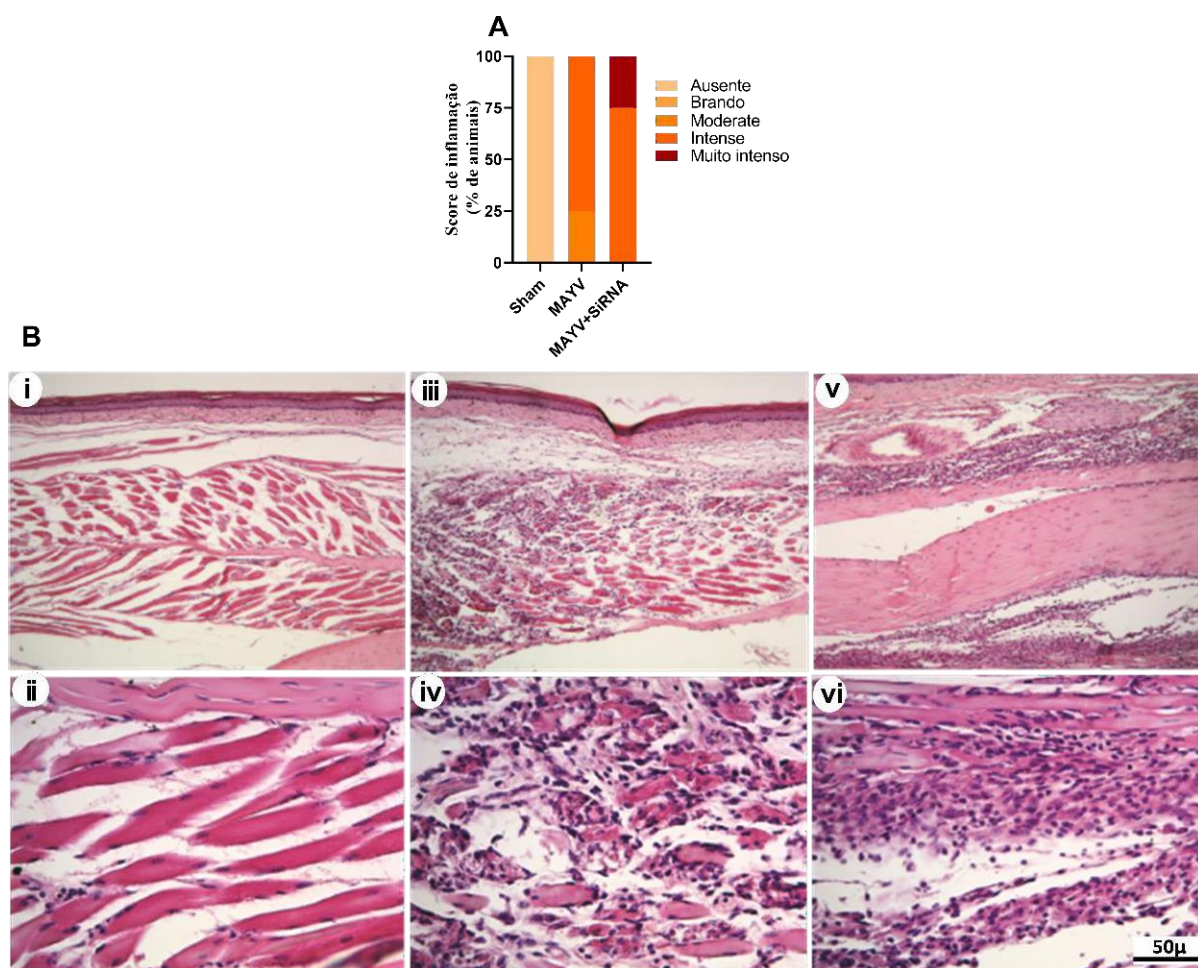


Figura 30. O silenciamento de CCL2 não impediu migração de células inflamatórias e o dano tecidual na pata de camundongos infectados com o MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade foram tratados por 3 dias antes da infecção com SiMCP1 e nos dias 2 e 5 pós-infecção. Os animais foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10^6 PFU e o controle foi inoculado com sobrenadante de células C6/36. No dia 7 p.i. os camundongos foram sacrificados e os tecidos da pata foram removidos, embebidos em parafina e seções de $5\ \mu\text{m}$ foram geradas e coradas com HE. (A) Intensidade de inflamação. (B) O painel mostra controle negativo (i e ii), animais infectados com MAYV (iii e iv) animais infectados e tratados com SiMCP1 (v e vi). As análises são representativas de pelo menos três animais por grupo.

A análise de citometria realizada para avaliar a emigração de células mieloides da medula óssea o infiltrado esplênico aos 7 dias PI mostrou que não houve diferenças entre os grupos (FIG.31).

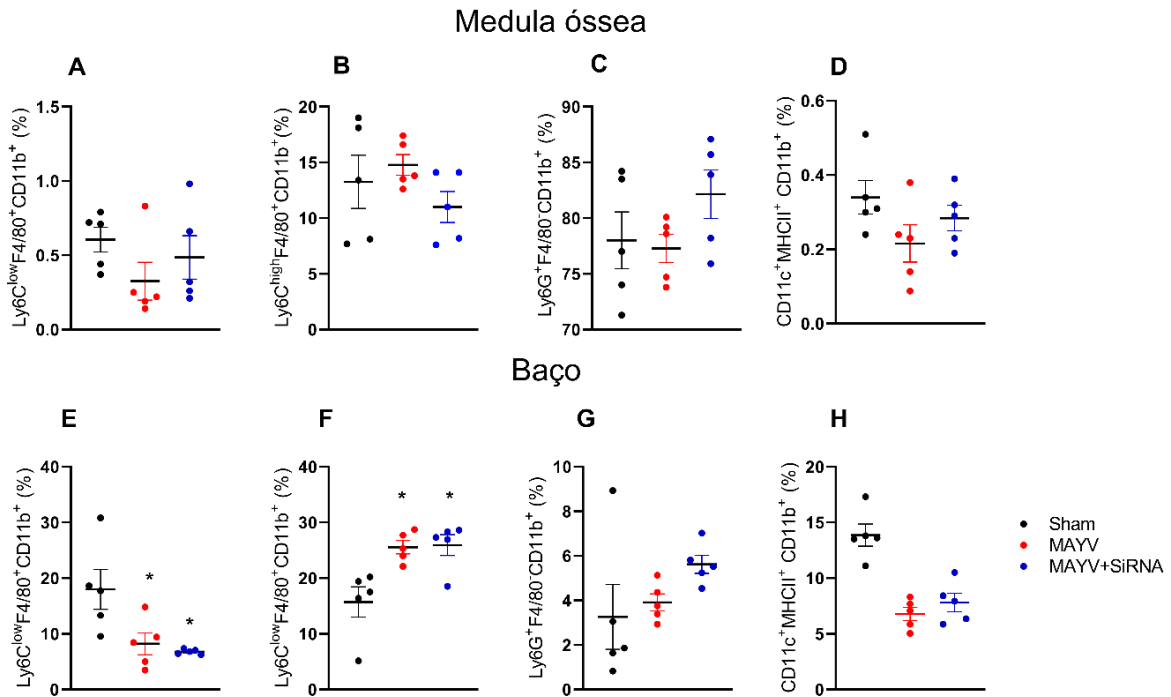


Figura 31. Efeito do tratamento com SiMCP1 no comportamento de células mieloides na medula óssea e baço em camundongos infectados com MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade foram tratados por 3 dias antes da infecção com SiMCP1 e nos dias 2 e 5 pós-infecção. Os animais foram infectados na da pata traseira direita com 10^6 PFU e os animais controle foram inoculados com sobrenadante de células C6/36 (A e E) Percentagem de macrófagos residentes. (B e F) Percentagem de monócitos inflamatórios. (C e G) Percentagem de neutrófilos. (D e H) Percentagem de células dendríticas. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida teste de comparações múltiplas de Tukey (valor $P < 0,05$). As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

6.4 A ausência de CCR2 está associada a uma alteração do perfil celular local caracterizada por uma redução de células mononucleares e aumento de polimorfonucleares resultando em melhor evolução da doença na infecção por MAYV.

Para determinar o padrão da resposta imune celular contra a infecção por MAYV, células imunes de WT e $CCR2^{-/-}$ foram isoladas da pata traseira e o perfil celular avaliado por citometria de fluxo. Para criar o boolean gate, foram excluídos os debris através das combinações de fluorocromos, remoção de dupletos foi utilizado um gate de área de dispersão direta (FSC-A) versus altura de dispersão direta (FSC-H) e, em seguida, as células foram bloqueadas em função do tempo versus FSC-A para evitar uma possível interferência de interrupções de fluxo (FIG. 32A). De forma geral, a infecção pelo MAYV promoveu um aumento na população de células mieloides em ambos os grupos avaliados (FIG. 32B).

No dia 1 PI, os camundongos WT mostraram uma redução nas populações de células dendríticas ($CD11c^{+}MHCII^{+}Cd11b^{+}$) e macrófagos residentes ($Ly6C^{low}F4/80^{+}CD11b^{+}$) (FIG. 32C e D). De fato, os camundongos WT apresentaram uma resposta caracterizada por monócitos/macrófagos, que são sugeridos como as principais células envolvidas na patogênese alfaviral (Santos et al., 2020). Um aumento no número de monócitos inflamatórios ($Ly6C^{high}F4/80^{+}CD11b^{+}$) na pata foi observado após 7 dias da inoculação do MAYV (FIG. 32E) e aproximadamente 30% dessas células eram monócitos $CCR2^{+}$ (FIG. 33A). Finalmente, foi observado um aumento de 2 vezes na população de macrófagos residentes ($Ly6C^{low}F4/80^{+}CD11b^{+}$) e de células dendríticas no dia 7 PI (FIG. 32 C e D), sugerindo que a população infiltrante de monócitos $Ly6C^{high} CCR2^{+}$ está se diferenciando em macrófagos $Ly6C^{low}CCR2^{+}$ (FIG. 33B) e em um distinto subconjunto de células dendríticas, denominadas MoDC (células dendríticas derivadas de monócitos). No entanto, para determinar se essa população de células dendríticas realmente pertencem ao subconjunto de MoDC, seria necessária uma nova análise com marcação específica para essa população. Curiosamente, nenhum aumento significativo de neutrófilos foi observado em animais WT após a inoculação de MAYV (FIG. 32F). Além disso, a análise do estado de ativação dessas populações de células mieloides, mostrou um aumento na expressão da molécula de superfície celular CD80, nas células dendríticas (FIG. 32G) e monócitos (FIG. 32H).

Por outro lado, a resposta celular de camundongos $CCR2^{-/-}$ foi caracterizada por uma população reduzida de monócitos/macrófagos inflamatórios infiltrantes, que foi substituído por um aumento significativo de neutrófilos, observado nos dias 1 e 7 após a inoculação de MAYV (FIG. 32F). O estado de ativação dessa população de neutrófilos foi confirmado pelo aumento na expressão de CD80 no dia 7 PI (FIG. 32J). Em ambos os camundongos $CCR2^{-/-}$ e WT, uma porcentagem aumentada de linfócitos $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ também foi observada aos 7 dias PI (FIG. 34C e D), com animais $CCR2^{-/-}$ apresentando uma porcentagem maior de células $TCD4^{+}$. A análise dos marcadores de ativação demonstrou um aumento de células $TCD4^{+}$ e $TCD8^{+}$ expressando CD69 e CD44 em ambos os grupos de forma diferencial, com os animais nocautes apresentando uma maior porcentagem de linfócitos $TCD4^{+}$ expressando CD69 e CD44 em relação aos animais WT (FIG. 34E e F). Enquanto na população de linfócitos $TCD8^{+}$ essa diferença entre os grupos foi observada apenas para CD69 (FIG. 34H e I). Curiosamente, um aumento de células T expressando $CD44^{+}/CD62L^{+}$, uma marcação para células de memória, foi observado apenas em camundongos WT (FIG. 34G e J). Além disso, linfócitos T de

camundongos WT expressando níveis aumentados de receptor CCR2 também foram observados (FIG. 33E e F).

No geral, esses dados mostram que durante a infecção por MAYV o receptor CCR2 conduz o influxo e a ativação de monócitos para o local da infecção, o que impacta negativamente no curso e gravidade da doença. Enquanto isso, na ausência do receptor CCR2, observou-se um perfil celular diferente, que foi caracterizado por uma predominância de neutrófilos e associado a uma melhora nos resultados da doença nos camundongos CCR2^{-/-}.

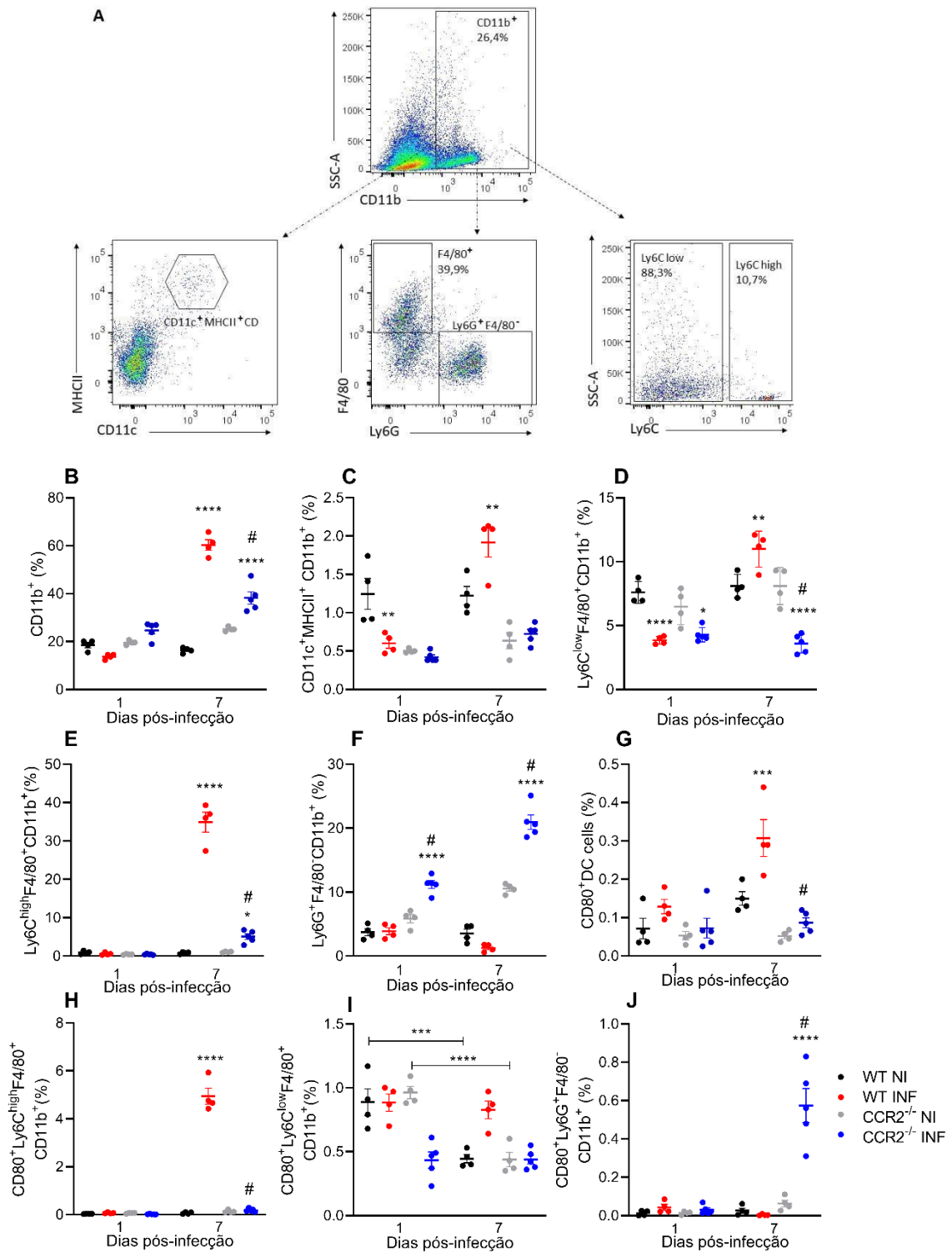


Figura 32. Perfil de células imunes na pata de camundongos WT e CCR2^{-/-} infectados com MAYV.

citometria de fluxo de células imunes isoladas da pata traseira de animais infectados com MAYV nos dias 1 e 7 PI. (A) O painel mostra a estratégia de gating para definir a população de células mieloides. (B) Aumento de células CD11b⁺ aos 7 dias PI em animais WT e CCR2^{-/-}. (C) Porcentagem de células dendríticas. (D) Porcentagem de monócitos inflamatórios. (E) Porcentagem de macrófagos residentes. (F) Porcentagem de neutrófilos. (G) Porcentagem de células dendríticas expressando CD80. (H) Porcentagem de monócitos inflamatórios expressando CD80. (I) Porcentagem de neutrófilos expressando CD80. As estatísticas foram realizadas com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (valor P < 0,05). As análises são representativas de pelo menos quatro camundongos por grupo.

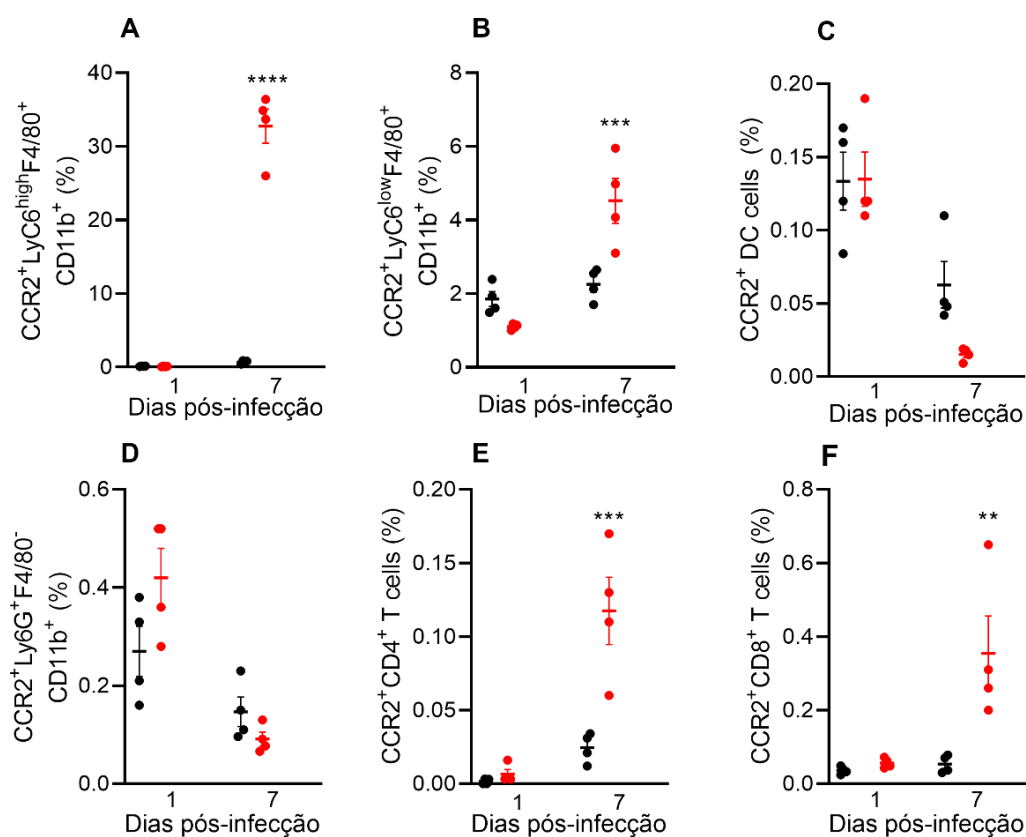


Figura 33. Perfil de expressão do receptor CCR2 na população de células imunes mieloides. Análise por citometria de fluxo de células imunes isoladas da pata traseira de camundongos WT infectados com MAYV nos dias 1 e 7 PI. (A) Percentagem de células dendríticas expressando CCR2. (B) Percentagem de monócitos inflamatórios expressando CCR2. (C) Percentagem de macrófagos expressando CCR2. (D) Percentagem de células T CD4⁺ expressando CCR2. (E) Percentagem de células T CD8⁺ expressando CCR2. (F) Percentagem de células T CD8⁺ expressando CCR2. As estatísticas foram realizadas com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (valor $P < 0,05$). As análises são representativas de pelo menos quatro camundongos por grupo.

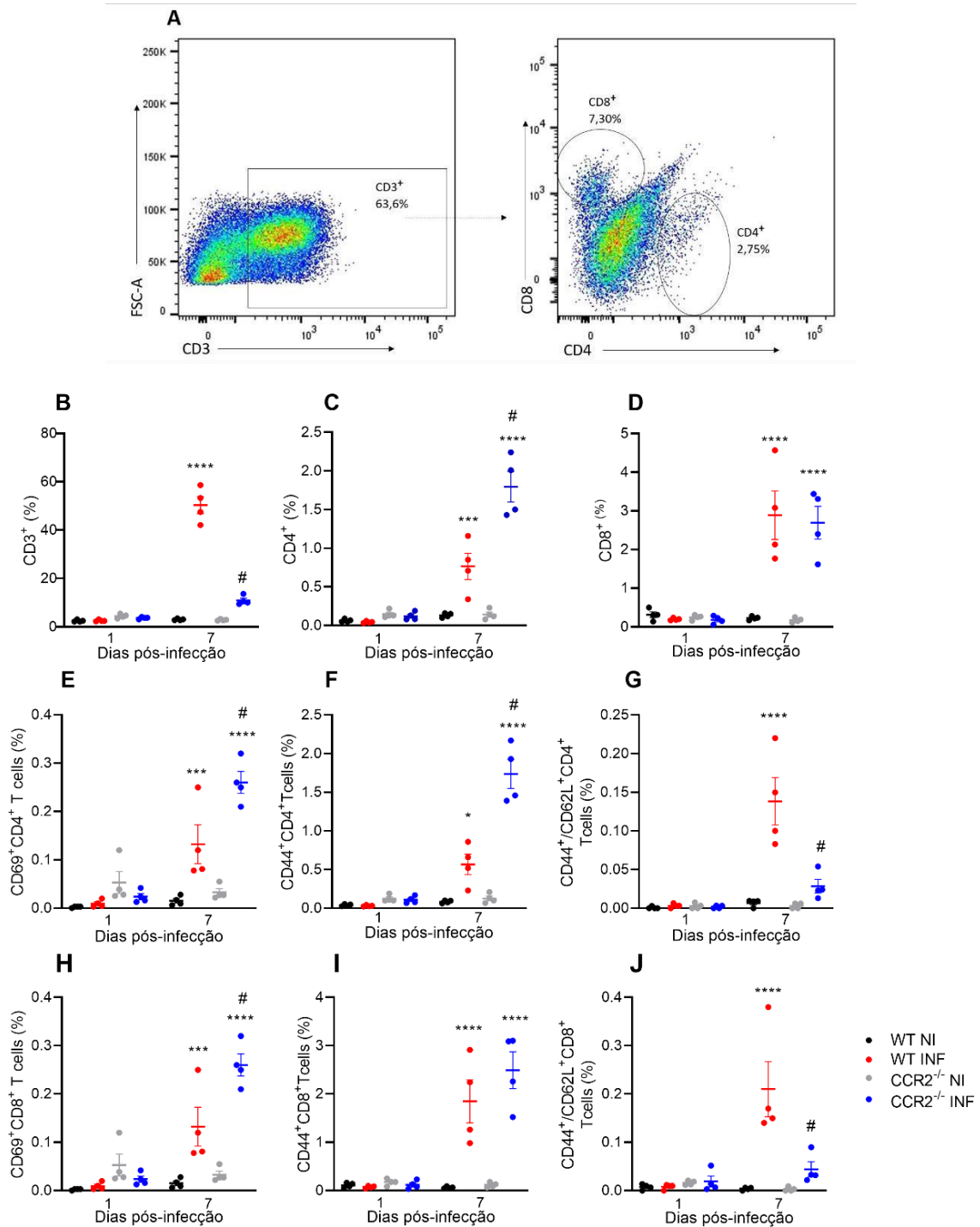


Figura 34. Perfil de células imunes linfoides na pata de camundongos WT e CCR2^{-/-} infectados com MAYV.

Análise por citometria de fluxo de células imunes isoladas da pata traseira de animais infectados com MAYV nos dias 1 e 7 PI. (A) O painel mostra a estratégia de gating para definir a população de células linfoides. (B) população de células CD3⁺. (C) população de células TCD4⁺. (D) população de células TCD8⁺. (E) Porcentagem de células TCD4⁺ expressando CD69. (F) Porcentagem de células TCD4⁺ expressando CD44. (G) Porcentagem de células TCD4⁺ expressando CD44/CD62L. (H) Porcentagem de células TCD8⁺ que expressam CD69. (I) Porcentagem de células TCD8⁺ expressando CD44. (J) Porcentagem de células TCD4⁺ expressando CD44/CD62L. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (valor P <0,05). As análises são representativas de pelo menos quatro camundongos por grupo.

6.5 Resposta de macrófagos, osteoclastos e osteoblastos à infecção por MAYV

A homeostase óssea é o resultado de um equilíbrio entre a sinalização dos osteócitos, a formação óssea osteoblástica e a reabsorção óssea osteoclástica (Visconti et al., 2019). Para entender o mecanismo pelo qual o MAYV pode causar perda óssea, foi investigada a permissividade e a resposta de macrófagos, osteoclastos e osteoblastos à infecção pelo MAYV. A infecção da cultura primária de macrófagos WT e $CCR2^{-/-}$ (FIG. 35A) com MAYV na MOI1 mostrou que embora não haja infecção produtiva, nem perda de viabilidade (FIG. 35B), MAYV foi capaz de modular a produção de citocinas nestas células (FIG. 35C e D). A resposta dos macrófagos à infecção, resultou na produção de IL-6 apenas em células WT às 72h PI e detecção de TNF apenas nas células $CCR2^{-/-}$ (FIG. 35C e D). Da mesma forma, o MAYV também não foi capaz de promover uma infecção produtiva nos osteoclastos primários WT e $CCR2^{-/-}$ (FIG. 36 A) e não afetou a viabilidade dessas células (FIG. 36B), apesar de se observar uma redução apenas no tempo de 48h para as células $CCR2^{-/-}$, com os demais tempos sem redução de viabilidade. No entanto, foi observado que a infecção pelo MAYV induziu a produção de TNF- α e IL-6 nas culturas WT e $CCR2^{-/-}$. Os osteoclastos WT produziram citocinas IL-6 e TNF a partir de 48h PI e os osteoclastos $CCR2^{-/-}$ produziram IL-6 e TNF a partir de 72h PI (FIG. 36C e D), e tal produção foi significativamente menor quando comparada às células WT. As citocinas IL-6 e TNF presentes nessas culturas em resposta à infecção por MAYV são dois importantes mediadores pró-osteoclastogênicos. Para verificar o potencial dessas citocinas em induzir diretamente a formação de osteoclastos, a cultura primária de macrófagos foi exposta por 3 dias ao TNF, e observamos que o TNF promoveu a formação de células TRAP⁺ multinucleadas em WT e $CCR2^{-/-}$ culturas de células (FIG. 37A e B).

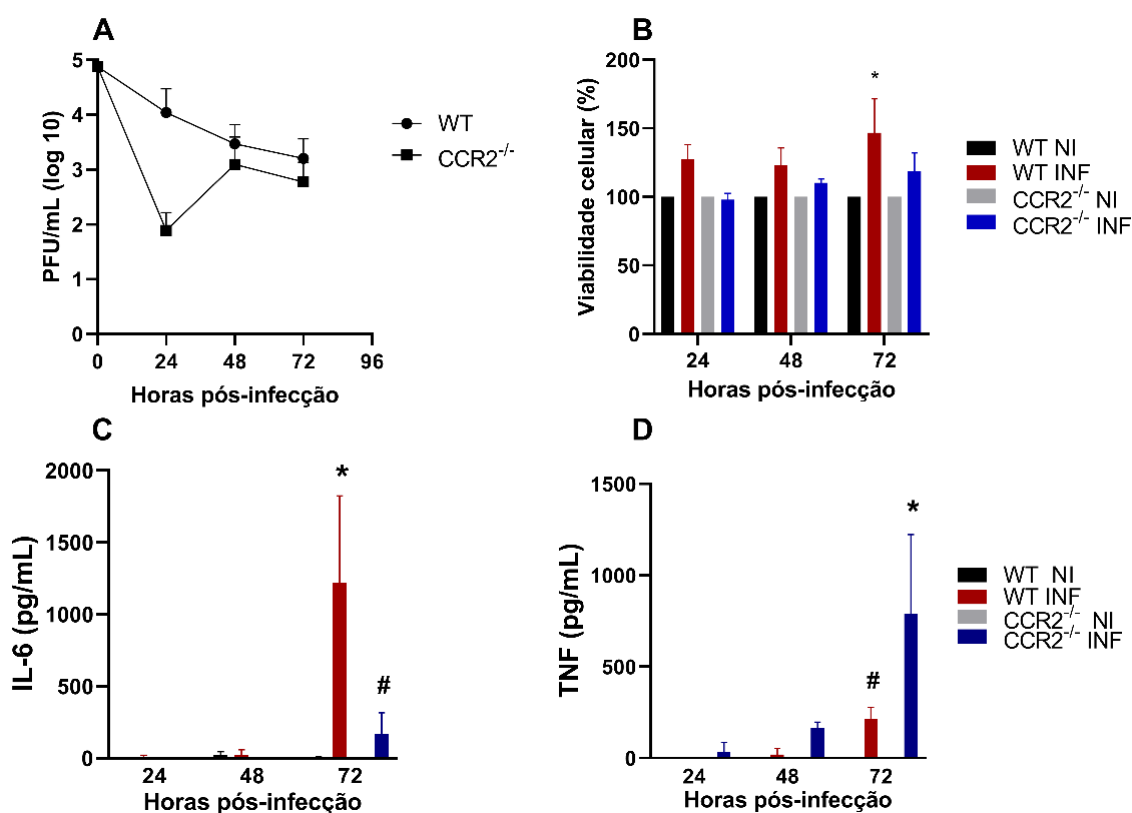


Figura 35. Infecção e resposta de macrófagos primários a infecção pelo MAYV. A cultura de macrófagos primários WT e CCR2^{-/-} foram obtidas pela diferenciação de células extraídas da medula óssea com M-CSF. Após diferenciação as células foram infectadas na MOI1 do MAYV. (A) Titulação do vírus MAYV. (B) Avaliação da viabilidade celular após infecção pelo ensaio de MTT. (C) Quantificação de IL-6 por ELISA no sobrenadante da cultura de macrófagos WT e CCR2^{-/-}. (D) Quantificação de TNF por ELISA no sobrenadante da cultura de macrófagos WT e CCR2^{-/-}. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Para investigar a resposta dos osteoblastos à infecção, as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BMSCs) foram isoladas e seguiram dois protocolos de diferenciação em osteoblastos: i) as células foram diferenciadas por 7 dias; ii) as células foram diferenciadas por 14 dias. Em osteoblastos com 7 dias de diferenciação, observamos que as células foram permissivas à infecção por MAYV e CHIKV (FIG. 38 A). A redução da atividade da fosfatase alcalina foi observada apenas para CHIKV (FIG. 38B), enquanto a perda de viabilidade foi observada para CHIKV no tempo de 48 e 72hpi e para MAYV foi observada apenas no tempo de 48h para MOI de 0,1 e 1 (FIG. 38C). Além disso, a produção de IL-6 foi detectada a partir de 48 h.p.i para CHIKV e 72 h.p.i para MAYV (FIG. 38D). Além das BMSCs isoladas de camundongos WT, BMSCs de animais CCR2^{-/-} também foram isoladas para comparar a resposta dessas células *in vitro*. Após 14 dias de diferenciação, alguns poços de

osteoblastos WT foram submetidos a um bloqueio farmacológico do receptor CCR2 com o antagonista RS504393 1 h antes da infecção pelo MAYV e CHIKV.

