

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Thaiane Pinto Moreira

**Implementação de um modelo murino de infecção pelo
Chikungunya virus para o estudo da patogênese e
identificação de potenciais alvos terapêuticos**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Danielle da Glória de Souza

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vivian Vasconcelos Costa Litwinski

Belo Horizonte

Fevereiro, 2018

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

**Implementação de um modelo murino de infecção pelo
Chikungunya virus para o estudo da patogênese e
identificação de potenciais alvos terapêuticos**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Microbiologia.

Thaiane Pinto Moreira

Belo Horizonte

Fevereiro, 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE THAIANE PINTO MOREIRA
Nº REGISTRO: 2016658392

Coorientadora: Profa. Vivian Vasconcelos Costa
Relatora e Suplente: Dr^a. Daiane Boff

Às 14:00 horas do dia 22 de fevereiro de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Celso Martins Queiroz-Junior (Departamento de Morfologia/ICB/UFMG), Renes de Resende Machado (Faculdade de Farmácia/UFMG) e a Profa. Daniele da Glória de Souza - Orientadora, para julgar o trabalho final "Implementação de um Modelo Murino de Infecção pelo Chikungunya Virus para o Estudo Da Patogênese e Identificação de potenciais alvos terapêuticos", da aluna Thaiané Pinto Moreira, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a 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. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2018.

Dr. Celso Martins Queiroz-Junior *Celso Martins Queiroz-Junior*

Prof. Dr. Renes de Resende Machado *Renes de Resende Machado*

Profa. Daniele da Glória de Souza (Orientadora) *Daniele da Glória de Souza*

Flávio Guimarães da Fonseca
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Silvana e Tarcísio,

Que sempre acreditaram em minha garra, me proporcionando os estudos e condições necessárias para o alcance do sucesso, sempre destacando a importância da honestidade e justiça. Amo vocês!

À minha vovó Indiana,

Pelo valioso exemplo de vida e amorosos ensinamentos que permitiram tornar tudo isto possível.

Às minhas irmãs, Tarcila e Thaís,

Companheiras de todos os momentos. Vivenciaram todas as etapas desta jornada, respeitando minha frequente ausência e fazendo dos momentos difíceis apenas detalhes.

"Se as coisas são inatingíveis, não é motivo para não querê-las. Que tristes os caminhos, se não fora a presença distante das estrelas."

(Mário Quintana)

AGRADECIMENTOS

À Deus: Que esteve ao meu lado, me protegendo e conduzindo a percorrer a caminhada com menos temor, e mais coragem, acreditando em meus sonhos, e em minha capacidade.

À Prof^a. Danielle da Glória de Souza, ou simplesmente Dani! Que me acolheu com tanto amor desde que nos conhecemos e me deu grandes oportunidades para recomeçar! Conviver com você e seu bom humor é uma delícia! Sou imensamente grata por esses dois anos de orientação, aprendizado, carinho, amizade e sorrisos fáceis! Que venham muitos outros! Você mora em meu coração, chefe!

À Prof^a. Vivian Vasconcelos Costa: Que foi muito além da coorientação, esteve ao meu lado incontestavelmente e confiantemente, como amiga. Tenho muito orgulho em ter acompanhado um pouquinho a sua trajetória, a qual com certeza serve de inspiração para mim! Qualquer palavra agora é insignificante perto da minha gratidão por todo o aprendizado, oportunidades, carinho e brincadeiras, chefinha! Meu carinho por você é imensurável!

À família Viviridae: Ah, como são especiais e queridos! Saibam que este trabalho reflete apenas o esforço de uma equipe maravilhosa: Vivi, Jojo, Vidy, Carlota, Ingredyzita, Gi, Fer e Vick! Obrigada por tudo, vocês são sensacionais!

À Carla, Jordana e William: Em especial, quero agradecer a vocês, que sempre foram tão prestativos e disponíveis! Obrigada pela ajuda durante a realização deste trabalho, o qual sem vocês não seria o mesmo!