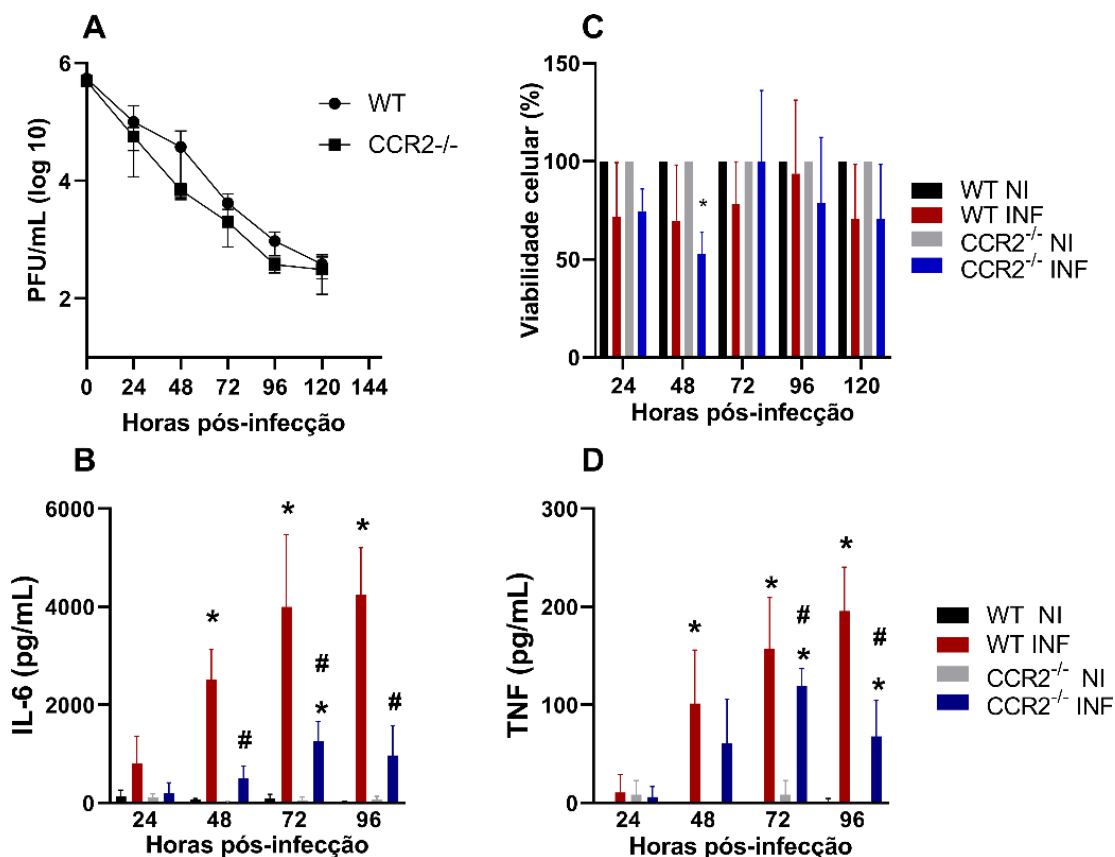


Figura 36. Infecção e avaliação da resposta de osteoclastos primários a infecção pelo MAYV. A cultura de osteoclastos primários WT e CCR2^{-/-} foram obtidas pela diferenciação de células extraídas da medula óssea com M-CSF e RANKL. Após diferenciação as células foram infectadas com o MAYV na MOI1. (A) Titulação do vírus MAYV. (B) Quantificação de IL-6 por ELISA no sobrenadante da cultura de osteoclastos WT e CCR2^{-/-}. (C) Avaliação da viabilidade celular após infecção pelo ensaio de MTT. (D) Quantificação de TNF por ELISA no sobrenadante da cultura de macrófagos WT e CCR2^{-/-}. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Os resultados mostraram que não houve infecção produtiva por MAYV nestas células (FIG. 39A). Além disso, não foi observada redução na atividade da fosfatase alcalina ou nenhuma perda de viabilidade neste experimento (FIG. 39B, C, D e E). No entanto, o CHIKV conseguiu se replicar nessas células, com o pico em 24h.p.i. Curiosamente, a IL-6 foi produzida apenas em osteoblastos de camundongos WT em resposta à infecção por MAYV (FIG. 40A e B), o que sugere que a citocina IL-6 desempenha, juntamente com o TNF, um papel importante no mecanismo de perda óssea induzida por MAYV e, além disso, esses dados demonstram que

MAYV interage de forma diferente na presença e ausência do receptor CCR2^{-/-} nos osteoblastos.

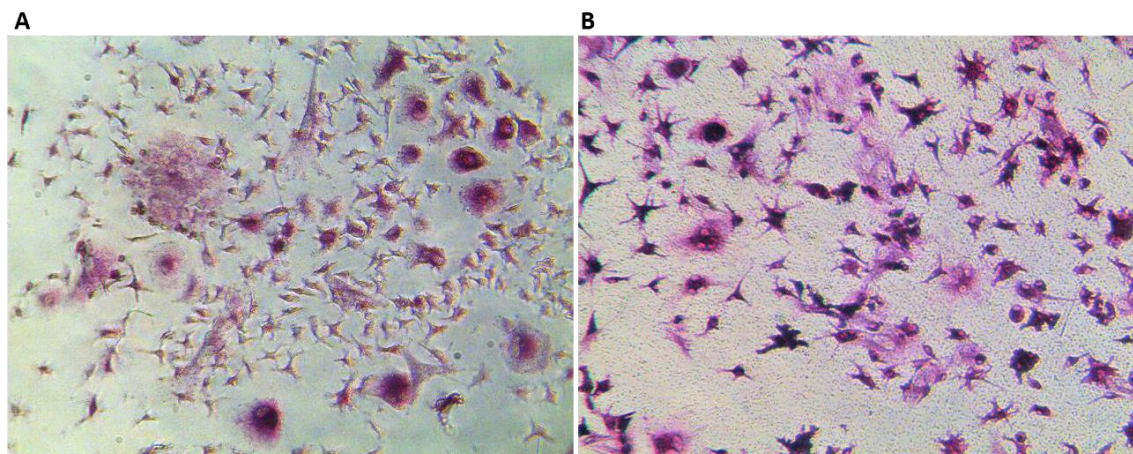


Figura 37. Marcação de células TRAP⁺ após diferenciação com RANKL (A) e TNF (B).

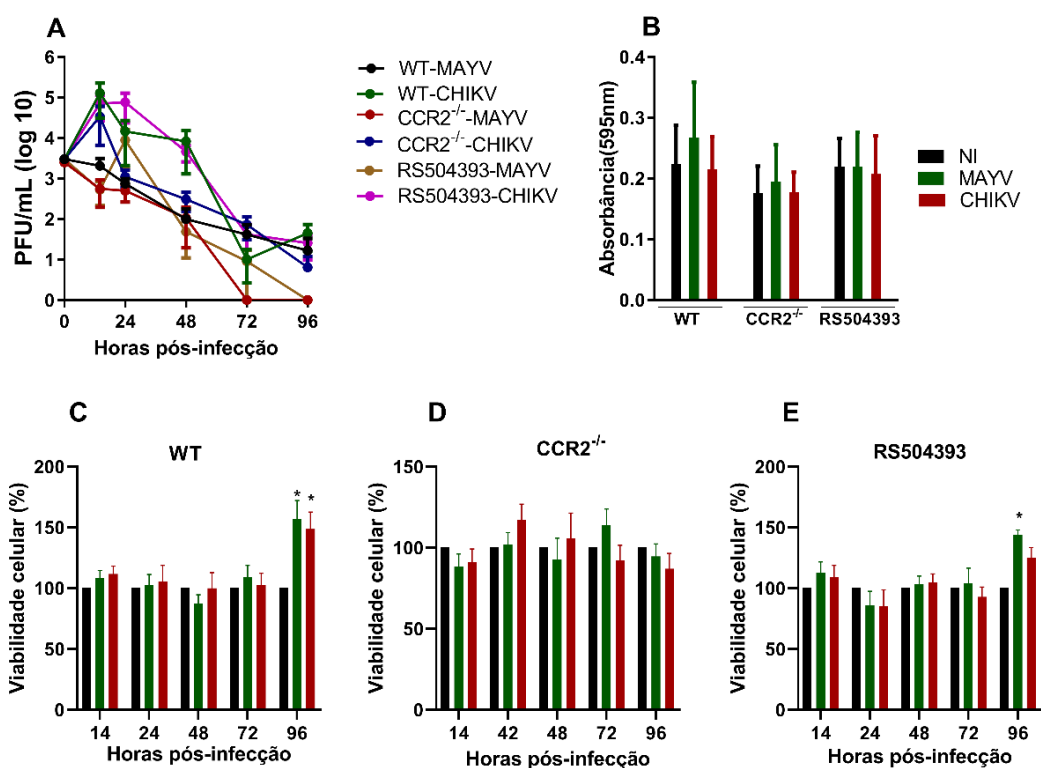


Figura 38. Avaliação da resposta de osteoblastos primários com sete dias de diferenciação a infecção do MAYV. A cultura de osteoblastos primários foi obtida a partir de células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL6j e submetidas ao processo de diferenciação com meio osteogênico por 7 dias. Após diferenciação os osteoblastos foram infectados com o MAYV em diferentes concentrações (MOI0,01; MOI0,1 e MOI1) e com o CHIKV na MOI1. (A) Titulação do vírus MAYV e CHIKV. (B) Avaliação da atividade da fosfatase alcalina. (C, D e E) Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

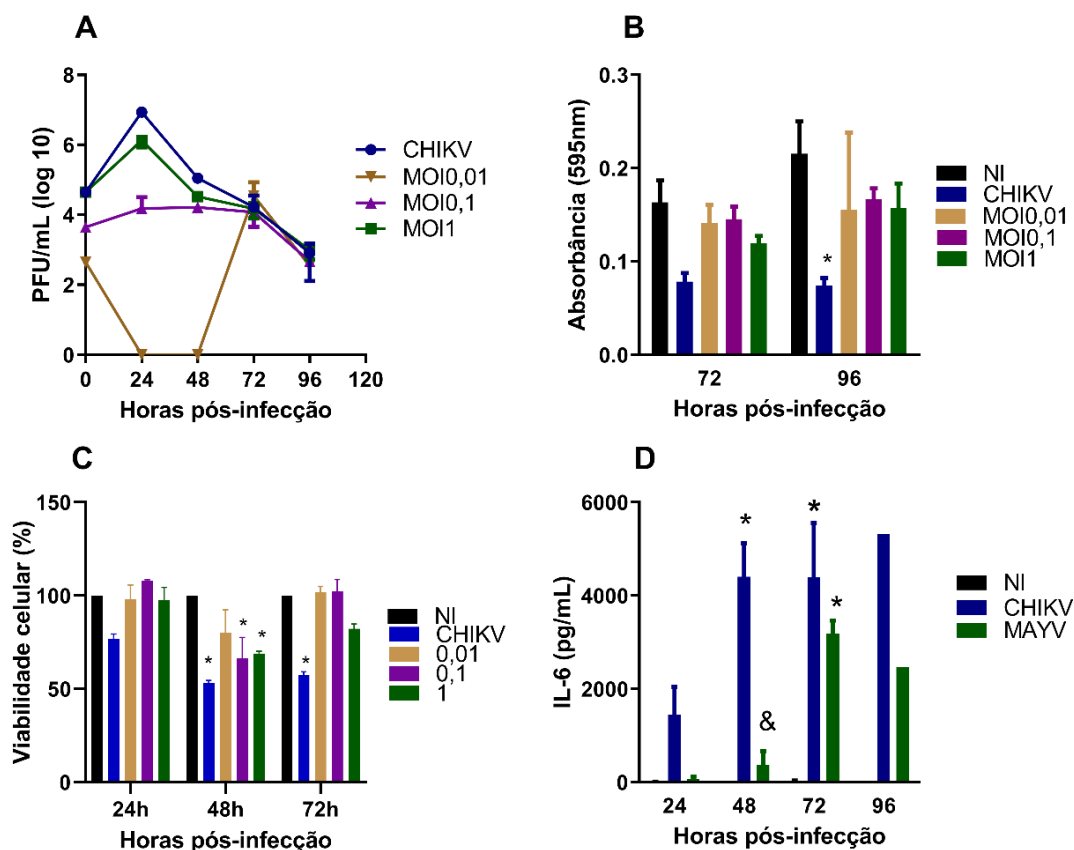


Figura 39. Avaliação da resposta de osteoblastos primários com 14 dias de diferenciação a infecção do MAYV. A cultura de osteoblastos primários foi obtida a partir de células extraídas da medula óssea de camundongos C57BL6j e CCR2^{-/-}, e em seguida submetidas ao processo de diferenciação com meio osteogênico por 14 dias. Após diferenciação os osteoblastos foram infectados com o MAYV ou com CHIKV na MOI1. (A) Titulação do vírus MAYV e CHIKV nas culturas de osteoblastos WT CCR2^{-/-} e tratadas com o antagonista do CCR2 (RS504393). (B) Avaliação da atividade da fosfatase alcalina. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT nos osteoblastos WT (C), CCR2^{-/-} e tratadas com RS504393 (E). A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

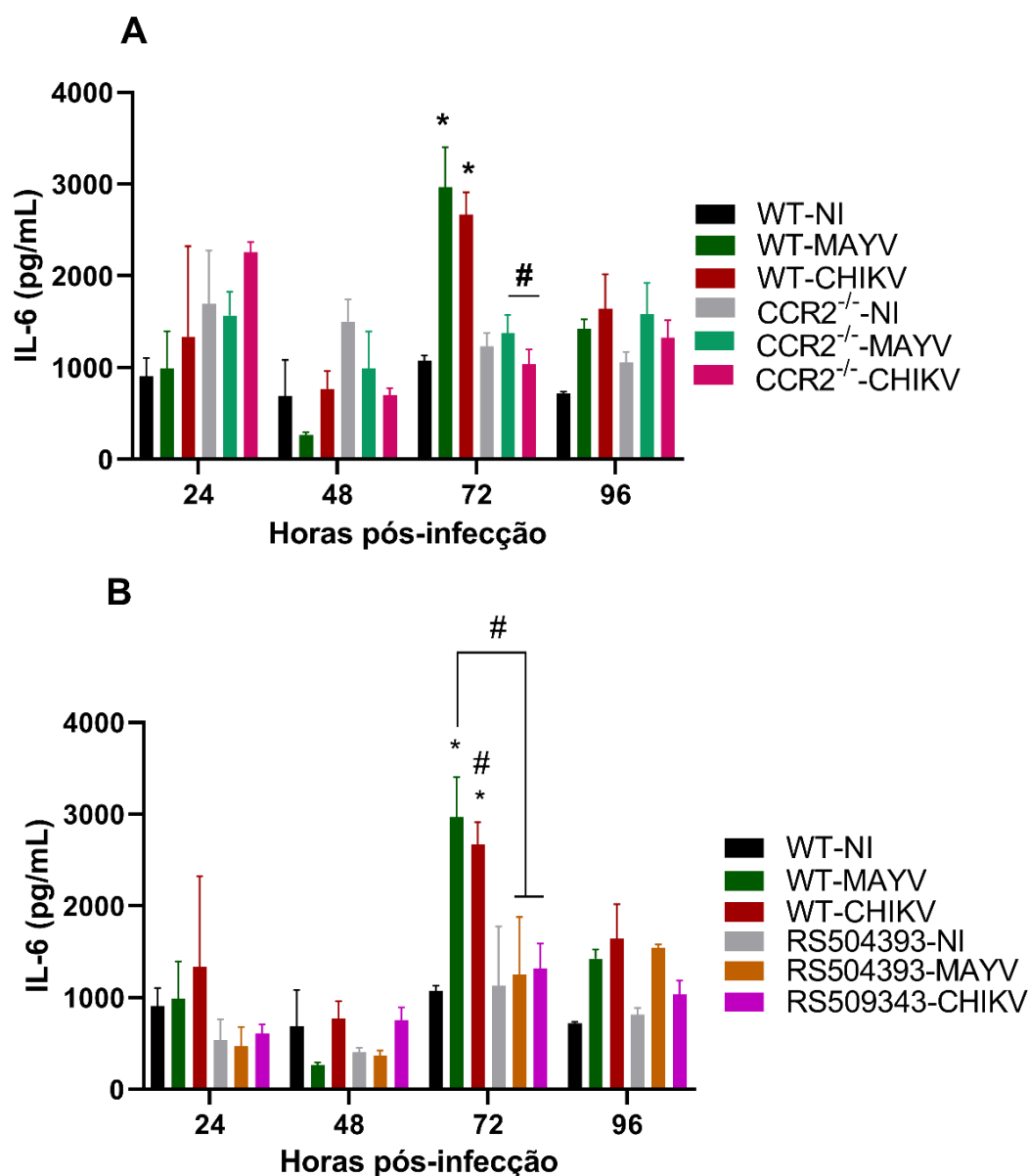


Figura 40. Perfil de resposta de diferentes culturas de osteoblastos a infecção pelo MAYV e CHIKV. O sobrenadante das culturas de osteoblastos WT (C), CCR2^{-/-} e tratadas com RS504393 foram coletados em vários tempos pós-infecção. (A e B) Aumento de IL-6 nas culturas de osteoblastos WT após 72h pós-infecção. A análise estatística foi realizada com two-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

6.6 Papel da citocina IL-6 na patogênese da perda óssea induzida pelo MAYV

Com base nos resultados anteriores, no qual foi observada uma alta produção de IL-6 pelos diferentes tipos celulares envolvidos no metabolismo do tecido ósseo, decidiu-se analisar o seu papel *in vivo* na patogênese da perda óssea do MAYV. Os resultados de μ CT

demonstraram que a infecção de camundongos IL-6^{-/-} resultou em um fenótipo de proteção da perda óssea, semelhante ao observado para os animais CCR2^{-/-} (FIG. 41).

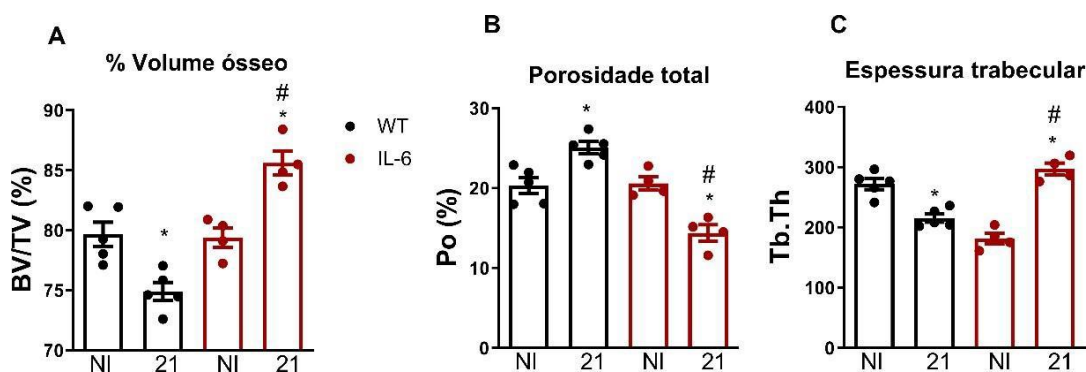


Figura 41. A Ausência da citocina IL-6 protege os animais contra a perda óssea induzida pelo MAYV. Camundongos com 4 semanas de idade WT e CCR2^{-/-} foram infectados no coxim da pata traseira direita com 10⁶ PFU de MAYV. No dia 21 PI, os animais foram sacrificados e a tíbia foi removida para análise de micrCT. (A) Fração do volume ósseo trabecular, (B) Espessura trabecular, (C) Porosidade na tíbia. A estatística foi realizada com One-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As análises são representativas de pelo menos cinco camundongos por grupo.

7. Discussão

O MAYV é um alfavírus emergente no continente americano, que possui grande potencial de urbanização e recentemente se tornou um importante problema de saúde pública no Brasil (HOTEZ et al., 2017). MAYV, como RRV e CHIKV, é responsável por causar uma doença inflamatória musculoesquelética altamente debilitante, que inclui poliartralgia/poliartrite e mialgia. A doença induzida por alfavírus artritogênicos é classificada como uma imunopatologia (ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013; MOSTAFAVI et al., 2019). A imunopatologia está sendo cada vez mais reconhecida em muitas doenças virais humanas, como dengue, zika, influenza e, mais recentemente, na COVID19 (DAMJANOVIC et al., 2012; CULSHAW et al., 2017; GUSTINI et al., 2020). Portanto, a investigação dos mecanismos de resposta imune que influenciam a patogênese da infecção por MAYV permitiria projetar melhores estratégias de tratamento para limitar a inflamação e o dano tecidual mediado pela inflamação (MOSTAFAVI et al., 2019). Os principais achados do presente estudo podem ser assim resumidos: a) A infecção de camundongos C57BL6 induziu uma doença inflamatória aguda, caracterizada por edema local, hipernocicepção, miosite, replicação em órgãos-alvo, produção de diversos mediadores inflamatórios e reabsorção óssea; b) A ausência do receptor CCR2 tem efeito protetor na infecção pelo MAYV, apresentando sinais de doenças mais leves, menor carga viral, menor dano tecidual e ausência de perda óssea; c) O infiltrado inflamatório

dos camundongos C57BL6 é composto predominantemente por macrófagos, enquanto nos animais $CCR2^{-/-}$ foi substituído por neutrófilos; e) MAYV tem o potencial de modular a capacidade intrínseca de osteoblastos, osteoclastos e macrófagos de produzir citocinas (FIG. 42).

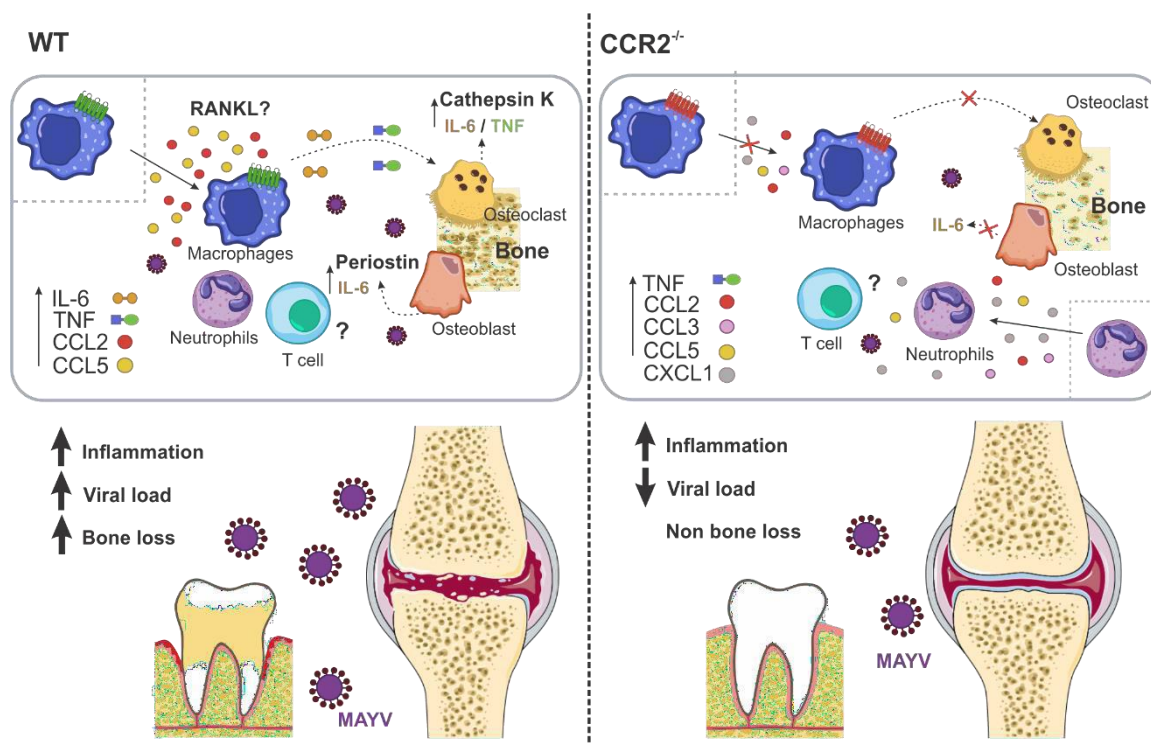


Figura 42. Mecanismo envolvido na osteoclastogênese induzida pelo MAYV. A infecção por MAYV induz uma resposta inflamatória robusta em um sítio de infecção em animais WT e $CCR2^{-/-}$, mediada por diferentes citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Este processo inflamatório é responsável pelo dano tecidual e também pela perda óssea. A ausência de perda óssea em animais $CCR2^{-/-}$ mostrou que a sinalização $CCR2/CCL2$ é essencial para a migração de macrófagos para o sítio de infecção. O microambiente inflamatório indicado pelo MAYV em diferentes células, promoveu a diferenciação de macrófagos em osteoclastos por um mecanismo provavelmente independente do RANKL. Sugere-se que a ação direta das citocinas IL-6 e TNF sejam capazes de favorecer a formação de novos osteoclastos. O aumento de osteoclastos e sua atividade promove a perda óssea. O papel das células T na perda óssea do MAYV não foi investigado neste trabalho.

Os mecanismos moleculares e celulares da patogênese do MAYV são pouco compreendidos. A partir de modelos animais e estudos com pacientes, o MAYV, CHIKV e RRV demonstraram induzir uma forte resposta inflamatória local, caracterizada pelo predomínio de macrófagos e dos mediadores pró-inflamatórios IL-6, TNF, $INF-\gamma$ e CCL2 (GARDNER et al., 2010; LIDBURY et al., 2008; SANTIAGO et al., 2015; TAPPE et al., 2017; NG et al., 2017; Santos et al., 2019). O eixo $CCL2-CCR2$ tem sido proposto como a principal via responsável pelo recrutamento de monócitos e macrófagos em infecções alfavirais. Assim, estudos sobre o papel dos monócitos/macrófagos e do eixo $CCL2-CCR2$ na infecção por

diferentes alfavírus artrítogênicos permitiriam entender a interação dos alfavírus com esses fatores e, assim, elucidar os mecanismos associados ao desenvolvimento de uma doença mais grave ou moderada (MOSTAFAVI et al., 2019).

Este trabalho mostrou que a infecção de camundongos WT com 4 semanas de idade foi caracterizada pela replicação e disseminação do MAYV para vários tecidos, bem como pela indução de sinais clínicos da doença, como edema plantar e hipernocicepção articular persistente. Esses sinais foram acompanhados por extensa inflamação no tecido muscular. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em outros modelos animais propostos para MAYV e outros alfavírus (MORISSON et al., 2006; GARDNER et al., 2010; SANTOS et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2019; MOTA et al., 2020). A resposta inflamatória foi caracterizada pela produção local das quimiocinas CCL2 e CCL5 e das citocinas IL-6 e TNF. Curiosamente, foram observados altos níveis de CCL2 sistemicamente no soro e em outros tecidos, como maxila, músculo e baço. Níveis elevados de quimiocina CCL5 também foram detectados no músculo quadríceps. Esses mediadores inflamatórios foram relatados em outros modelos animais para MAYV, bem como para CHIKV e RRV (LIDBURY et al., 2008; GARDNER et al., 2010; HERRERO et al., 2011; Santos et al., 2019; Figueiredo et al., 2019). Pacientes com artralgia persistente durante a infecção por MAYV apresentaram níveis elevados de vários mediadores inflamatórios, incluindo a citocina IL-6, que permaneceu elevada por mais de 12 meses após a infecção. A fase aguda da doença nesses pacientes foi marcada por uma alta expressão de CCL2, e permaneceu elevada por meses após a infecção (SANTIAGO et al., 2015). Esses mediadores, que têm sido constantemente relatados no soro de pacientes infectados com diferentes alfavírus artrítogênicos, indicam uma assinatura comum da resposta inflamatória durante a infecção por esses vírus (TENG et al., 2015; SANTIAGO et al., 2015; TAPPE et al., 2017). No entanto, o papel de cada um desses mediadores na patogênese das doenças alfavirais não está bem estabelecido. A quimiocina CCL2 é importante para o recrutamento de monócitos/macrófagos para o local da infecção, que são células importantes no desenvolvimento de miosite e artrite (MORISSON et al., 2006; RULLI et al., 2009; RULLI et al., 2011). As citocinas IL-6 e TNF têm sido descritas como tendo um papel importante no dano tecidual (FIGUEIREDO et al., 2019). Além disso, CCL2 e a citocina IL-6 têm sido associadas a patologias ósseas induzidas por CHIKV e RRV (NORET et al., 2012; CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015).