Aos meus amigos sassaricos: Como sou tão mais feliz por conviver diariamente com vocês! Obrigada por trazerem alegria aos dias cansativos e tornarem tudo muito mais leve e divertido! Camis, Jojo, Carlota, Vidy, Mi, Brendovisck, Jô, lanzito, Vini, Rafinha e Gabis! Cada um de vocês tem um lugarzinho muito especial em meu coração! Obrigada, mais uma vez, por tudo!

Aos colegas e professores do grupo: Muito obrigada pela ajuda em diversos momentos e pelo convívio durante a realização deste trabalho: Lud, Thales, Felipe, Ana Carol, Rê, Paty Campi, Vivi Louise, Prof^a Mila Madeira, Prof^o Caio Tavares, Prof^o Flávio Amaral, Prof^o Mauro Teixeira, Prof^a Patrícia Cisalpino.

Ao Celso, o meu muito obrigada pela ajuda inestimável nas técnicas histológicas, por aceitar participar da banca e, mais que isso, pela amizade durante estes dois anos! Você mora em meu coração!

Aos professores Antônio Oliveira e Renes Machado: Agradeço por possibilitarem a realização dos testes comportamentais e, dessa forma, somarem neste trabalho! Ao Prof^o Renes, agradeço também por aceitar participar da banca e possibilitar o meu crescimento e aprimoramento.

Às queridas Gil, Frank, Ilma e Rose por possibilitarem um ambiente de trabalho adequado e por sempre serem tão solícitas a nos ajudar! Vocês são sensacionais! Em especial, quero agradecer à Frank e Gil pelo carinho e palavras amigas de todos os dias!

Aos professores Maurício Nogueira e Suresh Mahalingam, agradeço pelas amostras de vírus concedidas!

A todos os animais que participaram deste estudo: Tenho consciência que este trabalho não teria sido feito sem a essencial ajuda destes seres especiais.

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

Aos amigos externos e familiares por me ajudarem em tantas situações e me proporcionarem os vários momentos de lazer e descontração tão necessários. Quer ressaltar minha gratidão à Gilciane, Emídio, Rafa, e meus afilhados amados Paulo, Bernardo e Ray!

À minha família linda e abençoada: Aos meus amados pais, Tarcísio e Silvana, por todos os valores, dedicação, amor incondicional e por toda a confiança depositada em mim desde quando saí de casa aos 14 anos em busca de conhecimento! Às minhas irmãs e fiéis companheiras, Tarcila e Thaiss, obrigada por estarem sempre ao meu lado. Vocês são tudo de bom que tenho! À minha vovó Indiana, minha segunda mãe, te amo para sempre! Ao meu filhote peludo, Frodo, por me apresentar um amor sem medidas e estar sempre ao meu lado! Aos meus cunhados, Nem e Lino, pelo incentivo, carinho e amizade!

Ao Alexandre, meu grande amor e melhor amigo! Você, mais do que ninguém, acompanhou de perto toda esta jornada e, com certeza, trouxe leveza para enfrentar diversos momentos estressantes. Obrigada por todo o apoio, incentivo, companheirismo, finais de semana felizes e amor! Minha vida ficou muito mais feliz desde que você chegou!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcento

A .*Aegypti* – Aedes Aegypti

A. *Albopictus* – Aedes Albopictus

aa – Aminoácidos

AINES - Anti-Inflamatórios Não-Esteroidais

ALT – Alanina Aminotransferase

AT – Azul de Toluidina

C – Proteína do capsídeo

CCL- Quimiocina CC Ligante

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

CHIKF – *Chikungunya fever* – Febre Chikungunya

CHIKV – *Chikungunya virus*

CLEC4M - *C-type lectin domain family 4 member M*

CXCL – Quimiocina CXC Ligante

DC-SIGN - *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* -

DENV – *Dengue virus*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRG – *Dorsal Root Ganglion* – *Gânglio da raiz dorsal*

E1-E2 – Glicoproteínas transmembrana envelope 1 – envelope 2

ECSA – *East/Central/South African genotype*

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic Acid* – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio de imunoabsorção enzimática