Nas doenças reumáticas inflamatórias, a inflamação é considerada o principal mecanismo responsável pela perda óssea, e essas citocinas já foram descritas como tendo papel

central na perda óssea na AR e na infecção por outros alfavírus (CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015; COURTY et al., 2019). A ocorrência de erosão óssea, semelhante à da artrite reumatoide (AR), tem sido relatada na articulação de pacientes infectados pelo CHIKV. Alguns estudos em modelos animais para CHIKV e RRV, bem como em cultura de células osteoblásticas, demonstraram que a inflamação induzida no microambiente ósseo desencadeia reabsorção óssea mediada por osteoclastos (NORET et al., 2012; CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015). Chen et al. (2014) mostraram que o RRV infecta osteoblastos e induz a produção de IL-6, que por sua vez leva ao aumento da expressão de CCL2, alterações na razão RANKL:OPG e, conseqüentemente, à perda óssea. O bloqueio de IL-6 e CCL2 em modelos animais para RRV e CHIKV, foi acompanhado por uma melhora significativa na perda óssea (RULLI et al., 2009; RULLI et al., 2011; CHEN et al., 2014; CHEN et al., 2015).

Neste trabalho, foi demonstrado que o MAYV também tem o potencial de induzir a perda óssea local e sistêmica. Assim, como observado para RRV e CHIKV, o CCL2 é provavelmente um mediador chave na osteoclastogênese do MAYV, dado seu aumento significativo de forma sistêmica em animais infectados. A análise da expressão de genes do metabolismo ósseo na maxila revelou que a infecção por MAYV induz a perda óssea mediada por osteoclastos. Isso foi evidenciado pelo aumento significativo da expressão da cathepsina K, uma enzima produzida pelos osteoclastos, que cataboliza as moléculas da matriz extracelular e forma a lacuna de reabsorção (VISCONTI et al., 2019). A periostina é um gene expresso principalmente por osteoblastos e tem sido descrito como tendo um importante papel no reparo tecidual. Semelhante ao observado para o MAYV, níveis aumentados de expressão de periostina foram descritos em um modelo animal para osteoartrite (OA) (ZHANG et al., 2012). Chijimatsu et al. (2015) relataram que a periostina foi regulada positivamente na cartilagem de pacientes com OA e que pode amplificar eventos inflamatórios e acelerar a patologia da OA. A ausência de aumento na expressão de RANKL pode indicar que a osteoclastogênese induzida por MAYV ocorre por um mecanismo independente de RANKL, no qual citocinas inflamatórias como IL-6 ou TNF podem induzir diretamente a formação de osteoclastos (KUDO et al., 2003; AMARASEKARA et al., 2018).

A doença artrítica é geralmente caracterizada por altos níveis de CCL2 e infiltrados de monócitos/macrófagos, e também é bem descrita para artropatias alfavirais. Dado o importante papel desta via CCL2/CCR2 na patologia de muitas doenças, muitos agentes terapêuticos visando a quimiocina CCL2 e o receptor CCR2 foram desenvolvidos (POOL et al., 2014). O

tratamento de camundongos infectados com RRV ou CHIKV com bindarit, uma droga que inibe a produção de CCL2, resultou na melhora da doença reumática induzida por esses vírus (RULLI et al., 2009; RULLI et al., 2011; CHEN et al., 2015). No entanto, a ausência de CCR2 tem sido controversa em diferentes doenças reumáticas (QUINONES et al., 2005; RAGHU et al., 2017). A infecção de camundongos CCR2^{-/-} com CHIKV mostrou uma doença mais grave, prolongada e erosiva e foi dominada por neutrófilos, com replicação e persistência viral não sendo significativamente afetadas (POOL et al., 2014). Curiosamente, foi demonstrado que camundongos CCR2^{-/-} infectados pelo MAYV apresentaram doença mais branda, com menor carga viral em alguns tecidos, rápida recuperação da hipernocicepção articular e ausência de perda óssea, quando comparados aos camundongos WT. O edema e o pico do processo inflamatório nos camundongos CCR2^{-/-} foi mais tardio em relação aos animais WT. Esse atraso pode ser explicado pela escassez de macrófagos M2 (derivado de monócitos CCR2⁺) no local da infecção, que são células importantes para a resolução da inflamação e regeneração tecidual. Pool et al. (2014) demonstraram em seu modelo de camundongos CCR2^{-/-} para CHIKV uma menor regulação positiva de marcadores de macrófagos M2. Interessantemente, conforme descrito para CHIKV, foi observado um aumento significativo nos níveis de CXCL1, acompanhado pela substituição de um infiltrado de macrófagos por neutrófilos na pata de camundongos CCR2^{-/-}. Esse relevante infiltrado de neutrófilos durante a infecção do MAYV nos animais nocautes, associada a uma menor carga viral, sugere que essas células estão desempenhando um papel importante na eliminação do MAYV, sem causar um maior dano tecidual. A resposta dos neutrófilos durante infecções virais tem sido menos estudada e ainda não é completamente claro como eles atuam no controle viral. Alguns trabalhos tem demonstrado que durante infecções virais agudas, os neutrófilos restringem a replicação e disseminação viral por meio de fagocitose, degranulação, explosão respiratória (ROS), secreção de citocinas e liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) (MA et al, 2021; SCHÖNRICH e RAFTERY, 2016).

As NETs são uma teia de DNA conjugada com enzimas antimicrobianas, como mieloperoxidase, histonas e α -defensinas, que captura e inativa diferentes patógenos, incluindo vírus (SCHÖNRICH e RAFTERY, 2016). Tem sido demonstrado *in vitro* que muitos vírus podem induzir diretamente os neutrófilos a liberarem NETs (RAFTERY et al, 2014). O processo de produção das NETs inicia após a ativação dos neutrófilos via os receptores de reconhecimento padrão (PRR), seguida da produção de ROS. Os vírus podem estimular a produção de NET através de receptores Toll-like presentes na superfície celular ou no

endossoma. O HIV-1, por exemplo, atua através dos receptores endossomais TRL7 e TRL8, e o vírus respiratório sincicial (RSV) através do TRL4, presente na superfície celular. Por outro lado, foi demonstrado para o hantavírus que a formação de NET é mediada via sinalização da integrina $\beta 2$ (RAFTERY et al, 2014; SCHÖNRICH e RAFTERY, 2016).

Recentemente, Hiroki et al. (2020) relataram que o CHIKV induz a produção de NETs em neutrófilos murinos e humanos *in vitro*, e o mecanismo de indução de NETs em neutrófilos murinos pelo CHIKV é mediado por TRL7 e a produção de ROS. Além disso, foi demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo* que as NETs têm atividade antiviral, promovendo a neutralização do CHIKV e controle da carga viral (HIROKI et al, 2020). Dessa forma, seria interessante investigar o papel do neutrófilos no controle da carga viral do MAYV, especialmente nos animais $CCR2^{-/-}$, e se esse controle está relacionado com a produção de NETs. Por outro lado, alguns estudos tem relatado que algumas características e funções dos neutrófilos, como número, tempo de vida e capacidade antiviral podem ser influenciadas durante eliminação viral. Durante a infecção pelo RSV, observou-se que ele aumentou o tempo de vida de neutrófilos humanos através da produção de IL-6, que é capaz de inibir a apoptose (LINDEMANS et al, 2006; MA et al, 2021). O aumento na porcentagem de neutrófilos observado do dia 1 para o dia 7 na pata dos animais nocautes durante infecção pelo MAYV, sugere que o MAYV pode afetar tanto no número quanto no tempo de vida dos neutrófilos. Isso mostra a importância de avaliar como a infecção pelo MAYV ou outros alfavírus podem interferir na atividade e comportamento do neutrófilos, uma célula pouco estudada no contexto da infecção por esses vírus.

A intensa migração de monócitos $CCR2^{+}$ para os sítios de infecção em animais WT sugere que essas células desempenham um papel central na perda óssea causada nesses animais. E isso é fortemente confirmado pela proteção contra a perda óssea observada em animais nocautes, no qual há intensa redução no influxo de monócitos $CCR2^{+}$. Além disso, a diminuição da porcentagem de macrófagos residentes em ambos os grupos sugere que o MAYV pode estar replicando nessas células, já descrito como um importante alvo de replicação e persistência no tecido alvo para alfavírus (CAVALHEIRO et al., 2016). Esta população em animais WT é rapidamente recuperada dentro de 7 dias PI, à medida que os monócitos inflamatórios infiltrantes se transformam em macrófagos no tecido. A presença de linfócitos $TCD4^{+}$ e $TCD8^{+}$ foi semelhante em ambos os animais.

Os dados de silenciamento mostraram que a redução nos níveis de CCL2 está associada a uma melhora parcial da hipernocicepção, reforçando o papel dessa via na patogênese do MAYV. Além disso, o silenciamento de CCL2 também foi acompanhado por uma redução nos níveis de expressão de CCL5, CCL7 e TNF. A correlação observada na expressão desses mediadores indica que no microambiente inflamatório da infecção por MAYV, a secreção de CCL2 aumenta a expressão de TNF e o TNF, por sua vez, estimula a expressão de CCL2 e CCL5 (PROOST et al, 1996). Isso pode resultar em um ciclo de feedback positivo entre CCL2 e TNF. Nanki et al (2011) demonstraram que o TNF regula a produção de CCL2 e CCL5 em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS) de pacientes com AR (NANKI et al, 2001; NEUMARK et al, 2003; GSCHWANDTNER et al, 2019). Além disso, os dados também mostraram que o silenciamento de CCL2 modula a expressão de CCL7, uma importante quimiocina que regula a monocitose via CCR2 e que muitas vezes é co-induzida com CCL2 (PROOST et al, 1996; BARDINA et al, 2015).

Além disso, os resultados do limiar de hipernocicepção avaliados nos animais CCR2^{-/-} e nos animais que foram silenciados para CCL2, em conjunto, sugerem fortemente o papel do eixo CCL2-CCR2 no desenvolvimento dos comportamentos de dor induzido pelo MAYV. Muitos trabalhos têm demonstrado que a sinalização CCL2-CCR2 contribui para comportamentos de dor aguda e crônica (ZAREBSKA et al, 2017). O bloqueio farmacológico do CCR2, por exemplo, promove efeitos analgésicos em ratos neuropáticos (KWIATKOWSKI et al, 2017). De acordo com Kwiatkowski e colegas (2019), as quimiocinas CCL2 e CCL7, ligantes de CCR2, desempenham um papel crucial no desenvolvimento da dor neuropática em camundongos. Eles mostraram que a administração intratecal de CCL2 e CCL7 induz comportamentos de dor em camundongos *naive*. Além disso, eles mostraram que a injeção intratecal de anticorpos neutralizantes de CCL2 e CCL7, associada com a administração de opioides atenuou o comportamento de dor e aumentou a analgesia induzida por morfina e buprenorfina em camundongos neuropáticos (KWIATKOWSKI et al, 2019). Isto mostra a importância desse eixo na nocicepção e que a modulação destes fatores podem servir como um potencial alvo terapêutico no tratamento da dor induzida pelo MAYV.

No entanto, o tratamento com SiCCL2 não foi eficaz para melhorar o dano tecidual induzido pelo MAYV e reduzir o infiltrado inflamatório, sugerindo que provavelmente outras quimiocinas produzidas durante a infecção podem promover a migração/acumulação de células no tecido alvo de forma independente de CCR2 (HARINGMAN E TAK, 2004; SHI e PAMER

et al, 2014). Drevets et al. (2010) demonstraram que o IFN- γ é essencial para o influxo de monócitos para o cérebro durante a infecção sistêmica com *Listeria monocytogenes* virulenta e essa migração foi amplamente independente de um eixo específico quimiocina:receptor de quimiocina. Além disso, foi observado por eles, que a infecção promoveu um aumento na produção de várias quimiocinas envolvidas no recrutamento de células mieloides e isso explicou os influxos normais de monócitos Ly6C^{high} no cérebro em camundongos deficientes para CCL2, CCR1, CCR5, CXCR3 ou CX3CR1 (DREVETS et al, 2010). Isso mostra a importância de investigar outras vias de migração de células mieloides independentes de CCR2 na patogênese do MAYV e outros alfavírus artritogênicos. Curiosamente, esses dados também mostram que a hipernocicepção induzida pela infecção por MAYV está associada à produção de CCL2 e de citocinas inflamatórias, como TNF (HESS et al, 2010; KWIATKOWSKI et al, 2019).

Recentemente, foi demonstrado que o MAYV é capaz de se replicar em osteoblastos humanos (HOB), bem como em condrócitos humanos (HC) e sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (HFLS). Muitos estudos também mostraram que o CHIKV e o RRV também se replicam em células importantes para a artrite induzida por esses vírus (NORET et al., 2012; CHEN et al., 2014; BENGUE et al, 2019). Os dados de cultura revelaram diferenças na permissividade celular e na resposta à infecção por MAYV e CHIKV, propondo diferentes mecanismos na indução de suas patologias. Na cultura primária de osteoclastos WT e CCR2^{-/-} foi observado que o MAYV em MOI1 não foi capaz de estabelecer uma infecção produtiva nessas células, mas induziu uma alta produção de IL-6 e TNF, principalmente nas células WT. Células diferenciadas semelhantes a osteoclastos infectadas por CHIKV também produzem altos níveis de TNF (PHUKLIA et al., 2013). TNF e IL-6 são considerados as citocinas osteoclastogênicas mais potentes e desempenham um papel central na patogênese da AR (PHUKLIA et al., 2013). Essas citocinas podem estimular a osteoclastogênese de duas maneiras, por um mecanismo independente de RANKL ou indiretamente aumentando a expressão de RANKL e RANK, em osteoblastos e precursores de osteoclastos, respectivamente (KUDO et al., 2003; PONZETTI e RUCCI, 2019). Além disso, foi demonstrado em cultura que TNF e MCS-F são capazes de induzir diretamente a diferenciação de osteoclastos. Assim, de acordo com dados *in vivo* e de cultura de células, sugere-se que a perda óssea observada em animais WT pode ser causada pela ação direta do TNF, que é capaz de induzir a formação de osteoclastos e osteólise local. A infecção de macrófagos WT e CCR2^{-/-} resultou na produção de IL-6 e TNF, respectivamente.

Osteoblastos com 7 d.p.i foram permissivos à infecção por MAYV e CHIKV, conforme relatado anteriormente em outros estudos. MAYV não afetou a função osteogênica dessas células. No entanto, o CHIKV interferiu na atividade da fosfatase alcalina (ALP) e reduziu a viabilidade celular. A ALP é um importante marcador de atividade osteogênica. Não houve diferenças na mineralização entre as células infectadas e o controle negativo. Roy et al. (2020) também demonstraram que o CHIKV reduziu a atividade da ALP em 9 d.p.d. osteoblastos infectados. Infecção de osteoblastos com 14 d.p.d. a partir BMSCs isoladas de animais WT e CCR2^{-/-} e osteoblastos WT com CCR2 bloqueado farmacologicamente, demonstraram que essas células são permissivas ao CHIKV, mas não ao MAYV. A atividade osteogênica dessas células não foi afetada pelo CHIKV, diferentemente do relatado por Roy et al. (2019), em que o CHIKV reduziu a deposição de matriz mineralizada em células com 14 d.p.d. A produção de IL-6 foi induzida por CHIKV e MAYV apenas em osteoblastos WT 7 ou 14 d.p.d. Além disso, a infecção de camundongos nocautes para o IL-6 apresentaram um fenótipo de proteção para a perda óssea. Chen et al. (2014) também demonstrou, que o bloqueio de IL-6 com anticorpo neutralizante impediu a perda óssea nos animais infectados com RRV. Em conjunto, esses dados mostram a importância da produção de IL-6 pelos osteoblastos no microambiente ósseo para promover a desregulação da homeostase no tecido ósseo, como consequência da infecção pelo MAYV.

No geral, os resultados demonstram que a ausência de sinalização CCL2/CCR2 minimizou a doença causada pelo MAYV e protegeu os animais contra a perda óssea. Desta forma, foi possível demonstrar um dos mecanismos subjacentes à patologia óssea induzida por MAYV e que o eixo CCL2/CCR2 é um potente alvo terapêutico.

8. Referências

Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Rodríguez, Y., Pacheco, Y., Anaya, J. M., & Ramírez-Santana, C. (2018). Mayaro: an emerging viral threat? **Emerging microbes & infections**. 7(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0163-5>;

Aletaha D, Funovits J, Smolen JS. Physical disability in rheumatoid arthritis is associated with cartilage damage rather than bone destruction. **Ann Rheum Dis**. 2011;70(5):733- 739. doi:10.1136/ard .2010.138693;

Amarasekara, D. S., Hyeongseok Yun, S. Kim, Nari Lee, H. Kim and J. Rho. “Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. **Immune Network**. Annals of the Rheumatic Diseases. 76:914-922, 2017;

Anderson C.R., Downs W., Wattley G. et al. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad, B.W.I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 6:1012–6, 1957;

Assunção-miranda, C. Cruz-Oliveira e A. T. Da Poian. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. **BioMed Research International. Review**. 2013;

Atukorala, I., & Chang, T. (2014). Musculoskeletal Disorders. Manson’s. **Tropical Infectious Diseases**, 1027–1037.e2. doi:10.1016/b978-0-7020-5101-2.00070-4;

August A.J., Liria J., Forrester N.L. et al. Evolutionary and ecological characterization of Mayaro Virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**. 21: 1742-1750, 2015;

Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. **J Biol Chem**. (2000)275:4858–64.doi:10.1074/jbc.275.7.4858;

Baaten BJ, Tinoco R, Chen AT, Bradley LM. Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44. **Front Immunol**. 2012;3:23. Published 2012 Feb 27. doi:10.3389/fimmu.2012.00023;

Bardina, *et al.*, Differential Roles of Chemokines CCL2 and CCL7 in Monocytosis and Leukocyte Migration during West Nile Virus Infection. **J.I.** 195, 4306–4318 (2015).

Bengue M, Ferraris P, Baronti C, et al. Mayaro Virus Infects Human Chondrocytes and Induces the Expression of Arthritis-Related Genes Associated with Joint Degradation. **Viruses**. 11(9):797, 2019. doi:10.3390/v11090797;

Bonecchi, R., Graham G.J., Atypical chemokine receptors and their roles in the resolution of the inflammatory response. **Front. Immunol**. 7, 224, 2016;

Bose, S., Cho, J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CC2 in neurodegenerative diseases. **Arch Pharm. Res**. 36, 1039-1050, 2013. doi.org/10.1007/s12272-013-0161-z;

Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.** 13(4):235. 2011. doi: 10.1186/ar3380. PMID: 21861862;

Braun, T., Zwerina, J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res Ther.** 13, 235 (2011). <https://doi.org/10.1186/ar3380>;

Brunini S., França D.D.S., Silva J.B. et al. High frequency of Mayaro Virus IgM among febrile patients, Central Brazil. **Emerging Infectious Diseases.** 23: 1025-1026, 2017;

Calisher C.H., Gutiérrez E., Maness K.S., Lord R.D. Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. **Bulletin of the Pan American Health Organization.** 8: 243–248, 1974;

Cambien B., Pomeranz M., Millet M-A., et al. Signal transduction involved in MCP-1-mediated monocytic transendothelial migration. **Blood.** 97 (2): 359–366, 2001. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V97.2.359>;

Cavalheiro M.G., Costa L.S., Campos H.S. et al. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. **Academia Brasileira de Ciências.** 88:1485-1499, 2016;

Chaitanya IK, Muruganandam N, Sundaram SG. et al. Role of proinflammatory cytokines and chemokines in chronic arthropathy in CHIKV infection. **Viral Immunology.** 24: 265-71, 2011;

Charo, I. F., Myers, S. J., Herman, A., et al. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 91(7), 2752–2756. (1994) <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2752>;

Chemin K, Gerstner C and Malmström V. Effector Functions of CD4+ T Cells at the Site of Local Autoimmune Inflammation—Lessons From Rheumatoid Arthritis. **Front. Immunol.** 10:353, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00353;

Chen CY, Fuh LJ, Huang CC, Hsu CJ, Su CM, Liu SC, Lin YM, Tang CH. Enhancement of CCL2 expression and monocyte migration by CCN1 in osteoblasts through inhibiting miR-518a-5p: implication of rheumatoid arthritis therapy. **Sci Rep.** 7(1):421, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-00513-0;

Chen W, Foo SS, Sims NA, et al. Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. **Trends Microbiol.** Jan; 23(1):35-43, 2015. doi: 10.1016/j.tim.2014.09.005;

Chen W, Foo SS, Taylor A. et al. Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein synthesis, protects against bone loss induced by chikungunya virus infection. **J Virol.** 89(1):581-93, 2015. doi: 10.1128/JVI.02034-14;

Chen, S.-S. Foo, R. W. Li, P. N. Smith, S. Mahalingam, Osteoblasts from osteoarthritis patients show enhanced susceptibility to Ross River virus infection associated with delayed type I interferon responses. **Virology** **11**, 189 (2014).

Chen, W., Foo, S., Rulli, N. E. et al. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. **111**: 6040–6045, 2014;

Chijimatsu R, Kunugiza Y, Taniyama Y, et al. Expression and pathological effects of periostin in human osteoarthritis cartilage. **BMC Musculoskeletal Disord**. **16**:215, 2015. doi:10.1186/s12891-015-0682-3;

Chirathaworn C, Chansaenroj J, Poovorawan Y. Cytokines and Chemokines in Chikungunya Virus Infection: Protection or Induction of Pathology. **Pathogens**. **2020**;9(6):415. doi:10.3390/pathogens9060415;

Coury F, Peyruchaud O and Machuca-Gayet I. Osteoimmunology of Bone Loss in Inflammatory Rheumatic Diseases. **Front Immunol**. **10**:679, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00679;

Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton GR. The immunopathology of dengue and Zika virus infections. **Current Opinion in Immunology**, Volume 48, 1-6, 2017;

Damjanovic D, Small CL, Jeyananthan M. et al. Immunopathology in influenza virus infection: Uncoupling the friend from foe. **Clinical Immunology**, Volume 144, 57-69, 2012;

Danks L, Komatsu N, Guerrini MM, Sawa S, Armaka M, Kollias G, et al. RANKL expressed on synovial fibroblasts is primarily responsible for bone erosions during joint inflammation. **Ann Rheum Dis**. **75**:1187–95, 2019. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-207137;

Dansereau, MA., Midavaine, É., Bégin-Lavallée, V. et al. Mechanistic insights into the role of the chemokine CCL2/CCR2 axis in dorsal root ganglia to peripheral inflammation and pain hypersensitivity. **J Neuroinflammation** **18**, 79 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02125-y>;

De Thoisy B., Gardon J., Salas R.A. et al. Mayaro Virus in Wild Mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**. **9**: 1326–1329, 2003;

Diagne CT, Bengue M, Choumet V, Hamel R, Pompon J, Missé D. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. **Pathogens**. **9**(9):738. 2020. doi:10.3390/pathogens9090738;

Donate PB, Alves de Lima K, Peres RS, et al. Cigarette smoke induces *miR-132* in Th17 cells that enhance osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2021 Jan 5;118(1):e2017120118. doi: 10.1073/pnas.2017120118;

Drevets, M. J. Dillon, J. E. Schawang, J. A. Stoner, P. J. M. Leenen, IFN- γ triggers CCR2-independent monocyte entry into the brain during systemic infection by virulent *Listeria monocytogenes*. **Brain, Behavior, and Immunity** **24**, 919–929 (2010).

Dussault, M. Pouliot, Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online* **8**, 1–10 (2006).

Esposito, D.L.A e Fonseca, B.A.L.D. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2017;

Figueiredo CM, Neris RLDS, Gavino-Leopoldino D, et al. Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity. *Front Microbiol.* 2019 Oct 1;10:2246. doi: 10.3389/fmicb.2019.02246;

Fischer C, Bozza F, Merino Merino XJ, et al. Robustness of Serologic Investigations for Chikungunya and Mayaro Viruses following Coemergence. *mSphere.* 5;5(1):e00915-19, 2020. doi: 10.1128/mSphere.00915-19;

Flegar D, Filipović M, Šućur A, et al. Preventive CCL2/CCR2 Axis Blockade Suppresses Osteoclast Activity in a Mouse Model of Rheumatoid Arthritis by Reducing Homing of CCR2^{hi} Osteoclast Progenitors to the Affected Bone. *Front Immunol.* 12:767231, 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.767231;

Froberg MK, Adams A, Seacotte N, et al. Cytomegalovirus infection accelerates inflammation in vascular tissue overexpressing monocyte chemoattractant protein-1. *Circ Res* 2001;89:1224–30;

Gardner J, Anraku I, Le TT, et al. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J Virol.* 2010;84(16):8021–8032. doi:10.1128/JVI.02603-09;

Gosset M., Berenbaum F., Thirion S., Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nature protocols.* 3:1253–1260, 2008;

Gschwandtner, Martha and Derler, Rupert and Midwood, Kim S. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Frontiers in Immunology.* 10, 27-59, 2019. DOI:10.3389/fimmu.2019.02759;

Gu Q, Yang H, Shi Q. Macrophages and bone inflammation. *J Orthop Translat.* 2017;10:86-93. 2017. doi:10.1016/j.jot.2017.05.002;

Gustine JN and Jones D. Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *Am J Pathology.* 191 (1), 4-17, 2020. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.08.009;

Haist KC, Burrack KS, Davenport BJ, Morrison TE. Inflammatory monocytes mediate control of acute alphavirus infection in mice. *PLoS Pathog.* 2017 Dec 15;13(12):e1006748. doi: 10.1371/journal.ppat.1006748;

Halsey, E. S., Siles, C., Guevara, C. et al. Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. *Emerging Infectious Diseases.* 19: 1839-1842, 2013;

Hassing RJ, Leparac-Goffart I, Blank et al. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. *J Infect.* 61(4):343-5, 2010. doi: 10.1016/j.jinf.2010.06.009.

Herrero, L. J., Nelson, M., Srikiatkachorn, A. et al. Critical role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Ross River virus-induced arthritis and myositis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 29, p. 12048- 86 12053, julho 2011;

Hess, *et al.*, Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **108**, 3731–3736 (2011).

Hiroki CH, Toller-Kawahisa JE, Fumagalli MJ, et al. Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. **Front Immunol.** 10:3108, 2020. doi:10.3389/fimmu.2019.03108;

Hoch A.L., Peterson N.E., Leduc J.W. et al. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 30:689–698, 1981;

Holmes AC, Basore K, Fremont DH, Diamond MS. A molecular understanding of alphavirus entry. **PLoS Pathog** 16(10): e1008876. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008876>, 2020;

Hotez PJ, Murray KO. Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika-and now Mayaro? **PLoS Negl Trop Dis.** 2017;11(8):e0005462. doi:10.1371/journal.pntd.0005462;

J. J. Haringman, P. P. Tak, Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? **Arthritis Res Ther** **6**, 93 (2004).

James SL, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **Lancet.** 392: 1789-858, 2018;

Kelvin A.A., Banner D., Silvi G. et al. Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** 5:e1279, 2011;

Komine M, Kukita A, Kukita T, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O. Tumor necrosis factor- α cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. **Bone.** 28:474–83, 2001;

Kudaeva, F. M., Speechley, M. R., & Pope, J. E. A systematic review of viral exposures as a risk for rheumatoid arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism.** 48 (4), 587-596, 2019. doi:10.1016/j.semarthrit.2018.03.011;

Kudo, O., A. Sabokbar, A. Pocock, I. Itonaga, Y. Fujikawa and N. Athanasou. “Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL independent mechanism.” **Bone**, 32 (1), 1-7, 2003;

Kumar S, Jaffar-Bandjee MC, Giry C. et al. Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection. **Virology journal**. 9:1-8, 2012;

Kwiatkowski K, Piotrowska A, Rojewska E, Makuch W, Mika J. The RS504393 Influences the Level of Nociceptive Factors and Enhances Opioid Analgesic Potency in Neuropathic Rats. **J Neuroimmune Pharmacol** (2017) 12:402–19. doi: 10.1007/s11481-017-9729-6;

Kwiatkowski K, Popiolek-Barczyk K, Piotrowska A, Rojewska E, Ciapała K, Makuch W, et al. Chemokines CCL2 and CCL7, but not CCL12, play a significant role in the development of pain-related behavior and opioid-induced analgesia. **Cytokine** (2019) 119:202–13. doi: 10.1016/j.cyto.2019.03.007;

Kwiatkowski, *et al.*, Bidirectional Action of Cenicriviroc, a CCR2/CCR5 Antagonist, Results in Alleviation of Pain-Related Behaviors and Potentiation of Opioid Analgesia in Rats With Peripheral Neuropathy. **Front. Immunol.** 11, 615327 (2020).

Labadie K, Larcher T, Joubert C, et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **J Clin Investigat.**120:894–906, 2010. doi: 10.1172/JCI40104;

Lednicky, J., De Rochars, V. M. B., Elbadry, M. et al. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**. 22, 2016;

Leung, J. Y., Ng, M. M., Jang, J., & Chu, H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. **Advances in Virology. Review**. 2011: 1-9, 2011;

Lidbury, B.A., Rulli, N.E., Suhrbier, A. et al. Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus. **The Journal of Infectious Diseases**. 197: 1585–1593, 2008;

Lima, W.G., Pereira, R.S., da Cruz Nizer, W.S. *et al.* Rate of exposure to Mayaro virus (MAYV) in Brazil between 1955 and 2018: a systematic review and meta-analysis. **Arch Virol**. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04889-9>;

Lindemans CA, Coffey PJ, Schellens IM, et al. Respiratory syncytial virus inhibits granulocyte apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB-dependent mechanism. **J Immunol**. 176(9):5529-37, 2016. doi: 10.4049/jimmunol.176.9.5529;

Liou, L.-b., et al., A new laboratory surrogate (Monocyte Chemotactic protein-1 for Disease Activity Score28: a favourable indicator for remission in rheumatoid arthritis. **Sci. Rep.**, 2020. 10(1): p. 1–11;

Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods** 25, 402–408 (2001);

Llagonne-Barets M, Icard V, Leparç-Goffart I, et al. A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. **J Clin Virol**. Apr; 77:66-8, 2016. doi: 10.1016/j.jcv.2016.02.013;

Long K. C., Ziegler S. A., Thangamani S., Hausser N. L., Kochel T. J., Higgs S., and Tesh R. B. Experimental transmission of mayaro virus by *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 85: 750–757, 2011;

Lorenz C, Freitas Ribeiro A, Chiaravalloti-Neto F. Mayaro virus distribution in South America. **Acta Trop.** 2019 Oct; 198:105093. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105093;

Ma Y, Zhang Y, Zhu L. Role of neutrophils in acute viral infection. **Immun Inflamm Dis.** 9(4):1186-1196, 2021. doi: 10.1002/iid3.500;

March L, Smith EU, Hoy DG, et al. Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** 28(3):353-66, 2014. doi: 10.1016/j.berh.2014.08.002;

Marks M, Marks JL. Viral arthritis. *Clin Med (Lond)*. 2016 Apr;16(2):129-34. doi: 10.7861/clinmedicine;

Mavian C, Rife BD, Dollar JJ, Cella E, Ciccozzi M, Prosperi MCF, Lednicky J, Morris JG, Capua I, Salemi M. Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. *Sci Rep*. 2017 Aug 18;7(1):8718. doi: 10.1038/s41598-017-07152-5;

Mellado M, Martínez-Muñoz L, Cascio G, Lucas P, Pablos JL, Rodríguez-Frade JM. T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. **Front Immunol.** 2015; 6:384. doi:10.3389/fimmu.2015.00384;

Miller RE, Tran PB, Das R, et al. CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2012 Dec 11;109(50):20602-7. doi: 10.1073/pnas.1209294110. Epub 2012 Nov 26;

Ministério da Saúde: Boletim epidemiológico 28. Volume 50, página 14. Outubro, 2019. Disponível em: https://www.conasems.org.br/wpcontent/uploads/2019/10/BE_multitematico_2_out.pdf. Acesso em: 10/04/2022;

Miotla Zarebska, J, Chanalaris A, Driscoll C. et al. CCL2 and CCR2 regulate pain-related behaviour and early gene expression in post-traumatic murine osteoarthritis but contribute little to chondropathy. **Osteoarthritis and cartilage.** 25 (3) 406-412, 2017. doi:10.1016/j.joca.2016.10.008;

Moadab F, Khorramdelazad H, Abbasifard M. Role of CCL2/CCR2 axis in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: Latest evidence and therapeutic approaches. **Life Sci.** 269:119034, 2021. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119034;

Mordillo-Mateos, L., Sánchez-Ramos, A., Coperchini, F. *et al.* Development of chronic pain in males with traumatic spinal cord injury: role of circulating levels of the chemokines CCL2 and CXCL10 in subacute stage. **Spinal Cord.** 57, 953–959 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41393-019-0311-3>;

Morrison TE, Whitmore AC, Shabman RS, Lidbury BA, Mahalingam S, Heise MT. Characterization of Ross River virus tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis. **J Virol.** 2006 Jan;80(2):737-49. doi: 10.1128/JVI.80.2.737-749;

Mostafavi H, Abeyratne E, Zaid A, Taylor A. Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as A Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease. **Viruses**. 2019;11(3):290. doi:10.3390/v11030290;

Mota MTO, Costa VV, Sugimoto MA, et al. In-depth characterization of a novel liveattenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease. *Sci Rep*. 10(1):5306, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-62084-x;

Mota, M. T. D. O., Ribeiro, M. R., Vedovello, D., & Nogueira, M. L. (2015). Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future virology**. 10(9), 1109-1122. <https://doi.org/10.2217/fvl.15.76>;

Mourão MP, Bastos Mde S, de Figueiredo RP, et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne Zoonotic Dis**. 2012;12(1):42–46. doi:10.1089/vbz.2011.0669;

Nanki, K. Nagasaka, K. Hayashida, Y. Saita, N. Miyasaka, Chemokines Regulate IL-6 and IL-8 Production by Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis. **J Immunol**. 167, 5381–5385 (2001);

Naveca FG, do Nascimento VA, de Souza VC et al. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 112:510-513, 2017;

Nayak T K, Mamidi P, Sahoo S S. et al. P38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases Interact With Chikungunya Virus Non-structural Protein-2 and Regulate TNF Induction During Viral Infection in Macrophages. **Frontiers in Immunology**. V. 10. 2019. Doi:10.3389/fimmu.2019.00786

Neumark, O. Sagi-Assif, B. Shalmon, A. Ben-Baruch, I. P. Witz, Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNF α cross-regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy factors. **Int. J. Cancer**. 106, 879–886 (2003).

Neumayr, A., Gabriel, M., Fritz, J. et al. Mayaro Virus Infection in Traveler Returning from Amazon Basin, Northern Peru. **Emerging Infectious Diseases**. 18: 695-696, 2012;

Ng LFP. Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. **Annu Rev Virol**. 2017 Sep 29;4(1):413-427. doi: 10.1146/annurev-virology-101416-041808;

Noret, M., Herrero, L., Rulli, N. et al. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts. **Journal of Infectious Diseases**. 206: 455-457, 2012;

O'Connor T, Borsig L, Heikenwalder M. CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**. 2015;15(2):105-18. doi: 10.2174/1871530315666150316120920.

Organização Mundial de Saúde: Musculoskeletal conditions. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions>. Acesso em: 22/04/2022;

Patterson AM, Siddall H, Chamberlain G, Gardner L, Middleton J. Expression of the duffy antigen/receptor for chemokines (DARC) by the inflamed synovial endothelium. **J Pathol.** 2002; 197:108–16;

Phuklia W, Kasisith J, Modhiran N, et al. Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: a possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. **Virus Res.** 177(2):179-88, 2013;

Piotrowska A, Kwiatkowski K, Rojewska E, Makuch W, Mika J. Maraviroc reduces neuropathic pain through polarization of microglia and astroglia - Evidence from in vivo and in vitro studies. **Neuropharmacology.** 2016 Sep; 108:207-19. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.024;

Ponzetti M and Rucci N. Updates on Osteoimmunology: What's New on the Cross-Talk Between Bone and Immune System. **Front. Endocrinol.** 10:236, 2019. doi: 10.3389/fendo.2019.00236;

Poo Y.S., Nakaya H., Gardner J. et al. CCR2 Deficiency Promotes Exacerbated Chronic Erosive Neutrophil-Dominated Chikungunya Virus Arthritis. **Diamond MS, ed. Journal of Virology.** 88:6862-6872, 2014;

Proost, A. Wuyts, J. van Damme, Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. **J Leukoc Biol.** 59, 67–74 (1996).

Quinones, MP, Estrada, C A, Kalkonde, Y. et al., The complex role of the chemokine receptor CCR2 in collagen-induced arthritis: implications for therapeutic targeting of CCR2 in rheumatoid arthritis. **J Mol Med** 83, 672–681 (2005). doi: 10.1007/s00109-005-0637-5.

Raftery MJ, Lalwani P, Krautkrämer E, et al. β 2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps. **J Exp Med.** 211(7):1485-1497, 2014. doi:10.1084/jem.20131092;

Raghu H, Lepus CM, Wang Q, et al. CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. **Ann Rheum Dis.** 2017 May;76(5):914-922. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210426;

Receveur MC, Grandadam M, Pistone T, Malvy D. Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January. **Euro Surveill.** 6;15(18):19563, 2010;

Ribeiro-Filho HV, Coimbra LD, Cassago A, et al. Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. **Nat Commun.** 12(1):3038, 2021. doi: 10.1038/s41467-021-23400-9;

Ribeiro-Filho, H.V., Coimbra, L.D., Cassago, A. et al. Cryo-EM structure of the mature and infective Mayaro virus at 4.4 Å resolution reveals features of arthritogenic alphaviruses. **Nat Commun.** 12, 3038 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23400-9>;

Roy E, Shi W, Duan B, Reid SP. Chikungunya virus infection impairs the function of osteogenic cells. **mSphere** 5:e00347-20, 2020. doi.org/10.1128/mSphere.00347-20;

Rulli N.E., Guglielmotti A., Mangano G. et al. Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. **Arthritis & Rheumatism.** 60: 2513–2523, 2009;

Rulli N.E., Rolph M.S., Srikiatkachorn A. et al. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute Chikungunya Virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. **The Journal of Infectious Diseases.** 204:1026-1030, 2011;

Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, et al, "The Role of IL-1 β in the Bone Loss during Rheumatic Diseases", **Mediators of Inflammation**, vol. 2015, <https://doi.org/10.1155/2015/782382>;

Santiago FW, Halsey ES, Siles C. et al. Long-term arthralgia after Mayaro Virus infection correlates with sustained pro-inflammatory cytokine response. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 9: 1–14, 2015.

Santos FM, Dias RS, de Oliveira MD, et al. Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. **PLoS Negl Trop Dis.** 13(5), 2019. [doi:10.1371/journal.pntd.0007375](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007375);

Santos, F.M., Dias, R.S., de Souza Fernandes, L. et al. Mayaro Virus Infection: Clinical Features and Global Threat. **Curr Treat Options Infect Dis** 12, 387–397 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40506-020-00240-7>;

Santos, Franciele Martins. Modelo animal de artrite e miosite induzidas pelo vírus Mayaro. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG. agosto de 2017;

Schaible HG, Ebersberger A, Von Banchet GS. Mechanisms of pain in arthritis. **Ann N Y Acad Sci.** 2002;966(1):343–54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04234.x>;

Schönrich G, Raftery MJ. Neutrophil Extracellular Traps Go Viral. **Front Immunol.** 19;7:366, 2016. [doi: 10.3389/fimmu.2016.00366](https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00366);

Serra OP, Cardoso BF, Ribeiro AL, et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 111(1):20-9, 2016. [doi: 10.1590/0074-02760150270](https://doi.org/10.1590/0074-02760150270);

Serra, O. P., Cardoso, B. F., Ribeiro, A. L. M. et al. Mayaro virus and dengue virus 1 and

4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 111: 20-29, 2016;

Shi, E. G. Pamer, Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol** 11, 762–774 (2011);

Slegers Cad, Keuter M, Günther S, et al. Persisting arthralgia due to Mayaro vírus infection in a traveler from Brazil: Is there a risk for attendants to the 2014 FIFA World Cup? **J Clin Virol**. 60: 317-319, 2014;

Smith G. C., and Francy D. B. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of mayaro and oropouche viruses. **J. Am. Mosq. Control Assoc.** 7: 89–93, 1991;

Smith JL, Pugh CL, Cisney ED, et al. Human Antibody Responses to Emerging Mayaro Virus and Cocirculating Alphavirus Infections Examined by Using Structural Proteins from Nine New and Old World Lineages. **mSphere**. 3(2):e00003-18, 2018. doi: 10.1128/mSphere.00003- 18;

Stankovic A., Slavic V., Stamenkovic B., et al. Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity. **Bratisl Lek Listy**. 110(10): 641–646, 2009;

Strauss, J. H. e Strauss, E. G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. **Microbiological Reviews**. 58: 491-562, 1994;

Sucur, A., Jajic, Z., Artukovic, M. *et al.* Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells. **Arthritis Res Ther**. 19 (142), 2017. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1337-6>;

Tanaka T, Minami M, Nakagawa T, Satoh M. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. **Neurosci Res**. 2004;48(4):463–9. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.01.004>;

Tappe D, Pérez-Girón JV, Just-Nübling G, et al. Sustained Elevated Cytokine Levels during Recovery Phase of Mayaro Virus Infection. **Emerg Infect Dis**. 22(4):750-2, 2016;

Teng T-S., Kam Y-W., Lee B., et al. A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**. 211:1925-1935, 2015;

Theilacker C, Held J, Allering L, Emmerich P and Schmidt-Chanasit J. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC Infect Dis**. 13: 369-372, 2013;

Vacchini ,A., M. Locati, E.M. Borroni, Overview and potential unifying themes of the atypical chemokine receptor family. **J. Leukoc. Biol.** 99 (6) (2016) 883–892;

Vieira CJ, Silva DJ, Barreto ES, et al. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Acta Trop.** Jul;147: 12-6, 2015. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.03.020;

Vieira, C. J., Silva, D. J., Barreto, E. S. et al. Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Elsevier/Acta Tropica.** 147: 12-16, 2015;

Visconti R, Iversen T, Cottrell J. A Review of Dysregulated Osteoblast and Osteoclast Coupling in Bone Disease and Failure. **Journal of bone research.** 7(201), 1-14, 2019. doi:10.35248/2572-4916.19.7.201;

Wiggins K., Eastmond B., and Alto B. W. Transmission potential of Mayaro virus in Florida *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Med. Vet. Entomol.** 32: 436–442, 2018;

Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clin Chim Acta* 2010;411:1570-9;

Zhang R, Fang H, Chen Y, et al. Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray. **PLoS One.** 2012;7(2): e32356. doi: 10.1371/journal.pone.0032356

Zhang R, Kim AS, Fox JM, et al. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. **Nature.** 2018 May; 557(7706):570-574. doi: 10.1038/s41586-018-0121-3.

Zhang, *et al.*, Gene Expression Analyses of Subchondral Bone in Early Experimental Osteoarthritis by Microarray. **PLoS ONE.** 7, e32356 (2012);

Zhang, H., Ma, SB., Gao, YJ. et al. Spinal CCL2 Promotes Pain Sensitization by Rapid Enhancement of NMDA-Induced Currents Through the ERK-GluN2B Pathway in Mouse Lamina II Neurons. **Neurosci. Bull.** 36, 1344–1354 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12264-020-00557-9>

Zuchi N., Heinen L.B. da S., dos Santos M.A.M. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 109:820-823, 2014;

9. Produção científica e outras atividades

Submetidos

1. **Santos, F.M.**, Sousa, C.D.F., Moreira, T.P. et al Essential role of CCL2-CCR2 axis in Mayaro virus-induced bone pathology. *Journal of virology*. **ANEXO 2**.
2. Moreira TP, Sousa CDF, Melo Costa VR, Queiroz-Junior CM, **Santos FM**, Bonilha CS, Éspér LM, Nogueira ML, Cunha TM, Teixeira MM, Costa VV, de Souza DDG. Tumour necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Immunology*. 2023 Mar;168(3):444-458. doi: 10.1111/imm.13583. Epub 2022 Nov 14. PMID: 36164989. **ANEXO 3**.

Artigos publicados:

1. Silva Avfg, Menezes D, Moreira Frr, Torres Oa, Fonseca Plc, Moreira Rg, Alves Hj, Alves Vr, Amaral Tmdr, Coelho An, Saraiva Duarte Jm, Da Rocha Av, De Almeida Lgp, De Araújo Jlf, De Oliveira Hs, De Oliveira Njc, Zolini C, De Sousa Jh, De Souza Eg, De Souza Rm, Ferreira Ldl, Lehmkuhl Gerber A, Guimarães Apdc, Maia Phs, Marim Fm, Miguita L, Monteiro Cc, Neto Ts, Pugêdo Fsf, Queiroz Dc, Queiroz Dnac, Resende-Moreira Lc, **Santos Fm**, Souza Efc, Voloch Cm, Vasconcelos At, De Aguiar Rs And Souza Rp. Seroprevalence, Prevalence, And Genomic Surveillance: Monitoring The Initial Phases Of The Sars-Cov-2 Pandemic In Betim, Brazil. *Front. Microbiol.* 13:799713, 2022. **ANEXO 4**.
2. Mota, Mânlio Tasso De Oliveira ; Costa, Vivian Vasconcelos ; Sugimoto, Michelle Amantéa; Guimarães, Georgia De Freitas ; Queiroz-Junior, Celso Martins ; Moreira, Thaiané Pinto ; De Sousa, Carla Daiane ; **Santos, Franciele Martins** ; Queiroz, Victoria Fulgêncio ; Passos, Ingredy ; Hubner, Josy ; Souza, Danielle Gloria ; Weaver, Scott C. ; Teixeira, Mauro Martins ; Nogueira, Maurício Lacerda . In-Depth Characterization Of A Novel Live-Attenuated Mayaro Virus Vaccine Candidate Using An Immunocompetent Mouse Model Of Mayaro Disease. *Scientific Reports*, V. 10, P. 5306, 2020. **ANEXO 5**.
3. Santos, F.M., Dias, R.S., de Souza Fernandes, L. et al. Mayaro Virus Infection: Clinical Features and Global Threat. *Curr Treat Options Infect Dis* 12, 387–397 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40506-020-00240->
4. Rocha, Marcele Neves ; Duarte, Myrian Morato ; Mansur, Simone Brutman ; Silva, Bianca Daoud Mafra E ; Pereira, Thiago Nunes ; Adelino, Talita Émile Ribeiro ; Giovanetti, Marta ;

Alcantara, Luis Carlos Junior ; **Santos, Franciele Martins** ; Costa, Victor Rodrigues De Melo; Teixeira, Mauro Martins ; Iani, Felipe Campos De Melo ; Costa, Vivian Vasconcelos ; Moreira, Luciano Andrade . Pluripotency Of Wolbachia Against Arboviruses: The Case Of Yellow Fever. Gates Open Research, V. 3, P. 161, 2019. **ANEXO 7.**

5.Santos, Franciele Martins; Dias, Roberto Sousa ; De Oliveira, Michelle Dias ; Costa, Isabella Cristina Toledo Alves ; Fernandes, Luciana De Souza ; Pessoa, Carine Ribeiro ; Da Matta, Sérgio Luis Pinto ; Costa, Vivian Vasconcelos ; Souza, Danielle G. ; Da Silva, Cynthia Canêdo ; De Paula, Sérgio Oliveira . Animal Model Of Arthritis And Myositis Induced By The Mayaro Virus. Plos Neglected Tropical Diseases, V. 13, P.E0007375,2019.**ANEXO 8.**

6.Da Silva Duarte, Vinícius ; Dias, Roberto Sousa ; Kropinski, Andrew M. ; Campanaro, Stefano ; Treu, Laura ; Siqueira, Carolina ; Vieira, Marcella Silva ; Da Silva Paes, Isabela ; Santana, Gabriele Rocha ; **Martins, Franciele;** Crispim, Josicelli Souza ; Da Silva Xavier, André ; Ferro, Camila Geovana; Vidigal, Pedro M. P. ; Da Silva, Cynthia Canêdo ; De Paula, Sérgio Oliveira . Genomic Analysis And Immune Response In A Murine Mastitis Model Of Vb_Ecom-Ufv13, A Potential Biocontrol Agent For Use In Dairy Cows. Scientific Reports, V. 8, P. 1-12, 2018. **ANEXO 9.**

Apresentação de trabalho em eventos científicos - Apresentação na forma de pôster

1. Lima, JMS, Sousa, SL, **Santos FM,** Paula, LMP, Crispim, JS. Biologia in foco: um estudo em grupo na busca por novos conhecimentos. II Seminário em educação profissional e Tecnológica: Práticas educativas. Instituto Federal de Minas Gerais, Ouro Branco, MG, 2020.

2. Santo, FM, Moreira, TP, De Souza, CD, Costa, VRM, Costa, VV. Mayaro virus induces bone loss: role CCL2 chemokine and its receptor CCR2. São Paulo School of Advanced Science on Molecular Basis of inflammatory diseases, Riberão Preto, SP, 2019;

3. Santo, FM, Moreira, TP, De Souza, CD, Costa, VRM, Costa, VV. Mayaro virus induces bone loss: role CCL2 chemokine and its receptor CCR2. IV FARMEP-UTMB, São José do Rio Preto, SP, 2019;

3. Lima, SA, Moreira, TP, De Souza, CD, **Santo, FM,** Costa, VRM, Gonçalves, MR, Costa,VV, Teixeira, MM. Activation of platelet- activating factor receptor or the 5-lipoxygenase pathway does not impact the course of disease induced by Chikungunya virus. IV FARMEP- UTMB, São José do Rio Preto, SP, 2019;

4. Lima, SA, Moreira, TP, De Souza, CD, **Santo, FM**, Costa, VRM, Gonçalves, MR, Passos, I, Costa, VV, Teixeira, MM. Annexin-a1 as a novel pro- resolving molecule against Chikungunya virus infection. IV FARMEP-UTMB, São José do Rio Preto, SP, 2019;

5. De Souza, CD, Moreira, TP, **Santo, FM**, Lima, SA, Costa, VRM, Gonçalves, MR Costa, VV, Teixeira, MM, Souza, DG. Role of C-C chimokine receptors type 2 and 5 (CCR2/CCR5) during acute phase of Chikungunya virus infection. IV FARMEP-UTMB, São José do Rio Preto, SP, 2019;

Participação em eventos científicos

1. XXXII Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul. 2021. (Congresso);

2. XXXI Congresso Brasileiro de Virologia & XV Encontro de Virologia do Mercosul. 2020. (Congresso);

3. IV FARMEP-UTMB. Mayaro virus infection induces inflammatory response in osteoclast and osteoblast and triggers bone loss: Role of CCL2 chemokine and its receptor (CCR2), 2019. (Congresso).

4. São Paulo School of Advanced Science on Molecular Basis of inflammatory diseases. Mayaro virus induces bone loss: role CCL2 chemokine and its receptor CCR2. 2019. (Congresso).

5. IV International Symposium on Inflammatory Diseases. 2018. (Simpósio).

Educação e extensão

1. Palestra: **Santos, FM**. “Aplicações de modelos animais na pesquisa”, curso técnico em Biotecnologia, Cólegio Técnico da UFMG - COLTEC, Belo Horizonte, 2021;

3. Palestra: **Santos, FM**, Camargos, V. N. Imunologia e desenvolvimento de vacinas. 2020

4. Palestra: **Santos, FM**. Cultura celular – Conceitos, técnicas e aplicações. Palestra na disciplina “Tecnologia do cultivo de células e tecidos”, curso técnico em Biotecnologia, Colégio técnico Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), Belo Horizonte, 2020.

5. Palestra: **Santos, FM**. “Aplicações de modelos animais na pesquisa”, curso técnico em Biotecnologia, Cólegio Técnico da UFMG - COLTEC, Belo Horizonte, 2019;


6. Palestra: **Santos, FM**. Cultura celular – Conceitos e técnicas. Palestra na disciplina “Tecnologia do cultivo de células e tecidos”, curso técnico em Biotecnologia, Colégio técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), Belo Horizonte, 2019;

7. Palestra: **Santos, FM**. Cultura celular – Titulação viral e cultivo de células primárias. Palestra na disciplina “Tecnologia do cultivo de células e tecidos”, curso técnico em Biotecnologia,

Colégio técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), Belo Horizonte,2019.

10. Anexos

ANEXO 1 - CEUA



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 160/2018
Título do projeto: AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO MAYARO VIRUS EM CAMUNDONGOS
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Vivian Vasconcelos Costa
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 20/08/2018. Validade: 20/08/2018 à 19/08/2023

Belo Horizonte, 20/08/2018.

Atenciosamente,

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

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

ANEXO 2

Manuscript #	JVI00807-22
Current Revision #	0
Submission Date	2022-04-13 14:30:43
Current Stage	Under Review
Title	Essential role of CCL2-CCR2 axis in Mayaro virus-induced bone pathology
Running Title	CCL2-CCR2 axis in Mayaro virus disease pathogenesis
Manuscript Type	Full-Length Text
Special Section	N/A
Journal Section	Pathogenesis and Immunity
Corresponding Author	Dr. Vivian Vasconcelos Costa (Universidade Federal de Minas Gerais)
Contributing Authors	Ms. Franciele Martins Santos , Carla Ferreira Sousa , Mrs. Thaiany Pinto Moreira , Simone Araújo , Victor Costa Melo , Mateus Rodrigues Gonçalves , Breno Rocha Barroni , Anna Manezes Santos , Heloisa Athayde Seabra , Dr. Pedro Augusto Carvalho Costa , Paula Bargi Souza , Marivalda de Magalhães Pereira , Prof. Mauricio Lacerda Nogueira , Dr. Danielle Souza , Pedro Pires Guimarães , Dr. Mauro Teixeira , Dr. Celso Martins Queiroz-Junior , Dr. Vivian Vasconcelos Costa (corr-auth)
Abstract	<p>Mayaro virus (MAYV) is an emerging arbovirus of the Togaviridae family and Alphavirus genus. MAYV infection causes an acute febrile illness, polyarthralgia and myalgia. Understanding the mechanisms involved in the arthritic process caused by alphaviruses is needed to develop specific therapeutic approaches. Herein, we investigated the role of CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of MAYV infection. WT C57BL/6J and CCR2^{-/-} mice were infected with MAYV subcutaneously. MAYV infection induced an acute inflammatory disease in WT mice. The immune response profile was characterized by an increase in the production of inflammatory mediators, such as IL-6, TNF, CCL2 and CCL5. Higher levels of CCL2 at the local and systemic levels, was followed by a significant recruitment of CCR2⁺ macrophages and a cellular response orchestrated by these cells. CCR2^{-/-} mice showed an increase in CXCL-1 levels, followed by a replacement of the macrophage inflammatory infiltrate by neutrophils. In addition, absence of the CCR2 receptor protected mice from bone loss induced by MAYV. Accordingly, silencing the expression of ccl2 chemokine in vivo improved MAYV-induced hypernociception, by reducing systemic CCL2 levels and ccl2, ccl5 and Tnf expression in target tissues. Cell culture data support the mechanism underlying MAYV's bone pathology: MAYV infection promoted a pro-osteoclastogenic microenvironment mediated by IL-6, TNF and CCL2; Migration of osteoclast precursors was dependent on the CCR2/CCL2 axis; MAYV-induced bone resorption was mediated by activation of osteoclasts, without affecting osteoblasts. Overall, these data contribute to the understanding of the pathophysiology of MAYV infection and identification of target-specific therapies against MAYV disease.</p>
Importance	<p>This work demonstrates the role of the CCL2/CCR2 axis in MAYV-induced disease. Infection of WT C57BL/6J and CCR2^{-/-} mice was associated with high levels of CCL2, an important chemoattractant chemokine involved in the recruitment of macrophages, the main precursor of osteoclasts. In the absence of the CCR2 receptor there is a mitigation of macrophage migration to the target organs of infection and protection of these mice against bone loss induced by MAYV infection. Much evidence has shown that host immune response factors contribute enormously to the tissue damage associated to alphavirus infections. Thus, this work opens great perspectives to the understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the pathogenesis of arthritis triggered by MAYV, in addition to the identification of novel therapeutic targets directed to the host inflammatory response unleashed by MAYV.</p>
Editor	Prof. Bryan RG Williams
Suggested Reviewers to Include	Suresh Mahalingam (Griffith University), Iranaiá Assunção-Miranda (Federal University of Rio de Janeiro), Paul Proost (Laboratory of Molecular Immunology, Department of Microbiology and Immunology, Rega Institute for Medical

ANEXO 2**Essential role of CCL2-CCR2 axis in Mayaro virus-induced bone pathology**

Franciele Martins Santos¹, Carla Daiane Ferreira de Sousa², Thaiane Pinto Moreira², Simone de Araújo³, Victor Rodrigues de Costa Melo¹, Matheus Rodrigues Gonçalves¹, Anna Clara Paiva Menezes dos Santos², Heloísa Athayde Seabra Ferreira³, Pedro Augusto Carvalho Costa³, Breno Rocha Barrioni⁴, Paula Bargi-Souza³, Marivalda de Magalhães Pereira⁴, Maurício Lacerda Nogueira⁵, Danielle Souza da Glória², Pedro Pires Goulart Guimarães³, Mauro Martins Teixeira⁶, Celso Martins Queiroz-Junior^{1*}, Vivian Vasconcelos Costa^{1*}.

1 Drug Research and Development Center, Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais State, Brazil;

2 Host Microorganism Interaction Laboratory, Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais State, Brazil;

3 Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais State, Brazil;

4 Department of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais State, Brazil;

5 Virology Research Laboratory, São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil;

6 Drug Research and Development Center, Department of Biochemistry and Immunology, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais State, Brazil.

*Correspondence author: cmqj@yahoo.com.br and vivianvcosta@gmail.com

Author Contributions

Franciele Martins Santos: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft

Carla Daiane Ferreira de Sousa: Data curation, Investigation and Methodology

Thaiane Pinto Moreira: Data curation, Investigation and Methodology

Simone de Araújo: Data curation, Investigation and Methodology

Victor Rodrigues de Costa Melo: Investigation and Methodology

Matheus Rodrigues Gonçalves: Investigation and Methodology

Breno Rocha Barrioni: Methodology

Anna Clara Paiva Menezes dos Santos: Methodology

Heloísa A Seabra: Data curation, Investigation, Methodology, review and editing

Pedro A C Costa: Data curation, Investigation and Methodology, review and editing

Paula Bargi-Souza: RT-qPCR standardization, Data curation, analysis of the results, Writing - review and editing

Pedro P G Guimarães: Investigation, Resources and Writing review and editing

Maurício Lacerda Nogueira: Resources

Danielle Souza da Glória: Resources

Mauro Martins Teixeira: Funding acquisition and Resources

Celso Martins Queiroz Junior: Data curation, Investigation, Supervision, Visualization, Writing - review and editing

Vivian Vasconcelos Costa: Funding acquisition, Investigation, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing review and editing

Competing Interest Statement: No competing interests exist.