EPM – Erro Padrão da Média

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* - Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos

h – hora – unidade de tempo

H&E – Hematoxilina & Eosina

HTAB – *Hexadecyltrimethylammonium Bromide* – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

Ig – Imunoglobulinas

i.pl. – Intraplantar

IASP – *International Association for the Study of Pain*

IFN – Interferon

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL – *Interleukin - Interleucina*

IOL – *Indian Ocean Lineage*

LNP – Linfonodo poplíteo

MIF – *Macrophage Migration Inhibitory Factor* – Fator de inibição de migração de macrófago

min – Minutos – Unidade de tempo

mL – Mililitro – Unidade de volume

MMP2 – Metaloproteinase 2

MPO – Mieloperoxidase

n.d – Não detectável

NAG – *N-Acetyl-B-D-Glucosaminidase* - N-acetilglicosaminidase

NHP - *Non Human Primates* - Primatas não humanos

NI – Não infectados

NK – *Natural Killer*

nsP1-nsP4 – Proteínas não- estruturais 1-4

°C – grau Celcius - Escala de medida de temperatura

OD – *Optical Density* – Densidade ótica

OPD – *O-Phenylenediamine Dihydrochloride* – Orto-fenilenodiamina

OPG – *Osteoprotegerin - Osteoprotegerina*

p.i. – Pós-infecção.

PBS – *Phosphate-Buffered Saline* – Solução salina tamponada com fosfato

PFU – *Plaque Forming Unit* – Unidade formadora de placa

PMN – Polimorfonuclear

QD – Quadríceps

RA – Artrite reumatoide

RANK – *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B* - Receptor ativador do fator nuclear kapa B

RANKL – *Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* - Ligante do receptor do fator nuclear kapa B

RRV – *Alphavirus Ross River*

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SFB - *Serum Fetal Bovine* – Soro fetal bovino

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WT – *Wild Type* – Animais selvagens

ZIKV – *Zika virus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica dos casos relatados de febre chikungunya no mundo em 2016.

Figura 2 – Ciclo de transmissão do *Chikungunya virus* pelo mosquito vetor em ciclo enzoótico e urbano.

Figura 3 – Representação esquemática da estrutura conformacional e genética do *Chikungunya virus*.

Figura 4 – Ciclo de replicação do *Chikungunya virus*.

Figura 5 – Sinais da febre chikungunya.

Figura 6 – Disseminação do *Chikungunya virus* no hospedeiro.

Figura 7 – Protocolo experimental para a avaliação da hipernocicepção articular inflamatória em camundongos infectados pelo CHIKV.

Figura 8 – Protocolo experimental para a avaliação dos parâmetros clínicos e resposta inflamatória em camundongos infectados pelo CHIKV.

Figura 9 – Protocolo experimental para a avaliação comportamental dos camundongos infectados pelo CHIKV.

Figura 10 – Protocolo experimental para a avaliação da letalidade e parâmetros inflamatórios/recuperação da carga viral em camundongos infectados pelo CHIKV.

Figura 11 – A infecção i.pl. de CHIKV induz hipernocicepção articular inflamatória prolongada em camundongos.

Figura 12 – A infecção i.pl. pelo CHIKV não altera peso corporal e edema de pata nos camundongos.

Figura 13 – A infecção i.pl. pelo CHIKV induz alterações hematológicas discretas em camundongos.

Figura 14 – A infecção i.pl. pelo CHIKV não está associada à recuperação de carga viral viável no LNP, baço e soro de camundongos.

Figura 15 – A infecção i.pl. pelo CHIKV induz aumento do recrutamento de neutrófilos no quadríceps, mas não no baço e no fígado dos camundongos.

Figura 16 – A infecção i.pl. pelo CHIKV está associada a elevados níveis da quimiocina CCL2 e da citocina IL-6 no baço, mas não das quimiocinas CXCL-1 e CCL5 nesse mesmo órgão.

Figura 17 – A infecção i.pl. pelo CHIKV induz hipernocicepção articular inflamatória prolongada em camundongos jovens.

Figura 18 – A infecção i.pl. pelo CHIKV não altera o peso corporal e o edema de pata em camundongos.

Figura 19 – A infecção i.pl. pelo CHIKV em camundongos jovens induz linfocitopenia e aumento do nível de hematócrito, mas nenhuma alteração no número de plaquetas.

Figura 20 – A infecção i.pl. pelo CHIKV está associada à recuperação de carga viral viável no coxim plantar, LNP, quadríceps e baço, mas não no soro, nervo ciático e DRG de camundongos.

Figura 21 – A infecção i.pl. pelo CHIKV não induz alterações nos níveis de ALT no soro de camundongos.

Figura 22 – A infecção i.pl. pelo CHIKV está associada com um aumento no influxo de neutrófilos no coxim plantar de camundongos.

Figura 23 – Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam altos níveis de TNF α e IL-6, mas não de IL-1 β no coxim plantar.

Figura 24 – Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam altos níveis de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2, CXCL-9 e CXCL-10, mas não de CXCL-1 no coxim plantar.

Figura 25 – A infecção i.pl. pelo CHIKV induz a produção de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos no soro dos camundongos.

Figura 26 – Seções histológicas dos coxins plantares de camundongos infectados e não infectados pelo CHIKV.

Figura 27 – Seções histológicas da articulação do joelho de camundongos infectados e não infectados pelo CHIKV.

Figura 28 – Seções histológicas da articulação do joelho de camundongos infectados e não infectados pelo CHIKV.

Figura 29 – Os camundongos infectados pelo CHIKV não apresentam alterações na razão entre RANKL e OPG.

Figura 30 – A infecção pelo CHIKV não induz alterações motoras e de locomoção, mas está associada a comprometimento da sensibilidade nociceptiva dos camundongos.

Figura 31 – A infecção i.pl. pelo CHIKV em camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β (IFN α / β R $^{-/-}$) induz perda de peso e alta taxa de letalidade.

Figura 32 – Os camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam níveis aumentados da transaminase hepática ALT no soro, após a infecção pelo CHIKV.

Figura 33 – Acúmulo de neutrófilos e macrófagos no coxim plantar, quadríceps, baço e fígado de camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β após a infecção pelo CHIKV.

Figura 34 – Quantificação dos níveis das citocinas IFN γ e IL-6 no soro de camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β após a infecção pelo CHIKV.

Figura 35 – Os camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam carga viral viável elevada no LNP, quadríceps, baço, fígado, soro e cérebro após a infecção pelo CHIKV.

RESUMO

A febre Chikungunya é uma doença viral que tem como agente etiológico o *Chikungunya virus* (CHIKV) e é transmitida principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *A. albopictus*. As principais manifestações clínicas da doença incluem febre, cefaleia, erupções cutâneas eritematosas e maculopapulares, dor nas costas, mialgia e artralgia simétrica de caráter bifásico, que na maioria das vezes evolui para crônica. Até o momento, não há tratamento antiviral específico ou vacina disponível para o tratamento da febre chikungunya. O desenvolvimento de modelos que permitam estudar a interação entre o vírus e o seu hospedeiro poderão servir de base para o entendimento de fatores associados com a doença, assim como servirão para testes de novas terapias antivirais e/ou anti-doença.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi implementar um modelo de infecção pelo CHIKV em camundongos imunocompetentes a fim de estudar a patogênese da doença e identificar possíveis alvos terapêuticos. Foram utilizados camundongos selvagens (WT) da linhagem C57BL/6j infectados pelo CHIKV e seus respectivos controles não infectados. Foi realizada uma cinética de infecção (1, 3, 7 e 14 dias) após a inoculação intraplantar do CHIKV e diversos parâmetros foram avaliados. Nossos resultados demonstram que a infecção pelo CHIKV em camundongos de 4 semanas induziu marcante leucopenia, principalmente de linfócitos, em relação aos camundongos controles não infectados. Observamos também uma maior resposta inflamatória frente à infecção, demonstrada por um maior recrutamento de neutrófilos para os sítios de infecção, aumento na produção de diversos mediadores inflamatórios, citocinas (TNF α e IL-6) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL-2 e CXCL-9) e elevada carga viral no coxim plantar, linfonodo poplíteo, quadríceps e baço dos animais. Os camundongos apresentaram hipernocicepção articular inflamatória prolongada, bem como demonstraram alteração sensitiva em resposta a um estímulo nociceptivo térmico. Ainda, demonstramos alterações histopatológicas importantes nas articulações do tornozelo e joelho, mesmo sem haver aumento de perda óssea ou alterações na função motora. Além disso, nós demonstramos, através da