Classification:

Keywords: Mayaro virus; alphavirus; CCR2 receptor; CCL2 chemokine; bone loss; osteoclastogenesis.

Abstract

Mayaro virus (MAYV) is an emerging arbovirus member of the *Togaviridae* family and *Alphavirus* genus. MAYV infection causes an acute febrile illness accompanied by persistent polyarthralgia and myalgia. Understanding the mechanisms involved in the arthritic process caused by alphaviruses is urgently needed to develop specific and effective therapeutic approaches. In this work, we investigated the role of CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of MAYV infection. To this purpose, WT C57BL/6J and CCR2^{-/-} mice were infected with MAYV subcutaneously and evaluated for disease development. MAYV infection induced an acute inflammatory disease in WT mice. The immune response profile was characterized by an increase in the production of inflammatory mediators, such as IL-6, TNF, CCL2 and CCL5. Higher levels of CCL2 at the local and systemic levels, was followed by a significant recruitment of CCR2⁺ macrophages and a cellular response orchestrated by these cells. CCR2^{-/-} mice showed an increase in CXCL-1 levels, followed by a replacement of the macrophage inflammatory infiltrate by neutrophils. In addition, absence of the CCR2 receptor protected mice from bone loss induced by MAYV. Accordingly, silencing the expression of *ccl2* chemokine *in vivo* improved MAYV-induced hypernociception, by reducing systemic CCL2 levels and *ccl2*, *ccl5* and *Tnf* expression in target tissues. Cell culture data support the mechanism underlying MAYV's bone pathology in which: i) MAYV infection promoted a pro-osteoclastogenic microenvironment mediated by IL-6, TNF and CCL2 mediators; ii) Migration of osteoclast precursors was dependent on the CCR2/CCL2 axis; iii) MAYV-induced bone resorption was mediated by activation of osteoclasts, without affecting osteoblasts. Overall, the current data contributes to the understanding of the pathophysiology of MAYV infection and to the identification of future target-specific therapies against MAYV-induced illness.

Importance

This work demonstrates the role of the CCL2/CCR2 axis in MAYV-induced disease. Infection of WT C57BL/6J and CCR2^{-/-} mice was associated with high levels of CCL2, an important chemoattractant chemokine involved in the recruitment of macrophages, the main precursor of osteoclasts. In the absence of the CCR2 receptor there is a mitigation of macrophage migration to the target organs of infection and protection of these mice against bone loss induced by MAYV infection. Much evidence has shown that host immune response factors contribute enormously to the tissue damage associated to alphavirus infections. Thus, this work opens great perspectives to the understanding of the molecular and cellular mechanisms involved in the pathogenesis of arthritis triggered by MAYV, in addition to the identification of novel therapeutic targets directed to the host inflammatory response unleashed by MAYV.

Main Text

Introduction

Mayaro virus (MAYV) is an endemic arthritogenic arbovirus that is widely neglected in South and Central American countries. MAYV belongs to the *Togaviridae* family and the genus *Alphavirus*, which also includes Chikungunya (CHIKV), Ross River (RRV) and Sindbis (SINV) viruses. These viruses are enveloped and have a positive-polarity single-stranded RNA genome (1). MAYV is responsible for sporadic outbreaks of acute febrile illness, particularly in regions around the Amazon basin where it is maintained in wild and rural cycles. *Haemagogus* mosquitoes and nonhuman primates are considered the main vectors and hosts, respectively (2).

Mayaro Fever (MF) is clinically characterized by fever, rash, retro-orbital pain, headache, arthralgia and myalgia. As with CHIKV infection, highly debilitating and persistent arthralgia is a hallmark of MAYV infection, which primarily affects the joints of the wrists, elbows, knees, and small joints of the hands and feet (3–6). Persistent arthralgia occurs in more than 50% of MF cases, which can last from months to years, resulting in large socioeconomic impact (3). Mechanisms associated with MAYV arthralgia pathogenesis are poorly understood. Meanwhile, host inflammatory immune-responses are known to play a key role in the development and progression of this alphavirus-induced disease (7).

Several studies have shown that macrophages and their pro-inflammatory products, such as CCL2, TNF and INF- γ are considered the main critical factors in the development of RRV and CHIKV-induced myositis and arthritis (8–10). Additionally, IL-6 and the chemokines CCL2, CCL8 and CCL7 have been reported to be involved in osteoclastogenesis during alphaviral infections (11, 12). Accordingly, a recently proposed animal model for MAYV has shown that MAYV infection induces significant inflammatory responses mediated by TNF, IL-6, INF- γ and CCL2, similar to other alphaviruses (13). Noteworthy, elevated CCL2 levels have been detected in the synovial fluid of patients infected with RRV and CHIKV (14, 15) as well as in the serum of patients with MF during the acute phase of disease (16).

The CCL2-CCR2 axis is responsible for modulating monocyte/macrophage recruitment in several chronic inflammatory diseases including atherosclerosis, cancer, and arthritis (17). In inflammatory sterile conditions such as rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA), elevated CCL2 levels were detected in blood, synovial fluid and synovial tissue of patients. Furthermore, studies in animal models of osteoarthritis have demonstrated that the CCL2/CCR2

pathway is primarily responsible for the recruitment of monocytes, establishment of pain and associated-tissue damage (18–20). Accordingly, in infectious arthritis models, such as the one induced by CHIKV, CCR2 knockout mice presented more severe arthritis that was associated with an intense neutrophil infiltrate. In contrast, inhibition of CCL2 was associated with a reduction in arthritis, myositis and bone loss in mice infected with CHIKV and RRV (12, 21).

Thus, the aim of the present study was to investigate the role of the CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of bone loss induced by MAYV infection. Our results demonstrated that MAYV induced an acute inflammatory disease, characterized by local edema, hypernociception and myositis in both WT and CCR2^{-/-} mice. Meanwhile, viral loads analysis revealed reduction of viable virus titers in most analyzed organs of CCR2^{-/-} mice. Interestingly, in the absence of CCL2/CCR2 signaling, there was massive protection from bone loss induced by MAYV. *In vitro*, our data support the mechanism underlying MAYV's bone pathology in which infection promotes a pro-osteoclastogenic microenvironment mediated by IL-6, TNF and CCL2 production as well as migration of osteoclast precursors in a CCL2/CCR2 dependent-manner.

Results

Characterization of MAYV-induced disease in C57BL/6J mice

First a characterization of the MAYV-induced disease in young C57BL/6J mice was performed. To that end, 4-week-old mice were infected in the right hind paw with 1×10^6 PFU of MAYV and signs of disease, including hypernociception, viral loads in several organs and tissue damage during the course of infection were evaluated. MAYV induced significant hind paw edema and reduced nociceptive threshold as early as with 1 day post-infection (PI) (FIG. 1A and 1B). Hind paw edema peaked at day 5PI and persisted for up to 15 days PI (FIG. 1A). Meanwhile, nociceptive threshold remained low for up to 28 days upon MAYV inoculation, returning to baseline levels at day 35. These clinical signs were associated with significant inflammatory damage in hind paw tissues (FIG 1C and 1D). Indeed, MAYV induced infiltration of inflammatory cells to the site of the infection, which associated with myositis and loss of tissue architecture specially at the peak of tissue damage at day 7 PI (FIG. 1C, 1D v and vi). At days 14 and 21 PI there was still presence of inflammatory infiltrate, but the onset of tissue recovery was already evident, as indicated by the presence of regenerating muscle fibers (FIG. 1D vii-x). Accordingly, MAYV infected, replicated and spread to different tissues, including the contralateral joint and muscle, persisting significantly in ankle joints, quadriceps, paw, eye

and jaw (FIG 1E and 1F).

MAYV infection induced a marked increase in local (FIG 2A) and systemic (FIG 2E-H) CCL2 levels, which remained high up to 14 days PI in the paw, maxillae, muscle and spleen. CCL5 chemokine was detected in quadriceps and paw tissues (FIG 2B and I). The presence of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF was detected only in the footpad at day 7PI (FIG 2C and D).

CCL2/CCR2 axis plays an important role in the development of MAYV-induced disease

To understand the role of the CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of MAYV, 4-week-old WT and CCR2^{-/-} mice were infected with MAYV to evaluate disease development. Differently from what was observed in the WT animals, CCR2^{-/-} mice presented delayed paw edema, peaking at day 10 PI (FIG. 4A). Hypernociception analysis revealed a reduction in the hypernociception threshold in both WT and CCR2^{-/-} infected mice at day 3 PI (FIG. 4B), with no difference between the groups. However, from the 7th day PI on, CCR2^{-/-} animals recovered and returned to their baseline levels, while WT animals began to recover to baseline levels at day 15 PI. As seen in WT animals, MAYV was also detected in the plasma and various organs and tissues of the CCR2^{-/-} animals, however, viral load titers were significantly lower than in WT in the serum, spleen, liver, right joint, left joint, right muscle, left muscle and paw (FIG. 4C and D). MAYV-induced inflammation in CCR2^{-/-} animals started at 3 days PI, with the peak on the 7th and 14th days post-virus inoculation (FIG. 4L, M and O). Comparing to WT mice (F-

I), the inflammatory process was less intense in CCR2^{-/-} animals (L-N), but on the other hand, it persisted longer in the CCR2^{-/-} animals (FIG. 4G-N). At day 14 post MAYV inoculation, presence of degenerating fibers and myophagocytosis was observed (FIG. 4H and M). Tissue recovery started at 21 days PI with reduction of inflammatory cells and regeneration of injured tissue, whereas in WT animals this tissue recovery started earlier with 14 days PI (FIG. 4I and N).

Our results so far demonstrate that MAYV-infected CCR2^{-/-} mice present reduced clinical and histological signs of inflammation (FIG 4A, B and E-N). Regarding inflammatory mediators in the paw, no significant differences in the expression kinetics of mediators CCL3 (FIG. 4P), CCL5 (FIG. 4Q), and TNF (FIG. 4R) was observed. Meanwhile, CCL2 levels showed a similar profile on days 3 and 7 PI, but remained high at day 14 PI in knockout animals (FIG. 4S). Interestingly, the chemokine CXCL-1, a promoter of the recruitment of neutrophils, was elevated at day 7 PI in knockout mice in comparison to their WT-infected littermates (FIG. 4T).

In a complementary experiment, siRNA-CCL2 complexed of polymeric-lipid nanoparticle (NP-siRNA-CCL2) was used to silencing the *ccl2* chemokine expression to support our findings in CCL2/CCR2 pathway. DLS measurements showed that the mean diameter of NP-siRNA-CCL2 was 121.3 nm (SD 0.55 nm) and PDI 0.15 (SD 0.01) and zeta potential around -0.51 mV (SD 0.18 mV). Finally, silencing *ccl2* chemokine expression in WT animals with SiRNA improved the hypernociception thresholds without inducing any effect in paw edema (SI2). Additionally, treatment WT mice with SiCCL2 resulted in significant reduction of CCL2 levels and *ccl2*, *ccl5* and *Tnf* expression in hindpaw tissue. Meanwhile, no difference in the inflammatory infiltrate and histological damage unleashed by MAYV inoculation was observed (SI1). Finally, cytometry analysis performed to assess emigration of myeloid cells from bone marrow and the spleen infiltrate upon MAYV at 7 days PI revealed no statistical differences between the both infected groups (SI2).

MAYV induces bone loss in a CCR2-dependent manner

The inflammatory response induced by MAYV infection was characterized by a strong osteoclastogenic profile, as demonstrated by increased local expression of IL-6, TNF and CCL-2, and systemic overexpression of CCL2. To assess the impact of MAYV infection on bone tissue, samples were submitted to μ CT analysis at 14 and 21-days PI on tibia and 21 days PI on maxilla. MAYV induced bone loss in the distal tibial metaphysis region and the maxilla of WT mice, suggesting that MAYV is capable of inducing systemic bone loss. In the tibia there was

a reduction of approximately 5% in bone volume (FIG. 3A) and 20% in trabecular thickness (FIG. 4B), accompanied by increase in the porosity (FIG. 3C). In addition, histological analyzes of the proximal tibia also showed a reduction in trabecular bone (SI3) and an increase in the number of TRAP⁺ cells in infected animals (FIG. SI4). In the maxilla, there was significant reduction in total bone volume (FIG. 4D), and an increase in bone porosity (FIG. 4F), however no decrease was in the trabecular thickness (FIG. 4E). Presence of TRAP⁺ cells in the maxilla was significantly higher at 7 d.p.i indicating that differentiation and activity of osteoclasts occur at the beginning of infection (FIG. SI4). Accordingly, there was increased expression of cathepsin K an enzyme produced by osteoclasts, and periostin, a factor associated with osteoblast activity (FIG. S5).

Differently from WT mice, bone homeostasis in CCR2^{-/-} animals was not affected by MAYV infection. There was no significant bone resorptive phenotype in the tibia (FIG. 4 A-C and G) and in the alveolar bone from maxilla (FIG. 4 D-F and G) of CCR2^{-/-} mice, indicating that the CCR2 receptor contributes to the maintenance of bone quality during MAYV infection. **Absence of CCR2 is associated with a swift of mononuclear infiltrate to polymorphonuclear cells resulting in better disease outcome upon MAYV infection.**

To determine the pattern of the cellular immune response against MAYV infection, WT and CCR2^{-/-} immune cells were isolated from the hind paw and the cellular profile evaluated by flow cytometry. To create boolean gate, it was excluded debris through the combinations of fluorochromes, remotion of doublets a forward scatter area (FSC-A) versus forward scatter height (FSC-H) gate was used, and then cells were gated in function of time versus FSC-A to avoid a possible interference of flux interruptions. MAYV infection promoted an increase of myeloid cells in both infected-groups (FIG 5A and B). At day 1 PI, WT mice showed a reduction in the populations of dendritic cells (CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺) and resident macrophages (Ly6C^{low}F4/80⁺CD11b⁺) (FIG. 5 C and D). WT mice showed a response mainly characterized by monocytes/macrophages, which are suggested to be the main cell population involved in alphaviral pathogenesis (13). An increase in the number of inflammatory monocytes (Ly6C^{high}F4/80⁺CD11b⁺) was observed 7 days after inoculation of MAYV (FIG. 5E) and approximately 30% of these cells were CCR2⁺ monocytes (SI4). Finally, a 2-fold increase in the population of residents macrophages (Ly6C^{low}F4/80⁺CD11b⁺) and dendritic cells was observed at day 7 PI (FIG. 6C and D), suggesting that the infiltrating population of Ly6C^{high} CCR2⁺ monocytes is differentiating into Ly6C^{low}CCR2⁺ macrophages and in a distinct subset of dendritic cells, MoDC (monocyte-derived dendritic cells) (CCR2⁺Ly6C^{high} MHCII⁺CD11c⁺CD11b⁺). Interestingly, no significant increase in neutrophils was observed in WT animals after inoculation of MAYV (FIG. 5F). Finally, activation state of these myeloid cell populations was confirmed by an increase in the expression of the cell surface molecule CD80, on monocytes and dendritic cells (FIG. 5G-I).

On the other hand, cellular responses of CCR2^{-/-} mice were characterized by a reduced population of infiltrating inflammatory monocytes/macrophages, which was replaced by a significant increase in neutrophils, observed on days 1 and 7 after MAYV inoculation (FIG. 5E and F). Furthermore, activation status of these neutrophil population was confirmed by an increase in CD80 expression at day 7 PI (FIG. 5I). Finally, both infected-groups revealed an increased percentage of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes at 7 days PI (SI6), while CCR2^{-/-} mice

showed a higher percentage of CD4⁺ T cells in comparison to WT littermates. Accordingly, activation marker analysis showed an increased expression of CD69 and CD44 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells in both infected-groups, while CCR2^{-/-} mice showed higher expression of these molecules than WT mice (SI7). Interestingly, an increase in T cells expressing CD44⁺/CD62L⁺, a marker for memory cells, was observed exclusively in WT (SI7) mice. Indeed, T lymphocytes from WT mice expressing increased levels of CCR2 receptor were observed (SI6).

Overall, these data show that during MAYV infection CCR2 receptor drives the influx and activation of monocytes to the site of infection, which negatively impacts the course and severity of the disease. Meanwhile, in the absence of the CCR2 receptor, a differential cellular

pattern of cell infiltration characterized by the presence of neutrophils occur and it is associated with an improvement in disease outcome observed in $CCR2^{-/-}$ mice.

Response of macrophages, osteoclasts and osteoblasts against MAYV

Bone homeostasis is the result of a balance between osteocyte signaling, osteoblastic bone formation, and osteoclastic bone resorption (35). To understand the mechanism by which MAYV causes bone loss, we investigated the susceptibility and response of macrophages, osteoclasts and osteoblasts after MAYV infection. Infection of primary culture WT and $CCR2^{-/-}$ macrophages (FIG 6A) with MAYV at MOI of 1 showed that although there was no productive infection or loss of viability (SI8), MAYV was able to modulate the production of cytokines by these cells. Macrophage response to infection resulted in IL-6 production only by WT cells at 72h PI, while TNF was significantly detected in $CCR2^{-/-}$ cells (FIG 6B and C). Similarly, MAYV was unable to promote a productive infection in primary osteoclasts (RANKL-differentiated) and did not affect the viability of these cells after infection (FIG 6D and SI8). However, results reveal that MAYV infection induced the production of TNF and IL-6, two important pro osteoclastogenic mediators, in both WT and $CCR2^{-/-}$ osteoclast cultures. WT osteoclasts produced IL-6 and TNF cytokines from 48h PI on and $CCR2^{-/-}$ osteoclasts produced IL-6 and TNF from 72h PI on (FIG 6E and F). Such IL-6 and TNF production was significantly lower in $CCR2^{-/-}$ osteoclasts when compared to WT cells. To investigate the osteoblast response to infection, bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated and followed differentiation protocol for 14 days. BMSCs isolated from WT mice, BMSCs from $CCR2^{-/-}$ animals were isolated to compare the response of these cells *in vitro*. After 14 days of differentiation, osteoblasts from WT mice were subjected to pharmacological blockade of the CCR2 receptor, the antagonist RS504393, 1 h before MAYV infection. Results showed that there was no productive MAYV infection in the cells WT and $CCR2^{-/-}$, but a replication peak was observed at 24h in cells in which CCR2 was blocked (FIG. 6 G). Furthermore, absent loss of viability or reduced alkaline phosphatase activity was observed (SI8). Interestingly, IL-6 was produced exclusively by osteoblasts WT in response to MAYV infection (FIG. 6 H e I), which suggests that the cytokine IL-6 plays, along with TNF, an important role in the mechanism of bone loss induced by MAYV. Furthermore, these data demonstrate that CCR2 plays an essential role on osteoblasts responses upon MAYV infection.

Discussion

MAYV is an emerging alphavirus in the American continent, that has great potential for urbanization and has recently become an important public health problem in Brazil (22).

MAYV, like RRV and CHIKV, is responsible for causing a highly debilitating musculoskeletal inflammatory disease, which includes polyarthralgia/polyarthritis and myalgia. The disease induced by arthritogenic alphaviruses is classified as an immunopathology (7, 23). Immunopathology is being increasingly recognized in many human viral diseases, such as dengue, zika, influenza and more recently in COVID19 (24–26). Therefore, the investigation of the immune response mechanisms that influence the pathogenesis of MAYV infection would allow to design better treatment strategies to limit inflammation and tissue damage driven by inflammation (7). The major findings of the present study can be summarized as follows: i. Infection of C57BL/6J mice induced an acute inflammatory disease, characterized by local edema, hypernociception, myositis, replication in target organs, production of several inflammatory mediators and bone resorption; ii) Absence of CCR2 receptor has a protective effect on MAYV infection, showed by signs of milder disease manifestation, reduced viral loads in several organs, less tissue damage and absence of bone loss; iii) The inflammatory profile of cell infiltrate of WT mice is predominantly composed by macrophages, whereas in CCR2^{-/-} animals it has been replaced by neutrophils; iv) MAYV has the potential to modulate the intrinsic ability of osteoblasts, osteoclasts and macrophages to produce pro-inflammatory cytokines related with bone loss pathology (FIG 7).

Molecular and cellular mechanisms associated to MAYV pathogenesis are poorly understood. From animal models and studies with patients, MAYV, CHIKV and RRV have been shown to induce a strong local pro-inflammatory response, characterized by the predominance of macrophages and the pro-inflammatory mediators such as IL-6, TNF, INF- γ and CCL2 (8, 13, 16, 27, 28). The CCL2-CCR2 axis has been proposed to be the main route responsible for the recruitment of monocytes and macrophages during alphaviral infections. Thus, studies on the role of monocytes/macrophages and CCL2-CCR2 axis in the infection by different arthritogenic alphaviruses would allow us to understand the interaction of alphaviruses with these factors, and thus elucidate the mechanisms associated with the development of a more severe disease (7).

Our results show that infection of 4-week-old WT mice was characterized by MAYV replication and dissemination to various tissues, as well as induction of clinical disease signs, such as plantar edema and persistent articular hypernociception. These signs were accompanied by extensive inflammation of muscle tissue. These results are similar to those found in other animal models proposed for MAYV and other alphaviruses (13, 27, 29–31). Inflammatory response was characterized by local production of the chemokines CCL2 and CCL5, and the

cytokines IL-6 and TNF. Interestingly, we observed high levels of CCL2 systemically, and in other tissues such as the maxillae, muscle and spleen. Elevated levels of CCL5 chemokine have also been detected in the quadriceps muscle. These inflammatory mediators have been reported in other animal models for MAYV, as well as for CHIKV and RRV (8, 13, 27, 30, 32). Accordingly, patients with persistent arthralgia during MAYV infection, showed elevated levels of various inflammatory mediators, including the cytokine IL-6, which remained elevated for more than 12 months post-infection. The acute phase of the disease in these patients was marked by a high expression of CCL2, and remained elevated for months after infection (16). These mediators, which have been constantly reported in the serum of patients infected with different arthritogenic alphaviruses, indicate a common signature of the inflammatory response during infection with these viruses (6, 14, 16). Nevertheless, the role of each of these mediators in the pathogenesis of alphaviral diseases is not well established. CCL2 chemokine is important for the recruitment of monocytes/macrophages to the infection site, which are important cells in the development of myositis and arthritis (9, 10, 29). The cytokines IL-6 and TNF have been described as having an important role in tissue damage (30). In addition, CCL2 and the cytokine IL-6 have been associated with bone pathologies induced by CHIKV and RRV (11, 12, 33).

In inflammatory rheumatic diseases, inflammation is considered the main mechanism responsible for bone loss, and these cytokines have already been described as having a central role in bone loss in RA and in infection with other alphaviruses (11, 12, 34). The occurrence of bone erosion, similar to that of rheumatoid arthritis (RA), has been reported in the joint of patients infected with CHIKV. Some studies in animal models for CHIKV and RRV, as well as in osteoblast cell culture, demonstrated that the inflammation induced in the bone microenvironment triggers osteoclast-mediated bone resorption (11, 12, 33). Chen et al. (11) showed that RRV infects osteoblasts and induces IL-6 production, which in turn lead to increased expression of CCL2, to changes in the RANKL: OPG ratio, and consequently bone loss. Blockade of IL-6 and CCL2 in animal models for RRV and CHIKV, was accompanied by a significant improvement in bone loss (9–12). In this work, we demonstrated that MAYV also has the potential to induce local and systemic bone loss. Thus, as observed for RRV and CHIKV, CCL2 is a key mediator in MAYV osteoclastogenesis, given its significant increase in a systemic way in infected animals. Analysis of the expression of bone metabolism genes in the maxilla, revealed that MAYV infection induces osteoclast-mediated bone loss. This was evidenced by significant increase in the expression of cathepsin K, an enzyme produced by osteoclast, that catabolizes extracellular matrix molecules and forms the resorption lacune (35).

Periostin is a gene expressed mainly by osteoblasts and has been described as having an important role in tissue repair. Similar to what we observed for MAYV, increased levels of periostin expression have been described in an animal model for osteoarthritis (OA) (36). Chijimatsu et al. (37) reported that periostin was upregulated in the cartilage of patients with OA, and that it may amplify inflammatory events and accelerate OA pathology. The absence of an increase in RANKL expression may indicate that MAYV-induced osteoclastogenesis occurs by a mechanism independent on RANKL, in which inflammatory cytokines such as IL-6 or TNF can directly induce the formation of osteoclasts (38, 39).

Arthritic disease is generally characterized by high levels of CCL2 and monocyte / macrophage infiltrates, and is also well described for alphaviral arthropathies. Given the important role of this CCL2/CCR2 pathway in the pathology of many diseases, many therapeutic agents targeting the chemokine CCL2 and the CCR2 receptor have been developed (21). Treatment of mice infected with RRV or CHIKV with bindarit, a drug that inhibits the production of CCL2, resulted in the improvement of rheumatic disease induced by these viruses (9, 10, 12). However, the absence of CCR2 has been controversial in different rheumatic diseases (20, 40). Infection of CCR2^{-/-} mice with CHIKV showed a more severe, prolonged and erosive disease that was dominated by neutrophils, with viral replication and persistence not being significantly affected (21). Interestingly, we demonstrated that CCR2^{-/-} mice infected by MAYV had a milder disease manifestation, with reduced viral loads in some tissues, fast recovery of articular hypernociception and absence of bone loss, when compared to WT littermates. Paw edema and the peak of the inflammatory process in CCR2^{-/-} mice was delayed in relation to the WT animals. This delay can be explained by the scarcity of M2 macrophages (CCR2⁺ monocyte derivative) at the infection site, which are important cells for the resolution of inflammation and tissue regeneration. Poo et al. (21) demonstrated in their model of CCR2^{-/-} mice for CHIKV a lower upregulation of M2 macrophage markers. Interestingly, as described for CHIKV, we observed a significant increase in CXCL-1 levels, accompanied by the replacement of an infiltrate of macrophages by neutrophils in the paw of CCR2^{-/-} mice. The intense migration of CCR2⁺ monocytes to the infection sites in WT animals suggests that these cells play a central role in MAYV-mediated bone loss in these animals. Accordingly, this data is strongly confirmed by the protection against bone loss observed in knockout animals, where there is an

intense reduction in the influx of CCR2⁺ monocytes. Furthermore, the decrease in the percentage of resident macrophages in both groups suggests that MAYV may be replicating in these cells, already described as an important target of replication and persistence in the target tissue for alphaviruses. This population in WT animals rapidly recovered within 7 days PI, as the infiltrating inflammatory monocytes transform into macrophages in the tissue. The presence of TCD4⁺ and TCD8⁺ lymphocytes was similar in both animals.

Silencing data showed that reduction in CCL2 levels was associated with a partial improvement of clinical parameters, reinforcing the role of this pathway in the pathogenesis of MAYV. Furthermore, CCL2 silencing was also accompanied by a reduction in CCL5, CCL7 and TNF expression levels. This indicates that in the inflammatory microenvironment of MAYV infection, CCL2 secretion upregulates TNF expression, and TNF in turn stimulates the expression of CCL2 and CCL5 (41). This can result in a positive feedback loop between CCL2 and TNF. Nanki et al (42) demonstrated that TNF regulated the production of CCL2 and CCL5 in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with RA (17, 42, 43). In addition, our data also showed that CCL2 silencing modulates the expression of CCL7, an important chemokine that regulates monocytoysis via CCR2 and that is often co-induced with CCL2 (41, 44). However, treatment was not enough to improve tissue damage induced by MAYV and to reduce the inflammatory infiltrate, suggesting that probably other chemokines can induce the migration/accumulation of cells in the target tissue in a CCR2-independent manner (45, 46). Drevets et al. (47) demonstrated that IFN- γ is essential for influx of monocytes to the brain during systemic infection with virulent *Listeria monocytogenes* and was largely independent of a specific chemokine:receptor axis. Furthermore, the infection promoted an increase in the production of several chemokines involved in the recruitment of myeloid cells and this explains the normal influxes of Ly6C^{high} monocytes in the brain in mice deficient for CCL2, CCR1, CCR5, CXCR3 or CX3CR1 (47). This shows the importance of investigating CCR2-independent myeloid cell migration pathways in the pathogenesis of MAYV and other arthritogenic alphaviruses. Interestingly, these data also show that hypernociception induced by MAYV infection is associated with the production of CCL2 and inflammatory cytokines such as TNF (48, 49). In accordance, Kwiatkowski and colleagues (49) showed that the CCL2 chemokine plays a crucial role in the development of neuropathic pain in mice (49). This reveals that CCL2 is a promising therapeutic target for the clinical treatment of MAYV-induced pain. It has recently been shown that MAYV is capable of replicating in human osteoblasts (HOB), as well as in human chondrocytes (HC) and fibroblast-like synoviocytes (HFLS) (50). Many

studies have also shown that CHIKV and RRV also replicate in cells that are important for arthritis induced by these viruses (11, 33, 50). In primary culture of WT and CCR2^{-/-} osteoclasts we observed that MAYV in MOI of 1 was not able to establish a productive infection in these cells, but induced a high production of IL-6 and TNF mainly in WT cells. TNF and IL-6 are considered the most potent osteoclastogenic cytokines and play a central role in the pathogenesis of RA (51). These cytokines can stimulate osteoclastogenesis in two ways, by a mechanism independent on RANKL or indirectly by increasing the expression of RANKL and RANK, in osteoblasts and osteoclast precursors, respectively (38, 52). Thus, according to *in vivo* and cell culture data, we suggest that the bone loss observed in WT animals may be caused by the direct action of TNF or IL-6, which is capable of inducing osteoclast formation and local osteolysis. Infection of WT and CCR2^{-/-} macrophages resulted in the production of IL-6 and TNF, respectively. Infection of BMSCs isolated from 14 d.p.d. WT and CCR2^{-/-} animals and WT osteoblasts with pharmacologically blocked CCR2 demonstrated that MAYV infection did not affect osteogenic activity of these cells, unlike what was observed by Roy et al. (53), in that CHIKV reduced ALP activity in 9 d.p.d. infected osteoblasts. IL-6 production was induced by MAYV in WT Osteoblasts. However, in pharmacologically blocked CCR2 or CCR2^{-/-} cells, there was no production of IL-6. Taken together, these data show the importance of IL-6 production by osteoblasts in the bone microenvironment to promote deregulation of homeostasis in bone tissue, as a consequence of MAYV infection.

Overall, our results demonstrate that the absence of CCL2/CCR2 signaling minimized the disease induced by MAYV and mitigated MAYV-driven bone loss. In this way, we were able to demonstrate one of the mechanisms underlying MAYV-induced bone pathology and consequently the role played by CCL2/CCR2 axis as a potent therapeutic target.

Materials and Methods

Cells, virus and titration

Mayaro virus strain is a human isolate from Peru (in 2001) obtained from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses at the University of Texas Medical Branch. MAYV stocks were produced on Vero cells CCL-81 from BCRJ (African green monkey kidney cell line). Briefly, Vero cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-DMEM medium (Cultilab, Brazil) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS; Cultilab, Brazil) and 1% Penicillin/Steptomycin/Glutamine (GIBCO), and kept in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ atmosphere for 4 days. Cell supernatant was collected, centrifuged (2000rpm for 10 min) and then concentrated using a Vivacell 100 centrifugal concentrator (Sartorius). MAYV titration was performed as described in Mota & Costa 2020. Briefly, Vero cells were plated in 24-well plates and infected with 10-fold serial dilutions. Plates were incubated for 72 hours (37°C with 5% CO₂ atmosphere), and then fixed with 10% formaldehyde and stained with 1% violet crystal. Plaques were counted by eye.

Ethical Statement

This study was carried out in strict accordance with the Brazilian Government's ethical and animal experiments regulations (Law 11794/2008). The experimental protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG, Protocol Number 160/2018). All surgeries were performed under ketamine/xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize animal suffering.

Infection of animals

Four-week-old male C57BL/6J mice (wild-type - WT) were obtained from the Biotério Central of the Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Mice deficient for the CCR2 receptor (CCR2^{-/-}) were obtained from the Biotério de Imunofarmacologia of UFMG. WT and CCR2^{-/-} mice were infected on the right footpad with 1x10⁶ PFU of MAYV, with a final volume of 30µl. Mock-infected mice received 30µl of C6/26 cell culture supernatant.

Evaluation of disease parameters

Mice were observed up to 21 days after infection. During this period, every 24 hours, mice were evaluated for signs of disease, such as weight loss, piloerection and paw edema. Paw edema was quantified with the aid of a caliper and measurements were performed on the infected paw, at times points 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 and 21 days after infection.

Hypernociception assessment by a modified electronic pressure-meter test von Frey method

Hypernociception was assessed as described by Costa et al., 2012. Briefly, mice were placed in acrylic boxes with a non-malleable wire floor for 15 minutes for acclimatization. Then, with the aid of a pressure transducer adapted to a standard large (0.5 mm²) polypropylene tip (INSIGHT Instruments, Ribeirao Preto, SP, Brazil), an increasing pressure was exerted to the right hindpaw of MOCK or MAYV infected mice until induce the flexion of the knee joint, followed by paw withdraw. Upon the flexion-elicited withdrawal threshold, the intensity of the pressure was automatically recorded. Two measurements were performed per each animal at each time analyzed and the median was used. Baseline measurements of all groups were initially performed before infection, and the remaining measurements were taken 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days post-infection.

ELISA assay

To assess the profile of cytokines and chemokines during infection, plasma and tissues of interest were collected at different post-infection times and assessed by ELISA using commercially available antibodies and according to the procedures supplied by the manufacturer (R&D Systems, Minneapolis). All samples were stored at -20°C until processing. Tissues were macerated in cytokine buffer, centrifuged at 10,000 rpm for 10min at 4°C. The supernatant was collected and stored until the ELISA was performed. Results are expressed as pg/mL or pg/100 mg of tissue. The detection limit of the ELISA assays was in the range of 4–8 pg/ml.

Micro-CT analysis

After euthanasia, mice right hind paw and maxilla were removed, fixed in 10% formaldehyde and then transferred to 70% alcohol, where they were kept until analysis in the micro-CT. Samples were scanned on a compact desktop micro-CT scanner (SkyScan 1174, Bruker micro-CT, Belgium) operating at 50 kV of source voltage, 800 μ A source current, 14.59 μ m pixel size and a 0.5mm Al filter. Samples were attached to a stage that rotated 180° with images acquired every 0.7°. The acquired shadow projections (16-bit TIFF format) were further reconstructed into 2D slices using the NRecon software interface. 3D analyses were performed on SkyScan CTAn tool, and 3D models were observed SkyScan CTVol interface.

Histopathological analysis

After euthanasia, tissues of interest were removed and fixed in 10% formaldehyde. For analysis of ankle joint, samples were decalcified in 10% EDTA, pH 7.0. Then tissues were embedded in paraffin, and sections of 5 μ m were performed. Analysis of tissue damage and inflammatory infiltrate were performed on stained hematoxylin and eosin (H & E) slides. To assess

osteoclastogenesis, selected slides from the ankle and knee joints were stained for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and counterstained with hematoxylin according to the manufacturer's instructions.

Footpad cell isolation

Footpad and ankle joint from control and MAYV infected mice, were collected at 1 and 7 days post-infection. For isolation of cells from the plantar pad and ankle, tissues were removed and placed in 1 mL of digestion medium containing Collagenase VIII (1 mg / mL; Sigma-Aldrich) in complete DMEM medium. Tissues were kept for 1h in the water bath at 37°C. Then, the digested tissues were deposited in 40µm cell strainer and were added 3 ml complete DMEM medium. Digested tissues were macerated against the cell strainer with a 3mL syringe plunger, making circular movements to release the largest number of cells in the medium. Cells were then centrifuged at 1,200 rpm for 10 minutes at 4°C, and resuspended in 1mL of complete medium. Cell viability was assessed with Trypan Blue.

Phenotyping of leukocytes

Cells from lymph node and paw were plated on a 96-well plate with a U-shaped bottom to perform staining. First, the plate was centrifuged at 2,000 rpm for 10 min at 4°C to remove medium. Cells were resuspended in 20µl of Fc-blocker (BD Biosciences) for 15 minutes. Staining was performed using fluorescently conjugated antibodies anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD69, -CD44, -CD62L, -CCR2, -CD11c, -F4/80, -CD11b, -Ly6G, -Ly6C, -MHCII, -CD80, for 30 min. Then, 200 µl of 1% BSA was added and the cells were centrifuged to remove antibody excess. Cells were resuspended in 200 µl of 1% BSA and the data was acquired using a BD FACS CANTO II and analysis performed using the FlowJo software.

Cell culture

For primary osteoblast, osteoclast and macrophages cultures, bone marrow cells derived from WT and CCR2^{-/-} mice were isolated and kept in culture for growth, in α -MEM medium with 10% SBF at 37°C and 5% CO₂. For osteoblast culture the cells were then plated into 96 or 24-well plates, and differentiation was induced with osteogenic medium (α -MEM medium 10% plus 100µM ascorbic acid and 1.8nM potassium phosphate – KH₂PO₄) for 14 days. To evaluate the effect of blocking CCR2 in osteoblast culture, cells were treated 1h before infection with the antagonist RS504393 (300nM per well). Every two days the medium was replaced with new medium. After differentiation, cells were infected with MAYV and cell supernatant collected at different times points post-infection. Several analyzes were performed, including viral titration, ELISA, cell viability (MTT) and alkaline phosphatase labeling. For macrophages

culture the cells were then plated into 96, and differentiation was induced with 50ng/ml of M-CSF for 3 days. After differentiation, cells were infected with MAYV and cell supernatant collected at different times points post-infection for analysis. For osteoclast culture the cells were then plated into 96, and differentiation was induced with with 50ng/ml of M-CSF and 50ng/ml of RANKL for 5 days.

***In vivo* silencing of the CCL2 chemokine with siRNA**

Nanoparticles carrying siRNA-MCP1 (NP-siRNA-CCL2) were synthesized according to Krohn-Grimberghe et al (2020). For the silencing of the CCL2 chemokine, 4-week-old animals of the C57BL/6J strain were divided into 3 experimental groups: i) sham: received only PBS; ii) MAYV: infected only and iii) MAYV+SiRNA: infected and treated. The animals in the treated group received 1mg/kg intravenously. The treatment strategy included a pre-treatment for 3 days, every 24h, before infection and post-infection treatments on days 2 and 5. After infection, the animals were evaluated for disease parameters, such as edema and hypernociception at defined time points. On day 7 PI, the animals were sacrificed and the tissues of interest were removed for the following analyses, viral load, histology, ELISA, flow cytometry and gene expression

Reverse transcription and Real Time PCR (RT-qPCR) analysis

WT mice were infected and after euthanasia maxillae and ankle joints were removed and stored at -80°C until processing. For total RNA extraction, samples were first mashed in liquid nitrogen and followed by Trizol extraction according to the manufacturer's instructions. The reverse transcription was performed with random primers and following the guidelines of iScript cDNA Synthesis Kit- Bio-Rad. The real time PCR reaction was performed as follows: 2 µl of RT product (50ng concentration), 1 µl of each primer, 5 µl of Syber Green (qPCR Master Mix - Bio-Rad) and 2 µl of water. The conditions for PCR were as follows: 95 C – 2 min, followed by 40 cycles of 95 C – 15 s; 60 C – 1 min, and 72 C – 20 s. The efficiency/slope obtained values of all investigated genes were close to the optimal values required for the 2⁻(Delta Ct) analysis (54). Ct values were recorded for each gene and the results regarding the genes of interest were normalized to the results obtained with the internal control gene, *Gapdh*. The $\Delta\Delta CT$ values were calculated and the results were expressed as fold increase, as described by Livak and Schmittgen (55). The sequences of the primers used in the reactions are in Table 1 (SI9).

Statistical analysis

All analyzes were performed using the GraphPad PRISM software 6.0 (GraphPad Software, USA). Results with a $p < 0.05$ were considered significant. Differences were compared using

analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test or Unpaired t test.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ilma Marçal, Tania Colina, Frankcineia Assis, and Gilvania Santos for the technical support. This work received financial support from the National Institute of Science and Technology in Dengue and Host-microorganism Interaction (INCT dengue), a program funded by The Brazilian National Science Council (CNPq, Brazil) and Minas Gerais Foundation for Science (FAPEMIG, Brazil) and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

References

1. Y. Acosta-Ampudia, *et al.*, Mayaro: an emerging viral threat? *Emerging Microbes & Infections* **7**, 1–11 (2018).
2. M. T. de O. Mota, M. R. Ribeiro, D. Vedovello, M. L. Nogueira, Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. *Future Virology* **10**, 1109–1122 (2015).
3. E. S. Halsey, *et al.*, Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **19** (2013).
4. C. Theilacker, *et al.*, Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. *BMC Infect Dis* **13**, 369 (2013).
5. C. A. D. Slegers, *et al.*, Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: Is there a risk for attendants to the 2014 FIFA World Cup? *Journal of Clinical Virology* **60**, 317–319 (2014).
6. D. Tappe, *et al.*, Sustained Elevated Cytokine Levels during Recovery Phase of Mayaro Virus Infection. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 750–752 (2016).
7. Mostafavi, E. Abeyratne, A. Zaid, A. Taylor, Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as A Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease. *Viruses* **11**, 290 (2019).
8. B. A. Lidbury, *et al.*, Macrophage-Derived Proinflammatory Factors Contribute to the Development of Arthritis and Myositis after Infection with an Arthrogenic Alphavirus. *J INFECT DIS* **197**, 1585–1593 (2008).
9. N. E. Rulli, *et al.*, Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. *Arthritis Rheum* **60**, 2513–2523 (2009).
10. N. E. Rulli, *et al.*, Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis. *The Journal of Infectious Diseases* **204**, 1026–1030 (2011).
11. W. Chen, S.-S. Foo, R. W. Li, P. N. Smith, S. Mahalingam, Osteoblasts from osteoarthritis patients show enhanced susceptibility to Ross River virus infection associated with delayed type I interferon responses. *Virol J* **11**, 189 (2014).
12. W. Chen, *et al.*, Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. *Trends in Microbiology* **23**, 35–43 (2015).

- 13.F. M. Santos, *et al.*, Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLoS Negl Trop Dis* **13**, e0007375 (2019).
- 14.T.-S. Teng, *et al.*, A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. *J Infect Dis*. **211**, 1925–1935 (2015).
- 15.K. C. Haist, K. S. Burrack, B. J. Davenport, T. E. Morrison, Inflammatory monocytes mediate control of acute alphavirus infection in mice. *PLoS Pathog* **13**, e1006748 (2017).
- 16.F. W. Santiago, *et al.*, Long-Term Arthralgia after Mayaro Virus Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0004104 (2015).
- 17.M. Gschwandtner, R. Derler, K. S. Midwood, More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. *Front. Immunol.* **10**, 2759 (2019).
- 18.R. E. Miller, *et al.*, CCR2 chemokine receptor signaling mediates pain in experimental osteoarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 20602–20607 (2012).
- 19.C.-Y. Chen, *et al.*, Enhancement of CCL2 expression and monocyte migration by CCN1 in osteoblasts through inhibiting miR-518a-5p: implication of rheumatoid arthritis therapy. *Sci Rep* **7**, 421 (2017).
- 20.H. Raghu, *et al.*, CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* **76**, 914–922 (2017).
- 21.Y. S. Poo, *et al.*, CCR2 Deficiency Promotes Exacerbated Chronic Erosive Neutrophil-Dominated Chikungunya Virus Arthritis. *J Virol* **88**, 6862–6872 (2014).
22. P. J. Hotez, K. O. Murray, Dengue, West Nile virus, chikungunya, Zika—and now Mayaro? *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005462 (2017).
- 23.I. Assunção-Miranda, C. Cruz-Oliveira, A. T. Da Poian, Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. *BioMed Research International* **2013**, 1–11 (2013).
- 24.D. Damjanovic, C.-L. Small, M. Jeyanthan, S. McCormick, Z. Xing, Immunopathology in influenza virus infection: Uncoupling the friend from foe. *Clinical Immunology* **144**, 57–69 (2012).
- 25.A. Culshaw, J. Mongkolsapaya, G. R. Screaton, The immunopathology of dengue and Zika virus infections. *Curr Opin Immunol* **48**, 1–6 (2017).
- 26.J. N. Gustine, D. Jones, Immunopathology of Hyperinflammation in COVID-19. *The American Journal of Pathology* **191**, 4–17 (2021).
- 27.J. Gardner, *et al.*, Chikungunya Virus Arthritis in Adult Wild-Type Mice. *J Virol* **84**, 8021–8032 (2010).

- 28.L. F. P. Ng, Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annu. Rev. Virol.* **4**, 413–427 (2017).
- 29.T. E. Morrison, *et al.*, Characterization of Ross River Virus Tropism and Virus-Induced Inflammation in a Mouse Model of Viral Arthritis and Myositis. *J Virol* **80**, 737–749 (2006).
- 30.C. M. Figueiredo, *et al.*, Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity. *Front. Microbiol.* **10**, 2246 (2019).
- 31.M. T. de O. Mota, *et al.*, In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease. *Sci Rep* **10**, 5306 (2020).
- 32.L. J. Herrero, *et al.*, Critical role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Ross River virus-induced arthritis and myositis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 12048–12053 (2011).
- 33.M. Noret, *et al.*, Interleukin 6, RANKL, and Osteoprotegerin Expression by Chikungunya Virus- Infected Human Osteoblasts. *Journal of Infectious Diseases* **206**, 455–457 (2012).
- 34.F. Coury, O. Peyruchaud, I. Machuca-Gayet, Osteoimmunology of Bone Loss in Inflammatory Rheumatic Diseases. *Front. Immunol.* **10**, 679 (2019).
- 35.R. Visconti, T. Iversen, J. Cottrell, A Review of Dysregulated Osteoblast and Osteoclast Coupling in Bone Disease and Failure. *J Bone Res* **7** (2019).
- 36.R. Zhang, *et al.*, Gene Expression Analyses of Subchondral Bone in Early Experimental Osteoarthritis by Microarray. *PLoS ONE* **7**, e32356 (2012).
- 37.R. Chijimatsu, *et al.*, Expression and pathological effects of periostin in human osteoarthritis cartilage. *BMC Musculoskelet Disord* **16**, 215 (2015).
- 38.O. Kudo, *et al.*, Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone* **32**, 1–7 (2003).
- 39.D. S. Amarasekara, *et al.*, Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. *Immune Netw* **18**, e8 (2018).
- 40.M. P. Quinones, *et al.*, The complex role of the chemokine receptor CCR2 in collagen-induced arthritis: implications for therapeutic targeting of CCR2 in rheumatoid arthritis. *J Mol Med* **83**, 672–681 (2005).
- 41.P. Proost, A. Wuyts, J. van Damme, Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J Leukoc Biol* **59**, 67–74 (1996).
- 42.T. Nanki, K. Nagasaka, K. Hayashida, Y. Saita, N. Miyasaka, Chemokines Regulate IL-6 and IL-8 Production by Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis.

J Immunol **167**, 5381–5385 (2001).

43.E. Neumark, O. Sagi-Assif, B. Shalmon, A. Ben-Baruch, I. P. Witz, Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNF α cross-regulatory pathway and clonal expression of promalignancy and antimalignancy factors. *Int. J. Cancer* **106**, 879–886 (2003).

44.S. V. Bardina, *et al.*, Differential Roles of Chemokines CCL2 and CCL7 in Monocytosis and Leukocyte Migration during West Nile Virus Infection. *J.I.* **195**, 4306–4318(2015).

45 J. J. Haringman, P. P. Tak, Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* **6**, 93 (2004).

45.C. Shi, E. G. Pamer, Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762–774 (2011).

46.D. A. Drevets, M. J. Dillon, J. E. Schawang, J. A. Stoner, P. J. M. Leenen, IFN- γ triggers CCR2- independent monocyte entry into the brain during systemic infection by virulent *Listeria monocytogenes*. *Brain, Behavior, and Immunity* **24**, 919–929 (2010).

47.A. Hess, *et al.*, Blockade of TNF- α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 3731–3736 (2011).

48.K. Kwiatkowski, *et al.*, Bidirectional Action of Cenriciviroc, a CCR2/CCR5 Antagonist, Results in Alleviation of Pain-Related Behaviors and Potentiation of Opioid Analgesia in Rats With Peripheral Neuropathy. *Front. Immunol.* **11**, 615327 (2020).

49.M. Bengue, *et al.*, Mayaro Virus Infects Human Chondrocytes and Induces the Expression of Arthritis-Related Genes Associated with Joint Degradation. *Viruses* **11**, 797 (2019).

50.W. Phuklia, *et al.*, Osteoclastogenesis induced by CHIKV-infected fibroblast-like synoviocytes: A possible interplay between synoviocytes and monocytes/macrophages in CHIKV-induced arthralgia/arthritis. *Virus Research* **177**, 179–188 (2013).

51.M. Ponzetti, N. Rucci, Updates on Osteoimmunology: What's New on the Cross-Talk Between Bone and Immune System. *Front. Endocrinol.* **10**, 236 (2019).

52.E. Roy, W. Shi, B. Duan, S. P. Reid, Chikungunya Virus Infection Impairs the Function of Osteogenic Cells. **5**, 12 (2020).

53.A.-A. Dussault, M. Pouliot, Rapid and simple comparison of messenger rna levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online* **8**, 1–10 (2006).

54.K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

Figure 1

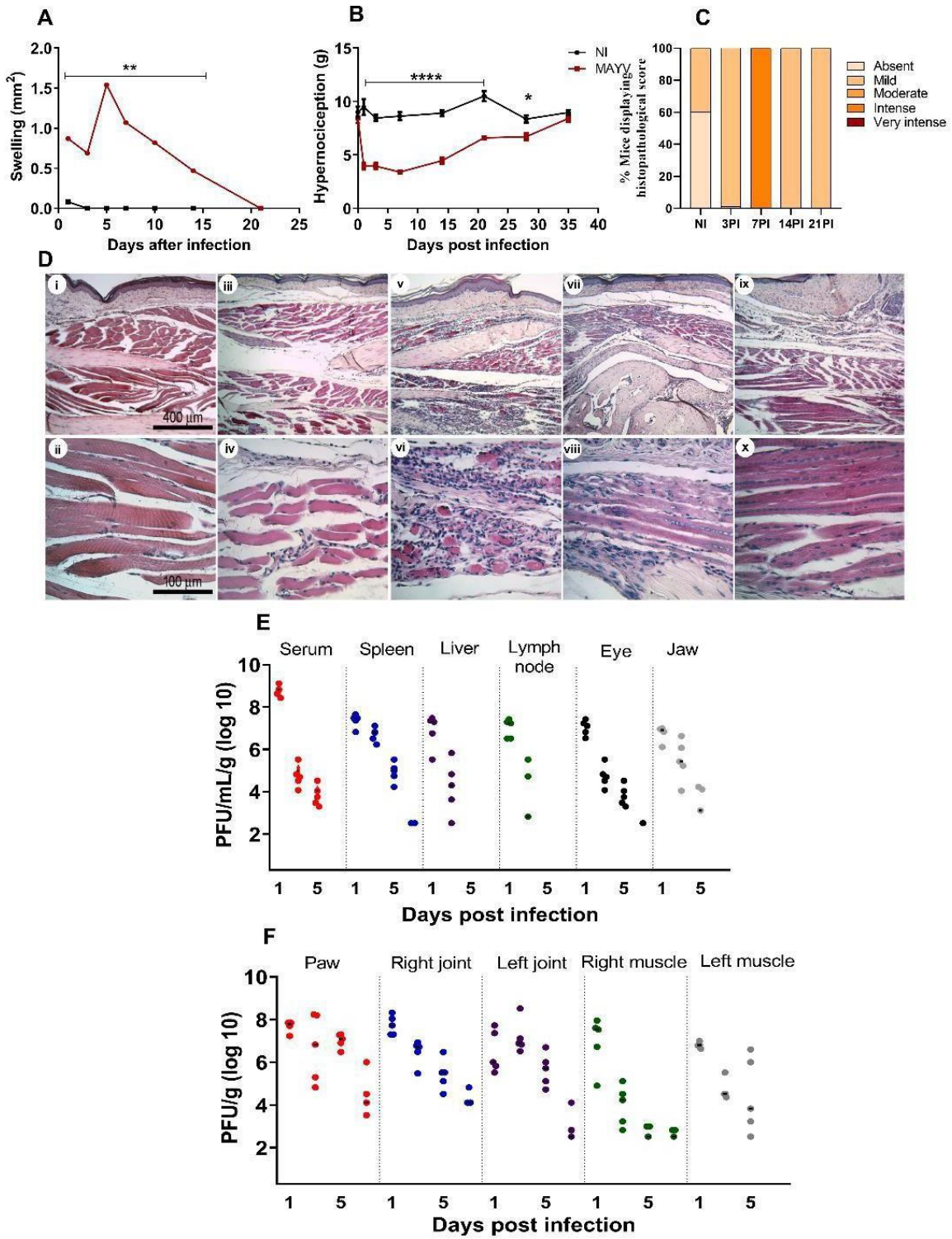


Figure 4. MAYV-induced disease in C57BL/6J mice. 4-week-old mice were infected through the rear right footpad with 30μl containing 10⁶ PFU or were mock infected with C6/36 cells supernatant. (A) Edema measurements was performed in the infected paw

(right paw) with the aid of a caliper. Statistics were performed with Unpaired t test (P value $< 0,05$). (B) Hypernociception threshold assessment was performed using the adapted von Frey method. Statistics were performed with two-way ANOVA, Bonferroni's multiple comparisons test (P value $< 0,05$). (C) Histological score. Absent (0); Mild (1 and 2); Moderate (3 and 4); Intense (5 and 6) and Very intense (7). Statistics were performed with one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons (P value $< 0,05$). At days 3, 7, 14 and 21 p.i. mice were euthanized and ankle tissues removed, paraffin embedded and 5 μm sections were generated and stained with HE. The D panel shows negative control (i and ii); MAYV infection at day 3PI (iii and iv); MAYV infection at day 7PI (v and vi); MAYV infection at day 14PI (vii and viii); MAYV infection at day 21PI (ix and x). (E and F) At days 1, 3, 5 and 7 PI the serum and tissues of interest were harvested, homogenized and the amount of infectious virus was determined by plaque assay on Vero cells Images i, iii, v, vii and ix (100X magnification, 400 μm bar); images ii, iv, vi, viii and x (400X magnification, 100 μm bar). Analyses are representative of at least five mice per group.

Figure 2

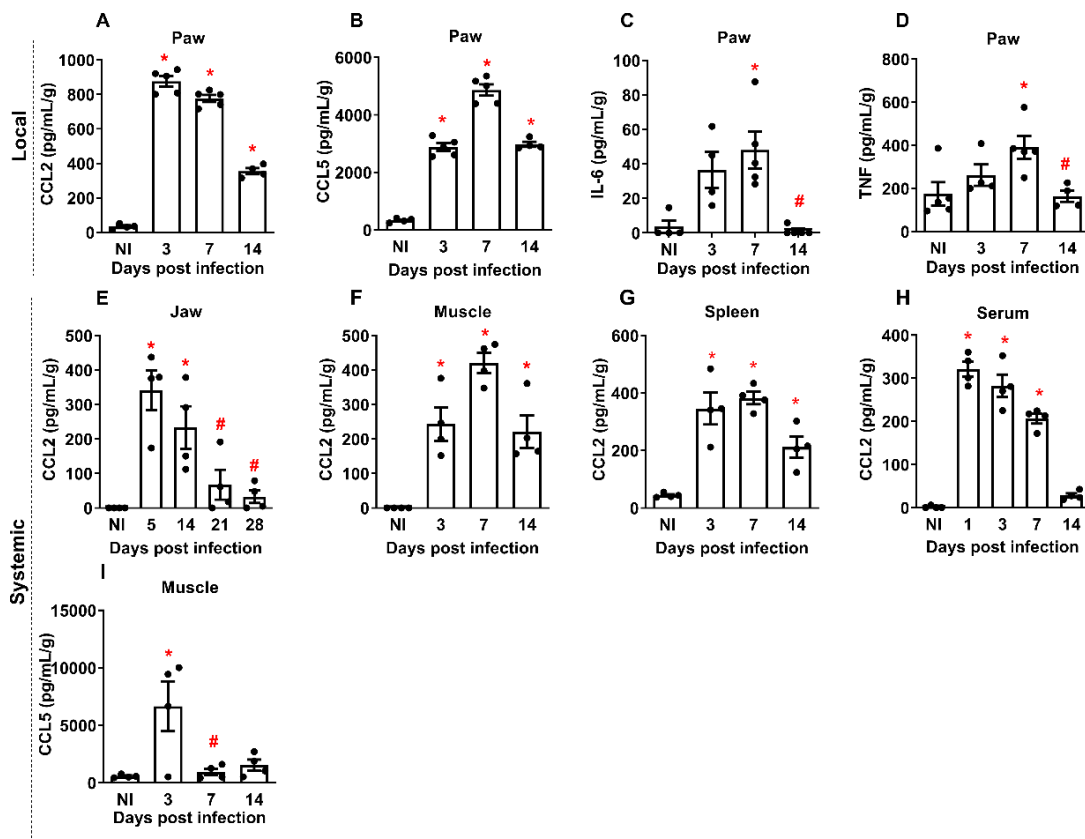


Figure 5. MAYV induces the production of local and systemic inflammatory mediators in C57BL/6J mice. The local cytokine profile was characterized by an initial increase in the levels of chemokines CCL2 (A) and CCL5 (B), followed by the production of inflammatory cytokines IL-6 (C) and TNF (D). Analysis of the profile of systemic inflammatory mediators detected the presence of CCL2 chemokines in different tissues, such as maxillae (E), muscle (F), spleen and serum (H), and CCL5 in muscle (I). Statistics were performed with one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparisons test (P value < 0,05). Analysis are representative of at least four mice per group.

Figure 3

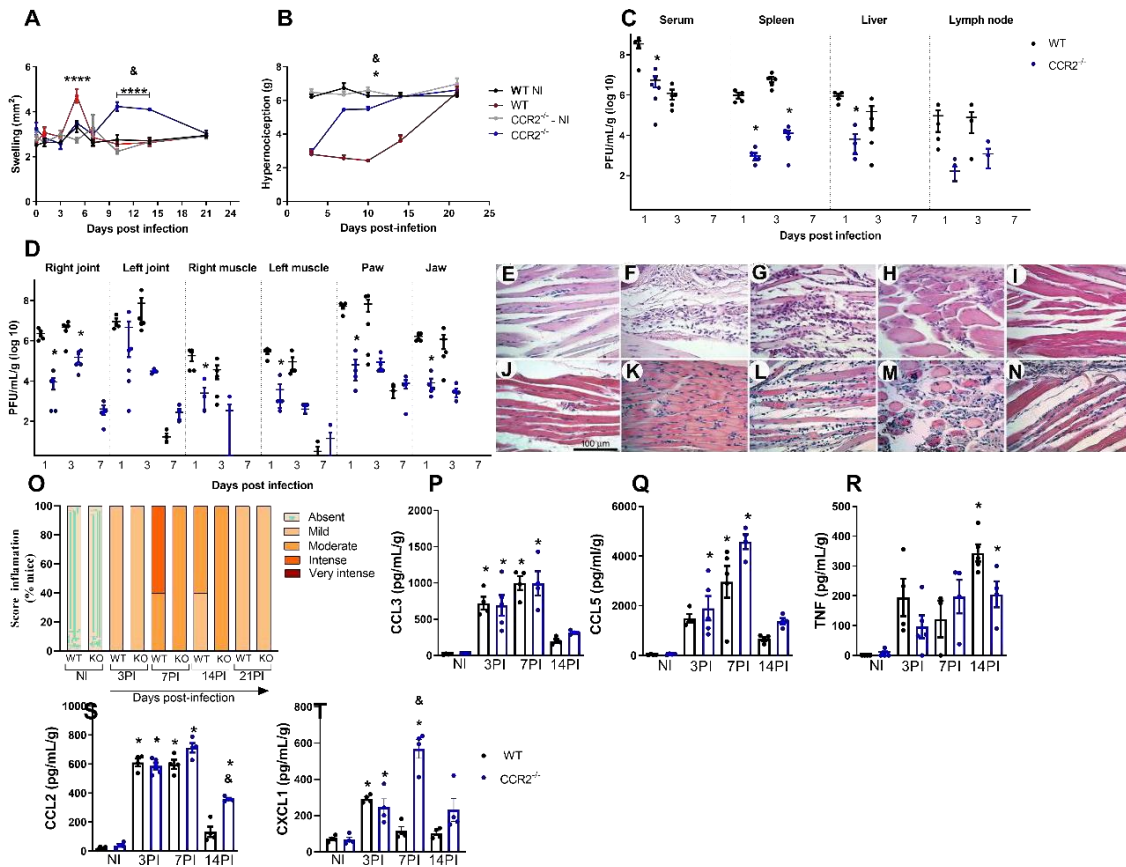


Figure 3. MAYV Infection of $CCR2^{-/-}$ mice. 4-week old mice WT and $CCR2^{-/-}$ (C57BL6 background) were infected via the rear right footpad with 10^6 PFU of MAYV. Mock group was inoculated with C6/36 supernatant. (A) Plantar edema measurement. (B) Measurement of the hypernociception threshold. Statistics were performed with two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value $< 0,05$) (C and D). At 1, 3 and 7 days PI serum and tissues of interest were harvested, homogenized and the amount of infectious virus determined by plaque assay on Vero cells. (E) Histological score. Statistics were performed with one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value $< 0,05$). At 3, 7, 14 and 21 days PI mice were sacrificed and ankle tissues removed, paraffin embedded and 5 μ m sections were generated and stained with HE. (E-I) Panels show WT negative control (E) and MAYV infection at 3 (F), 7 (G), 14 (H) and 21 (I) days PI. Corresponding endpoints are shown for $CCR2^{-/-}$ samples (J-N). The kinetics of inflammatory mediators in the animals' paws were performed on days 3, 7 and 14 PI, with CCL3 (P), CCL5 (Q), TNF (R), CCL2 (S) and CXCL1 (T) being detected. Images E-N (400X magnification, 100 μ m bar). Analysis are representative of at least five mice per group.

Figure 4

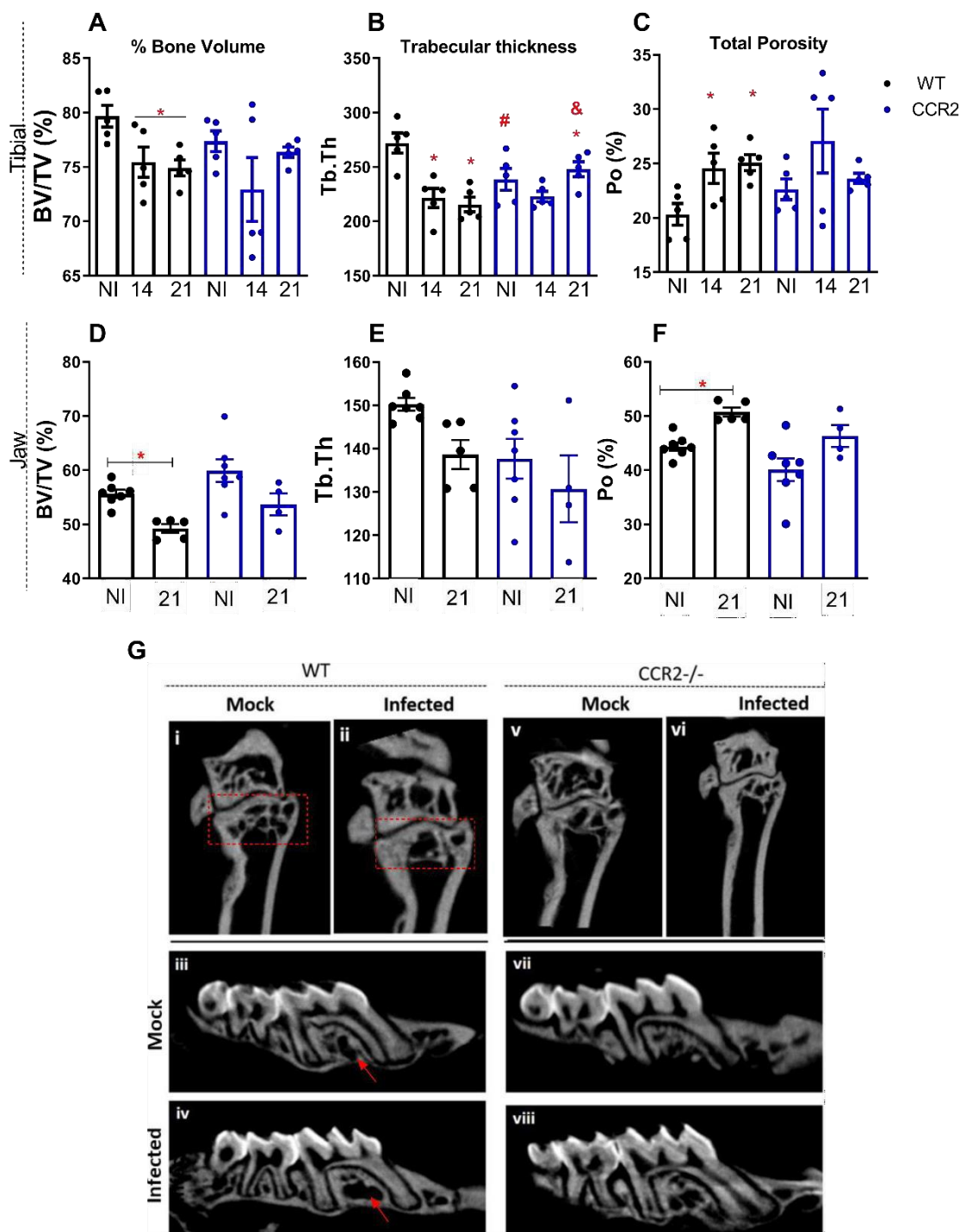


Figure 4. CCR2^{-/-} mice are resistant to bone resorption induced by MAYV. 4-week old mice WT and CCR2^{-/-} (C57BL6 background) were infected via the rear right footpad with 10⁶ PFU od MAYV. Mock group was inoculated with C6/36 cell supernatant. At days 14 and 21 PI animals were sacrificed, and tibia and maxilla removed for microCT analysis. (A) Trabecular bone volume fraction, (B) Trabecular thickness, (C) Porosity in the tibia. Red box: region of analysis. (D) Trabecular bone volume fraction, (E) Trabecular thickness, (F) Porosity in the jaw. (G) 2D reconstruction of the distal tibia and maxillae. Red arrow: bone loss. Statistics were performed with one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value <0,05). Analysis are representative of at least five mice per group.

Figure 5

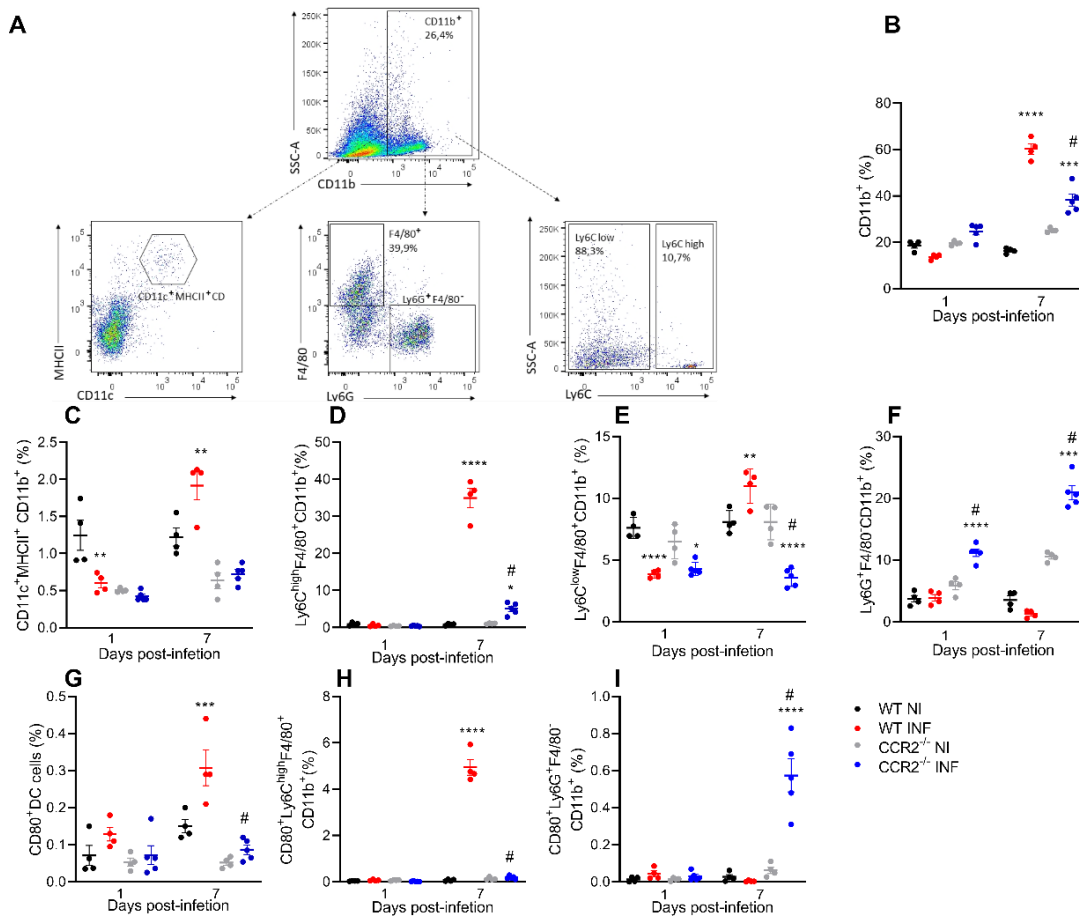


Figure 5. Profile of immune cells in the paw of MAYV-infected WT and CCR2^{-/-} mice. Flow cytometry analysis of immune cells isolated from the hindpaw of animals infected with MAYV at days 1 and 7 PI. (A) Panel shows gating strategy to define the population of myeloid cells from the single cells. (B) Increase of CD11b⁺ cells at 7 days PI in WT and CCR2^{-/-} animals. (C) Percentage of dendritic cells. (D) Percentage of inflammatory monocytes. (E) Percentage of residents macrophages. (F) Percentage of neutrophils. (G) Percentage of dendritic cells expressing CD80. (H) Percentage of inflammatory monocytes expressing CD80. (I) Percentage of neutrophils expressing CD80. Statistics were performed with two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value < 0,05). Analysis are representative of at least four mice per group.

Figure 6.

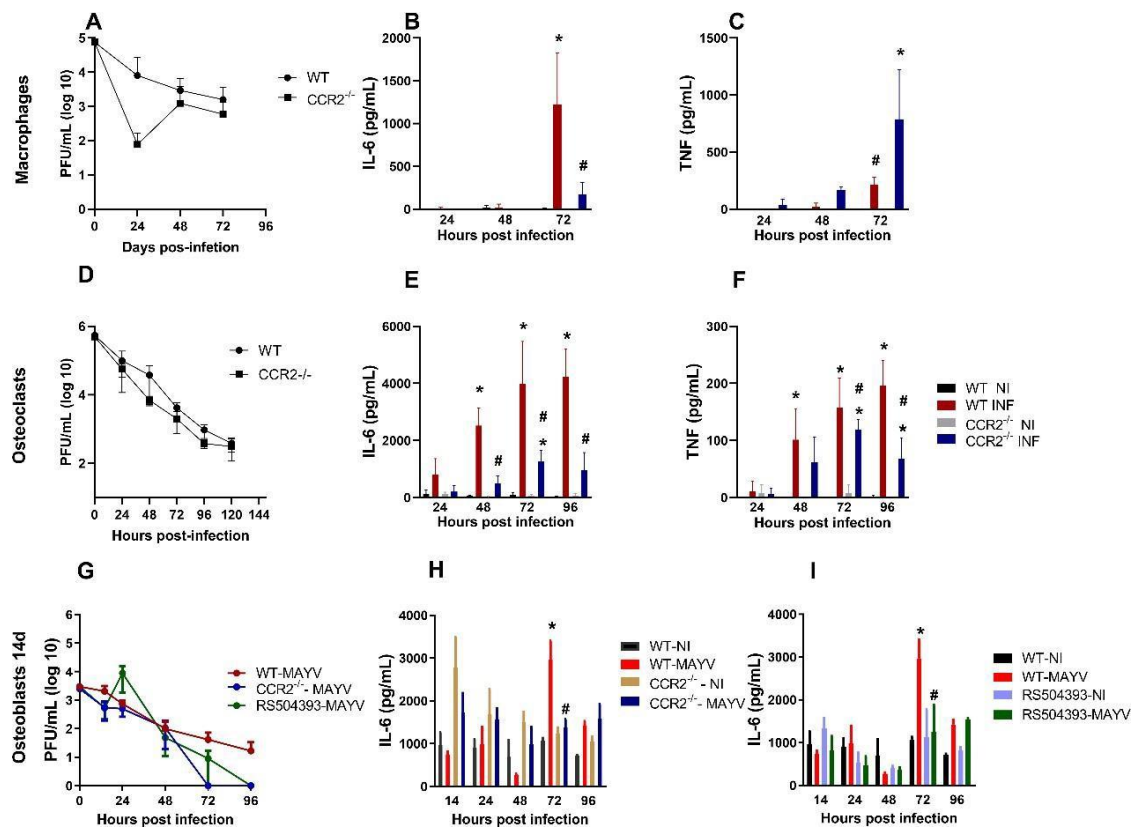


Figure 6. *In vitro* infection of macrophages, osteoclast and osteoblasts by MAYV. MAYV titration in primary macrophages (A). Quantification of IL-6 (B) and TNF (C) levels in the macrophage culture supernatant. MAYV titration in primary osteoclasts (D). Quantification of IL-6 (E) and TNF (F) levels in the osteoclast culture supernatant. MAYV titration in the primary culture of osteoblasts from WT, CCR2^{-/-} and CCR2 block with RS504393, differentiated for 14 days (G). Quantification of IL-6 in the osteoblast culture (H and I). Statistics were performed with two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value <0,05).

Figure 7.

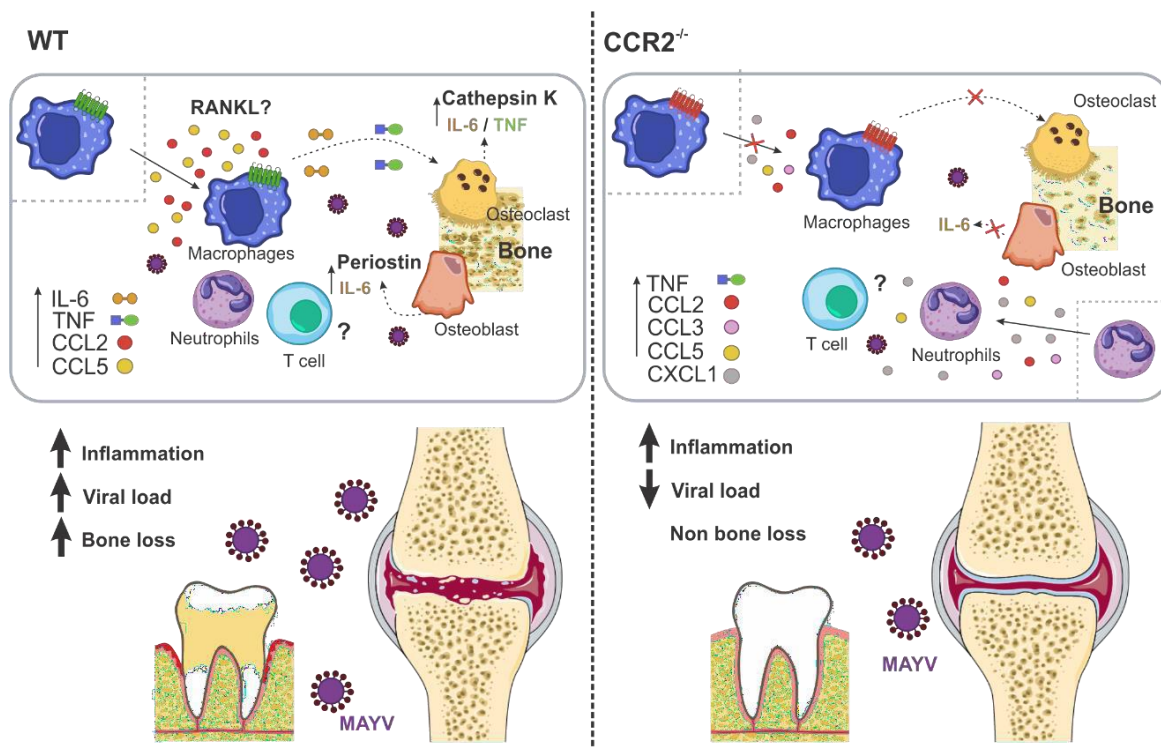


Figure 7. Mechanism involved in osteoclastogenesis induced by MAYV. MAYV infection induces a robust inflammatory response at an infection site in WT and CCR2^{-/-} animals, mediated by different pro-inflammatory cytokines and chemokines. This inflammatory process is responsible for tissue damage and also for bone loss. The absence of bone loss in CCR2^{-/-} animals showed that CCR2/CCL2 signaling is essential for the migration of macrophages to the infection site. The inflammatory microenvironment induced by MAYV in different cells, promoted the differentiation of macrophages in osteoclasts by a mechanism probably independent of RANKL. It is suggested that direct action of the cytokines IL-6 and TNF are able to support the formation of new osteoclasts. The increase in osteoclasts and their activity promotes bone loss. The role of T cells in bone loss from MAYV has not been investigated in this work.

Supplementary information

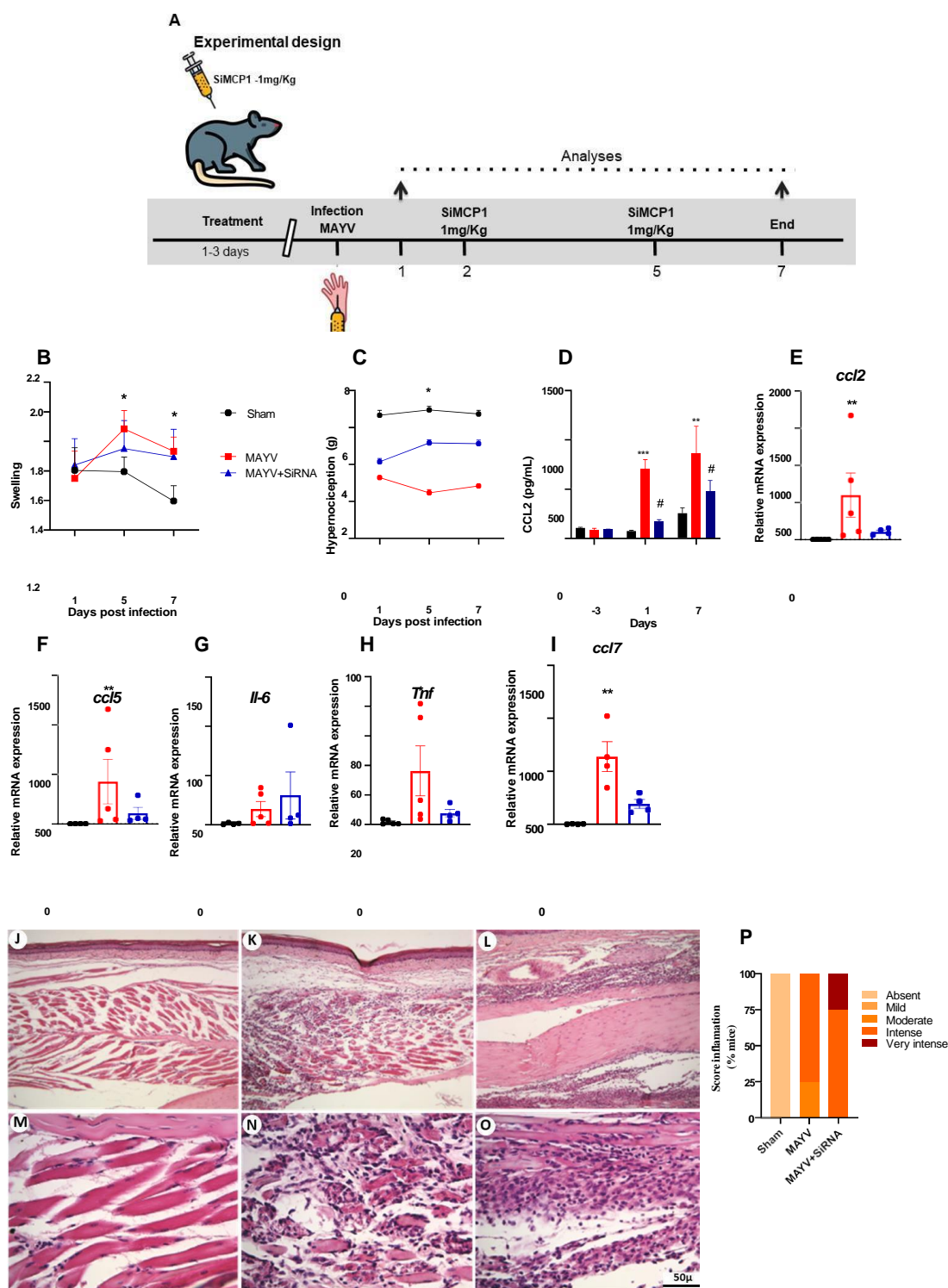


Figure S11. CCL2 chemokine silencing in C57BL6 mice with SiRNA. 4-week old mice were treated for 3 days before infection with SiMCP1 and on days 2 and 5 post-infection. Animals were infected via the rear right footpad with 10^6 PFU or were mock infected with C6/36 cells supernatant. (A) Experimental design. (B) Edema measurements was performed in the infected paw (right paw) with the aid of a caliper on days 2 and 5 post-infection. (C) Hypernociception threshold assessment was performed using the von Frey method. (D) Serum CCL2 levels on days -3 (before to infection) and on days 1 and 7 post-infection. qRT-PCR analysis of the relative expression of the chemokines *ccl2* (E), *ccl5* (F) and cytokines *Il-6* (G), *Tnf* (H) and

cc17 (I) in the paw. At day 7 p.i. mice were sacrificed and ankle tissues were removed, paraffin embedded and 5 μ m sections were generated and stained with HE. The panel shows negative control (J and M), animals infected with MAYV (K and N) animals infected and treated with SiMCP1 (L and O). (P) Histological score.

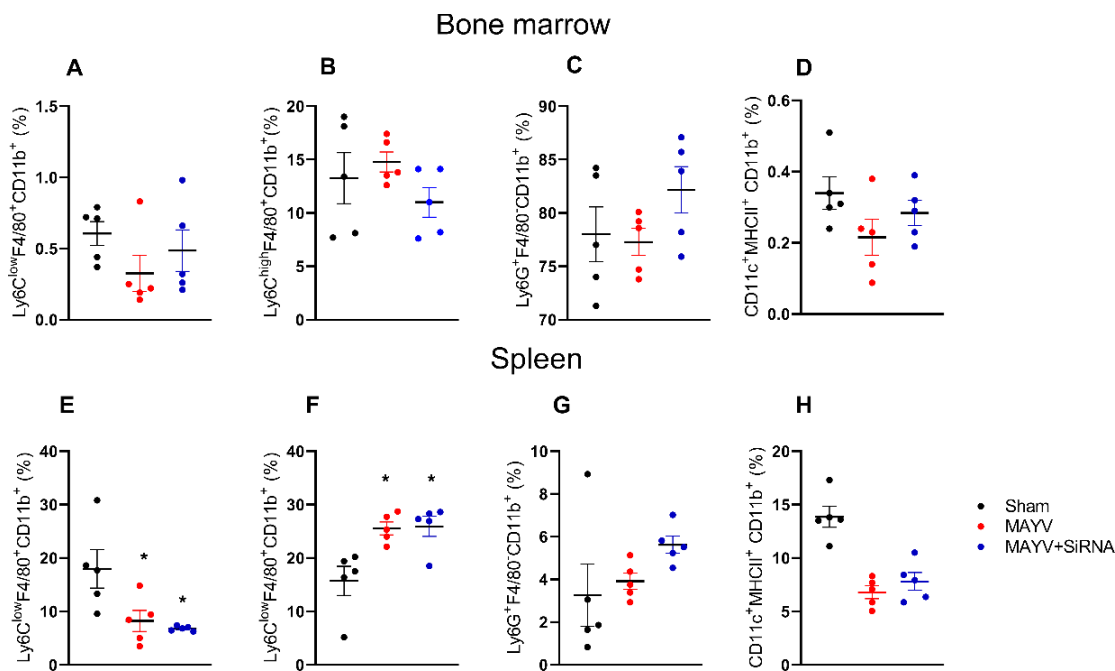


Figure S12. Effect of treatment with SiMCP1 on the behavior of myeloid cells in bone marrow and spleen in mice infected with MAYV. 4-week old mice were treated for 3 days before infection with SiMCP1 and on days 2 and 5 post-infection. Animals were infected via the rear right footpad with 10^6 PFU or were mock infected with C6/36 cells supernatant (A and E) Percentage of residents macrophages. (B and F) Percentage of inflammatory monocytes. (C) and (G) Percentage of neutrophils. (D and H) Percentage of dendritic cells. Statistics were performed with two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value $< 0,05$). Analysis are representative of at least five mice per group.

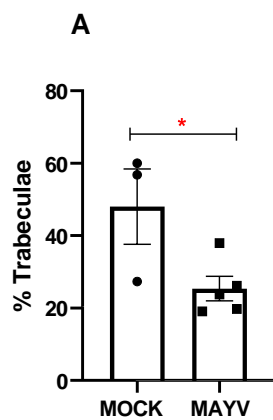


Figure S13. MAYV infection affects the trabecular bone. Analysis of the percentage of trabeculae in mock- and MAYV-infected WT mice. The counting of the percentual area of trabeculae was performed in tibial paraffin sections stained with Masson's trichrome stain at day 21 after infection using the ImageJ program (A). Statistics were performed using Student t test, Representative images from three to five mice per group are shown.

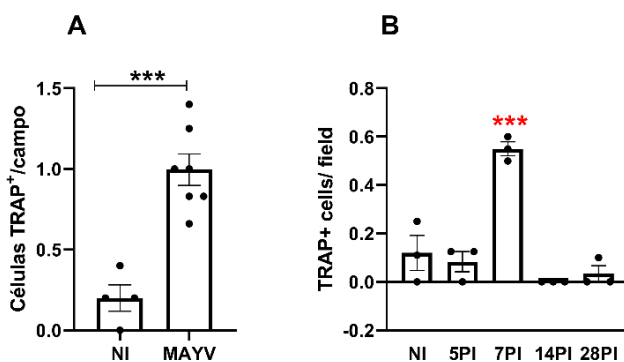


Figure S14. Labeling of trap+ cells in the tibia and maxilla of mice infected with MAYV. (A) Tibia. (B) Maxilla. Statistics were performed with one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test and Unpaired t test (P value < 0,05).

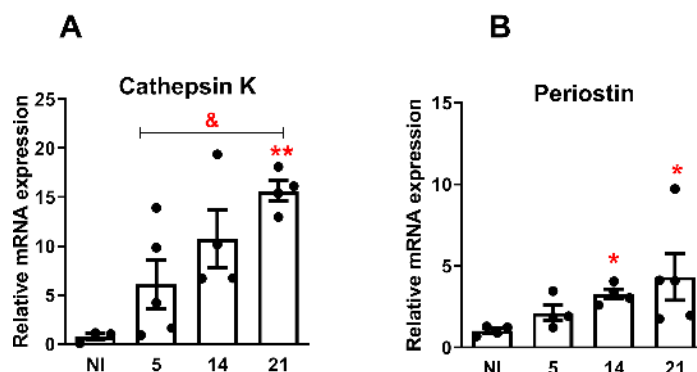


Figure S15. Analysis of bone metabolism gene expression in the maxilla of mice infected with MAYV. qRT-PCR analysis was performed by the relative expression of the genes of interest in relation to the housekeep GHPDH. (A) Cathepsin K. (B) Periostin. Statistics were performed with one-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test and Unpaired t test (P value $< 0,05$). Analyses are representative of at least five mice per group.

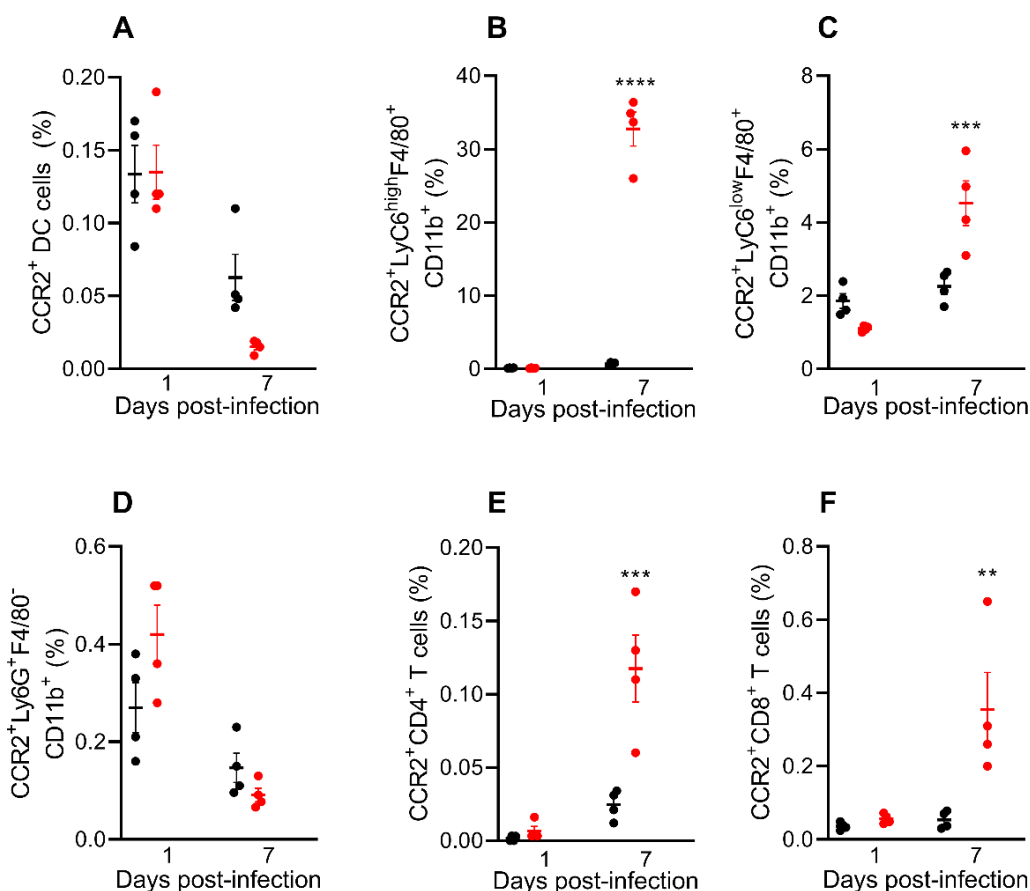


Figure S16. Profile of myeloid immune cells in the paw of MAYV-infected WT mice expressing CCR2. Flow cytometry analysis of immune cells isolated from the hindpaw of animals infected with MAYV at days 1 and 7 PI. (A) Percentage of dendritic cells expressing CCR2. (B) Percentage Inflammatory monocyte expressing CCR2. (C) Percentage of macrophages expressing CCR2. (D) Percentage of CD4⁺ T cells expressing CCR2. (F) Percentage of CD8⁺ T cells expressing CCR2. Statistics were performed with two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value $< 0,05$). Analyses are representative of at least four mice per group.

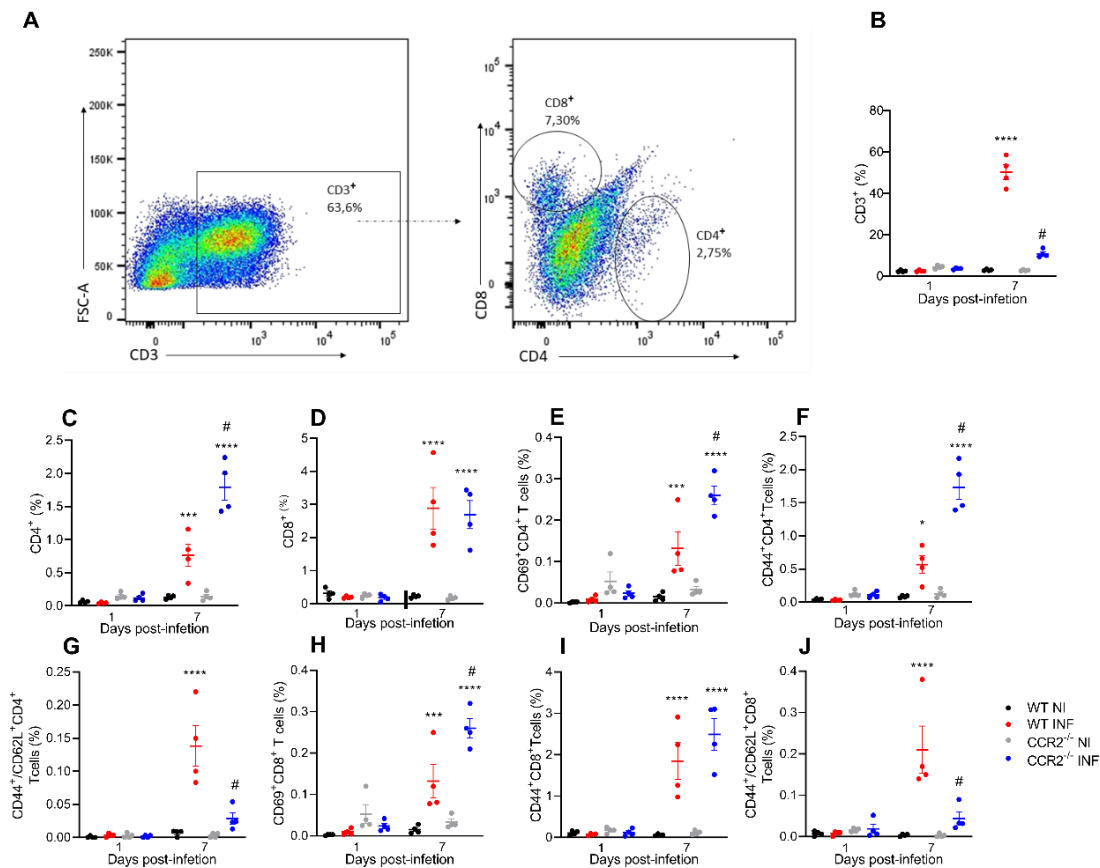


Figure S17. Profile of lymphoid immune cells in the paw of MAYV- infected WT and CCR2^{-/-} mice. Flow cytometry analysis of immune cells isolated from the hindpaw of animals infected with MAYV at days 1 and 7 PI. (A) Panel shows gating strategy to define the population of lymphoid cells from the single cells. (B) CD3⁺ cells population. (C) CD4⁺T cells population. (D) CD8⁺ T cells population. (E) Percentage of CD4⁺T cells expressing CD69. (F) Percentage of CD4⁺T cells expressing CD44. (G) Percentage of CD4⁺T cells expressing CD44/CD62L. (H) Percentage of CD8⁺T cells expressing CD69. (I) Percentage of CD8⁺T cells expressing CD44. (J) Percentage of CD4⁺T cells expressing CD44/CD62L. Statistics were performed with two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (**P value <0,05**). Analysis are representative of at least four mice per group.

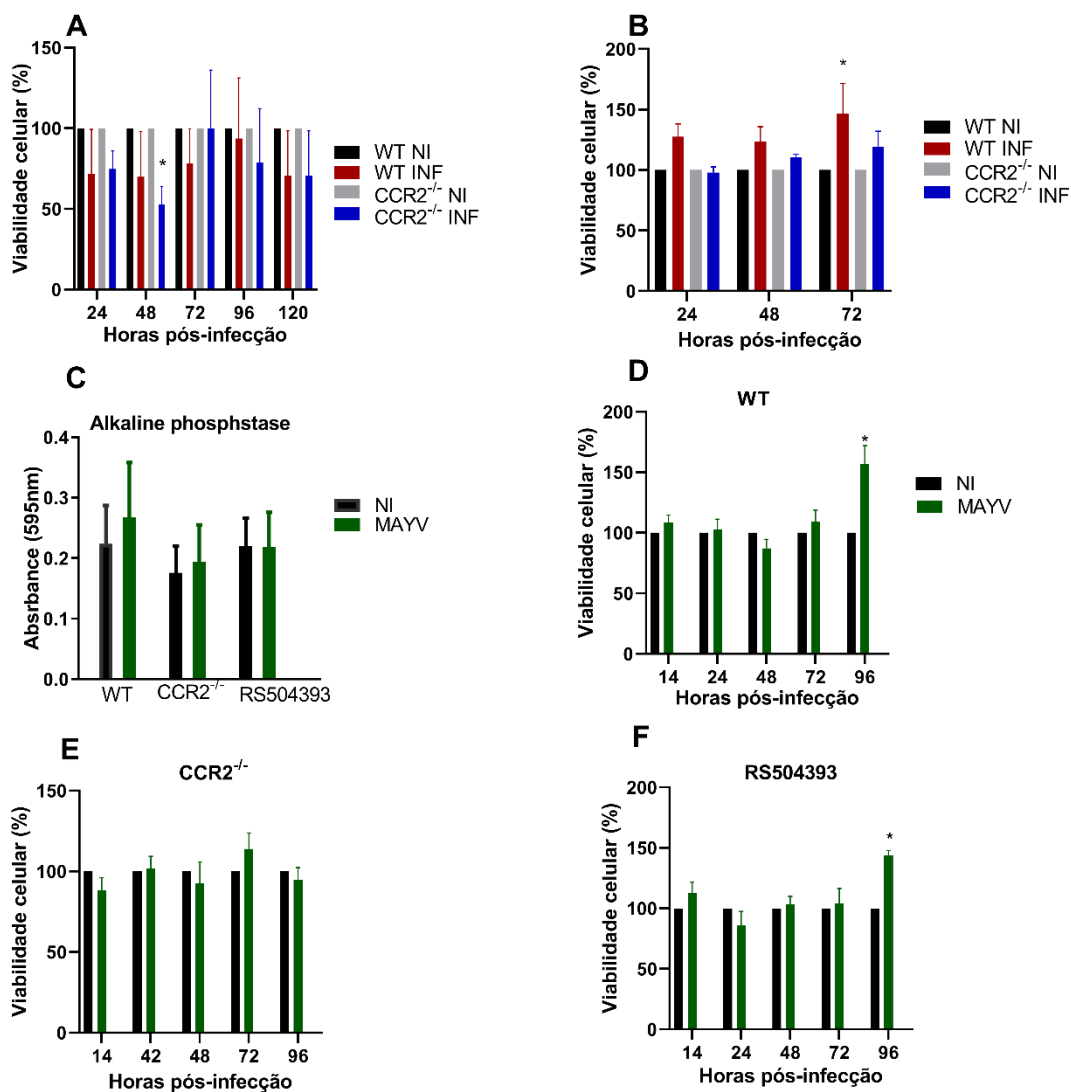


Figure S18. Cell viability analysis in primary cultures of macrophages, osteoclasts and osteoblasts. After culture infection, cell viability was evaluated with MTT at different post-infection time points. (A) Cell viability of primary culture of WT and CCR2^{-/-} osteoclasts. (B) Cell viability of primary culture of WT and CCR2^{-/-} macrophages. (C) Alkaline phosphatase activity in osteoblast culture. (D) Cell viability of primary culture of WT osteoblasts after 14 days of differentiation infected with CHIKV (MOI1) e MAYV (MOI1). (E) Cell viability of primary culture of CCR2^{-/-} osteoblasts after 14 days of differentiation infected with CHIKV (MOI1) e MAYV (MOI1). (F) Cell viability of primary culture of osteoblasts (CCR2 block with RS504393) after 14 days of differentiation infected with CHIKV (MOI1) e MAYV (MOI1). Statistics were performed with two-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test (P value <0,05).

SI9Table 1. Primers sequences

Primer	Sequence
GAPDH	F5'ACGGCCGCATCTTCTTGCA3' R5'CTCCCTTCGATCCTACAGTAATG3'
Cathepsin K	F5'CTCCCTTCGATCCTACAGTAATG3' R5'TCAGAGTCAATGCCTCCGTTCC3'
Periostin	F5'AAACCTCAGCAGGCGCTT3' R5'CCCCTGGATTACCCTTGAGAA3'
PPIA	F5'CAAACAAACGGTCCCAG3' R5'TTCACCTTCCCAAAGACCAC3'
RPS18	F:5'TAGCCTTTGCCATCACTGCC3' R:5'CATGAGCATATCTCCGGCCC3'
CCL7	F:5'TGGGAAGCTGTTATCTTCAAHACA3' R:5'CTCGACCCACTTCTGATGGG3'
CCL2	F5'-TAAAAACCTGGATCGGAACCAAA-3' R5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT-3'
TNF	F5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' R5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'
IL-6	F5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' R5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'
CCL5	F5'-CAAGTGCTCCAATCTTGCAAGTC-3' R5'-TCCTCTGGGTTGGCACACAC-3'

ANEXO 3

create a revision	EA: Baradhane, Priyanka	IMM-2021-6821	Tumor necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of chikungunya virus infection.	10-Nov-2021	21-Apr-2022
	<ul style="list-style-type: none">Major Revision (21-Apr-2022)Due on: 02-Jun-2022				
	view decision letter		View Submission		
	<input checked="" type="checkbox"/> Contact Journal				

ANEXO 4



Seroprevalence, Prevalence, and Genomic Surveillance: Monitoring the Initial Phases of the SARS-CoV-2 Pandemic in Betim, Brazil

Ana Valesca Fernandes Gilson Silva^{1*}, Diego Menezes^{2,3†},
 Filipe Romero Rebelo Moreira⁴, Octávio Alcântara Torres⁵,
 Paula Luíze Camargos Fonseca^{6,7}, Rennan Garcias Moreira⁸, Hugo José Alves^{9,10},
 Vivian Ribeiro Alves¹, Tânia Maria de Resende Amaral¹, Adriano Neves Coelho¹,
 Júlia Maria Saraiva Duarte¹, Augusto Wana da Rocha¹,
 Luiz Gonzaga Paula de Almeida¹, João Locke Ferreira de Araújo¹¹,
 Hilton Soares de Oliveira¹, Nova Jersey Cláudio de Oliveira¹, Camilla Zolin⁴,
 Jôsy Hubner de Sousa⁷, Elizângela Gonçalves de Souza¹, Rafael Marques de Souza¹²,
 Luciana de Lima Ferreira¹³, Alexandra Lehmkuhl Gerber⁴,
 Ana Paula de Campos Guimarães⁴, Paulo Henrique Silva Maia¹,
 Fernanda Martins Marim¹⁴, Lucylene Migula⁴, Cristiane Campos Monteiro¹,
 Tuffi Saliba Neto¹, Fabricia Soares Freire Pugêdo¹, Daniel Costa Queiroz¹⁵,
 Damareo Nigla Alborquetti Cuzzuol Queiroz¹, Luciana Cunha Resende-Moreira⁴,
 Franciele Martins Santos¹, Erika Fernanda Carlos Souza¹, Carolina Moreira Voloch⁴,
 Ana Tereza Vasconcelos⁴, Renato Santana de Aguiar^{14,16*} and Renan Pedra de Souza^{14*}

OPEN ACCESS

Edited by:
 M. Pilar Franco,
 Fundación para el Fomento de la
 Investigación Sanitaria y Biomédica
 de la Comunidad Valenciana (FISABIO),
 Spain

Reviewed by:
 Adriano de Bernardi Schmele,
 University of California, Santa Cruz,
 United States
 Juan Angel Palino Galindo,
 Columbia University, United States

***Correspondence:**
 Ana Valesca Fernandes Gilson
 Silva
 avalescafernandes@hotmail.com
 Renato Santana de Aguiar
 santansm@gmail.com
 Renan Pedra de Souza
 rnsapeda@gmail.com

**†These authors have contributed
 equally to this work and share first
 authorship**

Specialty section:
 This article was submitted to
 Infectious Agents and Disease,
 a section of the journal
 Frontiers in Microbiology

**Received: 22 October 2021
 Accepted: 07 January 2022
 Published: 07 February 2022**

¹ Escola de Saúde Pública de Betim, Betim, Brazil, ² Programa de Pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ³ Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ Centro de Laboratórios Multidisciplinares, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁶ Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Brazil, ⁷ Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁸ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁹ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ¹⁰ Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ¹¹ Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (DOR), Rio de Janeiro, Brazil

The COVID-19 pandemic has created an unprecedented need for epidemiological monitoring using diverse strategies. We conducted a project combining prevalence, seroprevalence, and genomic surveillance approaches to describe the initial pandemic stages in Betim City, Brazil. We collected 3239 subjects in a population-based age-, sex- and neighborhood-stratified, household, prospective; cross-sectional study divided into three surveys 21 days apart sampling the same geographical area. In the first survey, overall prevalence (participants positive in serological or molecular tests) reached 0.46% (90% CI 0.12–0.80%), followed by 2.69% (90% CI 1.88–3.49%) in the second survey and 6.67% (90% CI 5.42–7.92%) in the third. The underreporting reached 11, 19.6, and 20.4 times in each survey. We observed increased odds to test positive in females compared to males (OR 1.88 95% CI 1.25–2.82), while the single best predictor for positivity was ageusia/anosmia (OR 8.12, 95% CI 4.72–13.98). Thirty-five SARS-CoV-2

OPEN

In-depth characterization of a novel live-attenuated Mayaro virus vaccine candidate using an immunocompetent mouse model of Mayaro disease

Mânlio Tasso de Oliveira Mota^{1,4*}, Vivian Vasconcelos Costa^{1,4*}, Michelle Amantêla Sugimoto³, Geórgia de Freitas Guimarães¹, Celso Martins Queiroz-Junior², Thalane Pinto Moreira², Carla Dalane de Sousa², Franciele Martins Santos², Victoria Fulgêncio Queiroz², Ingredy Passos², Josy Hubner², Danielle Gloria Souza², Scott C. Weaver⁴, Mauro Martins Teixeira² & Mauricio Lacerda Nogueira^{1*}

Mayaro virus (MAYV) is endemic in South American countries where it is responsible for sporadic outbreaks of acute febrile illness. The hallmark of MAYV infection is a highly debilitating and chronic arthralgia. Although MAYV emergence is a potential threat, there are no specific therapies or licensed vaccine. In this study, we developed a murine model of MAYV infection that emulates many of the most relevant clinical features of the infection in humans and tested a live-attenuated MAYV vaccine candidate (MAYV/IRES). Intraplantar inoculation of a WT strain of MAYV into immunocompetent mice induced persistent hypemocception, transient viral replication in target organs, systemic production of inflammatory cytokines, chemokines and specific humoral IgM and IgG responses. Inoculation of MAYV/IRES in BALB/c mice induced strong specific cellular and humoral responses. Moreover, MAYV/IRES vaccination of immunocompetent and interferon receptor-defective mice resulted in protection from disease induced by the virulent wt MAYV strain. Thus, this study describes a novel model of MAYV infection in immunocompetent mice and highlights the potential role of a live-attenuated MAYV vaccine candidate in host's protection from disease induced by a virulent MAYV strain.

Mayaro virus (MAYV) is an arbovirus of the *Togaviridae* family, *Alphavirus* genus. It is enzootic in South America and endemic in some rural areas¹. Since its discovery in 1954 at Mayaro county, Trinidad and Tobago², MAYV has been reported in different countries of Latin America and the Caribbean^{3,4}. In Brazil the first MAYV outbreak was reported in 1957, near the River Guama, in Pará State⁵. However, most of the clinical and epidemiologic knowledge on this virus came from an outbreak that occurred in Belterra, Pará State, in 1978^{6,7}. Since then, MAYV circulation has been reported in several Brazil States, mainly in the Central-West and North regions⁸⁻¹³ including Pará, Tocantins, Mato Grosso, Amazonas and Goiás⁸⁻¹³. Although it was initially restricted to forest areas, mainly in the Amazon region¹⁴, there is growing evidence of MAYV spread to other regions of Brazil, making it an emerging new threat along with other endemic arboviruses such as dengue, Zika and chikungunya viruses.

Canopy-dwelling mosquitoes of the *Haemagogus* genus transmit MAYV. Despite generally being confined to forested areas, it has been shown that there is potential for urbanization and consequently generation of large epidemics. A similar phenomenon was recently reported for chikungunya virus (CHIKV), a genetically and

¹Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ²Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ³World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses, Institute for Human Infections and Immunity, and Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, 77555-0610, USA. ⁴These authors contributed equally: Mânlio Tasso de Oliveira Mota and Vivian Vasconcelos Costa. *email: vivianvcosta@gmail.com; mnogueira@famerp.br

ANEXO 6

Curr Treat Options Infect Dis (2020) 12:387–397
 DOI 10.1007/s40506-020-00240-7

Viral Infections (N. Malavige, Section Editor)



Mayaro Virus Infection: Clinical Features and Global Threat

Franciele Martins Santos, MSc¹
 Roberto Sousa Dias, PhD¹
 Luciana de Souza Fernandes, MSc²
 Cynthia Canedo da Silva, PhD²
 Sérgio Oliveira de Paula, PhD^{1,*}

Address

¹Molecular Immunology Laboratory, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Avenue Peter Henry Rolfs, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil
 Email: depaula@ufv.br

²Department of Microbiology, Federal University of Viçosa, Avenue P. H. Rolfs, Viçosa, MG, 36570-000, Brazil

Published online: 12 November 2020
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

This article is part of the Topical Collection on Viral Infections

Keywords Mayaro virus · Clinical features · Epidemic · Pandemic · Arbovirus · Epidemiology

Abstract

Purpose of review This review aimed to compile the main studies on the Mayaro virus (MAYV), addressing the clinical manifestations of Mayaro fever, in addition to assessing the possibility of epidemic events and a possible pandemic on a global scale.

Recent findings Recent studies using animal models and the evaluation of infection in humans demonstrate that MAYV induces a strong inflammatory response that plays an important role in the development and progression of tissue damage and in the induction of myalgia and arthralgia common to the infection. Due to the similarity of symptoms with other co-circulating arboviruses, differential diagnosis is difficult, which contributes to underestimates of the actual number of cases, affecting epidemiological studies. The development of new methods for molecular diagnosis, faster and more sensitive, is extremely important for overcoming this complication. As there is still no specific treatment or vaccine for MAYV, measures for the prevention and containment of the vector are the best alternatives for disease control.

Summary The increase in the number of possible vectors and their geographic distribution require worldwide health services to dedicate more attention to MAYV, especially in countries in tropical and subtropical regions. Its potential expansion in urbanized areas signals an alert for greater efforts to be made in the treatment and control of the virus.



RESEARCH ARTICLE

Pluripotency of *Wolbachia* against Arboviruses: the case of yellow fever [version 2; peer review: 2 approved]Previously titled: Pluripotency of *Wolbachia* against Arbovirus: the case of yellow fever

Marcele Neves Rocha¹, Myrian Morato Duarte², Simone Brutman Mansur¹,
 Bianca Daoud Mafrá e Silva¹, Thiago Nunes Pereira¹, Talita Émile Ribeiro Adelino²,
 Marta Giovanetti^{3,4}, Luis Carlos Junior Alcantara^{3,4}, Franciele Martins Santos^{5,6},
 Victor Rodrigues de Melo Costa^{5,6}, Mauro Martins Teixeira^{5,7},
 Felipe Campos de Melo Iani^{2,4}, Vivian Vasconcelos Costa^{5,6},
 Luciano Andrade Moreira¹

¹Mosquitos Vetores, IRR, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, MG, Brazil²Serviço de Virologia e Riquetioses, Fundação Ezequiel Dias-LACEN, Belo Horizonte, MG, Brazil³Laboratório de Flavivírus, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil⁴Laboratório de Genética Celular e Molecular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil⁵Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil⁶Research Group in Arboviral Diseases, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil⁷Immunopharmacology Lab, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

V2 First published: 12 Feb 2019, 3:161 (<https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12903.1>)
 Latest published: 16 Apr 2019, 3:161 (<https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12903.2>)

Abstract

Background: Yellow fever outbreaks have re-emerged in Brazil during 2016-18, with mortality rates up to 30%. Although urban transmission has not been reported since 1942, the risk of re-urbanization of yellow fever is significant, as *Aedes aegypti* is present in most tropical and sub-tropical cities in the World and still remains the main vector of urban YFV. Although the YFV vaccine is safe and effective, it does not always reach populations at greatest risk of infection and there is an acknowledged global shortage of vaccine supply. The introgression of *Wolbachia* bacteria into *Ae. aegypti* mosquito populations is being trialed in several countries (www.worldmosquito.org/) as a biocontrol method against dengue, Zika and chikungunya. Here, we studied the ability of *Wolbachia* to reduce the transmission potential of *Ae. aegypti* mosquitoes for Yellow fever virus (YFV).

Methods: Two recently isolated YFV (primate and human) were used to challenge field-derived wild-type and *Wolbachia*-infected (wMef+) *Ae. aegypti* mosquitoes. The YFV infection status was followed for 7, 14 and 21 days post-oral feeding (opf). The YFV transmission potential of mosquitoes was evaluated via nano-injection of saliva into uninfected mosquitoes or by inoculation in mice.

Results: We found that *Wolbachia* was able to significantly reduce the

Open Peer Review

Reviewer Status

	Invited Reviewers	
	1	2
version 2 published 16 Apr 2019	 report	 report
version 1 published 12 Feb 2019	 report	 report

1 Andrew van den Hurk, University of Queensland, St. Lucia, Australia

2 Jayme A. Souza-Neto , São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil
 Bianca C. Carlos, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

ANEXO 8

RESEARCH ARTICLE

Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus

Franciele Martins Santos¹, Roberto Sousa Dias¹, Michelle Dias de Oliveira¹, Isabella Cristina Toledo Alves Costa¹, Luciana de Souza Fernandes¹, Carine Ribeiro Pessoa¹, Sérgio Luis Pinto da Matta², Vivian Vasconcelos Costa³, Danielle G. Souza⁴, Cynthia Canêdo da Silva⁵, Sérgio Oliveira de Paula^{1*}

1 Molecular Immunovirology Laboratory, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, **2** Structural Biology Laboratory, Department of General Biology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil, **3** Morphology Department, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **5** Department of Microbiology, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

* depaula@ufv.br


 OPEN ACCESS

Citation: Santos FM, Dias RS, de Oliveira MD, Costa ICTA, Fernandes LS, Pessoa CR, et al. (2019) Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5): e0007375. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007375>

Editor: William Kinston, University of Pittsburgh, UNITED STATES

Received: September 4, 2018

Accepted: April 9, 2019

Published: May 3, 2019

Copyright: © 2019 Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors are grateful for the financial support of CAPES, CNPq and FAPEMIG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

The Mayaro virus (MAYV) is an endemic arbovirus in South American countries, where it is responsible for sporadic outbreaks of Mayaro fever. Clinical manifestations include fever, headache, ocular pain, rash, myalgia, and debilitating and persistent polyarthralgia. Understanding the mechanisms associated with MAYV-induced arthritis is of great importance due to the potential for its emergence, urbanization and dispersion to other regions.

Methods

15-day old Balb/c mice were infected by two distinct pathways, below the forelimb and in the rear footpad. Animals were observed for a period of 21 days. During this time, they were monitored every 24 hours for disease signs, such as weight loss and muscle weakness. Histological damage in the muscles and joints was evaluated 3, 7, 10, 15 and 20 days post-infection. The cytokine profile in serum and muscles during MAYV infection was evaluated by flow cytometry at different post-infection times. For pain analysis, the animals were submitted to the von Frey test and tibia in different organs was evaluated throughout the study to obtain viral kinetics.

Findings

Infection by two distinct pathways, below the forelimb and in the rear footpad, resulted in a homogeneous viral spread and the development of acute disease in animals. Clinical signs were observed such as ruffled fur, hunched posture, eye irritation and slight gait alteration. In the physical test, both groups presented loss of resistance, which was associated with histopathological damage, including myositis, arthritis, tenosynovitis and periostitis. The immune response was characterized by a strong inflammatory response mediated by the

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN Genomic analysis and immune response in a murine mastitis model of vB_EcoM-UFV13, a potential biocontrol agent for use in dairy cows

Received: 2 January 2018
Accepted: 11 April 2018
Published online: 01 May 2018

Vinicius da Silva Duarte¹, Roberto Sousa Dias¹, Andrew M. Kropinski², Stefano Campanaro³, Laura Treu^{3,4}, Carolina Siqueira⁵, Marcella Silva Vieira⁵, Isabela da Silva Paes⁵, Gabriele Rocha Santana⁵, Franciele Martins⁵, Josicelli Souza Crispim¹, André da Silva Xavier⁶, Camila Geovana Ferro⁷, Pedro M. P. Vidigal⁸, Cynthia Canêdo da Silva¹ & Sérgio Oliveira de Paula⁵

Bovine mastitis remains the main cause of economic losses for dairy farmers. Mammary pathogenic *Escherichia coli* (MPEC) is related to an acute mastitis and its treatment is still based on the use of antibiotics. In the era of antimicrobial resistance (AMR), bacterial viruses (bacteriophages) present as an efficient treatment or prophylactic option. However, this makes it essential that its genetic structure, stability and interaction with the host immune system be thoroughly characterized. The present study analyzed a novel, broad host-range anti-mastitis agent, the T4 virus vB_EcoM-UFV13 in genomic terms, and its activity against a MPEC strain in an experimental *E. coli*-induced mastitis mouse model. 4,975 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were assigned between vB_EcoM-UFV13 and *E. coli* phage T4 genomes with high impact on coding sequences (CDS) (37.60%) for virion proteins. Phylogenetic trees and genome analysis supported a recent infection mix between vB_EcoM-UFV13 and Shigella phage Shf12. After a viral stability evaluation (e.g pH and temperature), intramammary administration (MOI 10) resulted in a 10-fold reduction in bacterial load. Furthermore, pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , were observed after viral treatment. This work brings the whole characterization and immune response to vB_EcoM-UFV13, a biocontrol candidate for bovine mastitis.

Bovine mastitis remains the main cause of economic losses for dairy farmers, estimated at \$ (US)533 billion worldwide, as well as public health concerns, since low quality milk can be considered a vehicle for pathogen transmission^{1–3}.

Mastitis treatment is typically based on the use of short and long-acting antibiotics, respectively, during the lactation and dry period⁴. In terms of the lactation period and specifically regarding clinical mastitis, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Staphylococcus aureus* are the main etiological agents involved that have been routinely isolated⁵. Among these pathogens, mammary pathogenic *Escherichia coli* (MPEC) is