utilização de camundongos deficientes para o receptor de IFN ($IFNR_{\alpha/\beta^{-}}$), que o curso da doença induzida pela infecção pelo CHIKV é muito mais grave e está associado à elevada taxa de mortalidade e a um agravamento de todos os parâmetros clínicos e inflamatórios descritos anteriormente. De maneira geral, nós desenvolvemos um modelo experimental em camundongos WT jovens que mimetiza grande parte parâmetros da doença induzida pelo CHIKV em humanos. Ainda, demonstramos o papel protetor crucial exercido pelos interferons do tipo I (IFN_{α} e IFN_{β}) na resposta do hospedeiro frente à infecção. Estes modelos contribuirão para a elucidação de futuros mecanismos associados à patogênese da interação CHIKV-hospedeiro e no desenvolvimento de novos potenciais terapêuticos antivirais e anti-doença.

ABSTRACT

Chikungunya fever is an infectious viral disease that has as etiological agent the Chikungunya virus (CHIKV), and is mainly transmitted by the mosquitoes *Aedes aegypti* and *A. albopictus*. The most important clinical signs of disease include fever, headache, erythematous and maculopapular rash, back pain, myalgia, and symmetrical biphasic arthralgia, which in majority of cases evolve to chronic. Until now, there is no specific antiviral treatment or vaccine available to the treatment of chikungunya fever. The development of models to study the interaction between the virus and its host may be used as a basis for understanding factors associated with the disease, as well as for testing new antiviral and/or anti-disease therapies

In this context, the aim of this work was to implement a model of CHIKV infection in immunocompetent mice in order to study the pathogenesis of the disease and to identify possible therapeutic targets. Wild-type (WT) mice of the C57BL/6j lineage were infected with CHIKV and their respective uninfected controls were also used. An infection kinetics (1, 3, 7 and 14 days) was performed after CHIKV inoculation and several parameters were evaluated. Our results shows that CHIKV infection in 4 weeks old mice induced strong leukopenia, predominantly composed of lymphocytes, in comparison to uninfected control mice. In addition, we observed a higher inflammatory response to infection, as demonstrated by an increased recruitment of neutrophils and macrophages to the sites of infection, increased production of several inflammatory mediators, such as the cytokines (TNF α and IL-6) and chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CLL5, CXCL-2 and CXCL-9) and elevated titers of viable viral loads in the rear foot pad, popliteal lymph node, quadriceps and spleen of CHIKV infected mice. Furthermore, these mice showed a sensitive alteration in response to a nociceptive stimulus (hot plate test), inflammatory articular hypernociception, and important histopathological changes in the ankle and knee joints, even without occurrence of bone loss or changes in motor function. Finally, the role type I interferons (IFN α and IFN β) during CHIKV infection was evaluated. We have demonstrated, through the use of mice deficient to this receptor (IFN α/β R $^{-/-}$), that the course of the disease

induced by CHIKV infection is much more severe and is associated with a high mortality rate and a worsening of all clinical and inflammatory parameters described above. Overall, those results demonstrate the development of an experimental model in young WT mice that mimics a great number of parameters of CHIKV-induced disease in humans. Furthermore, we demonstrate the crucial protective role of type I interferons (IFN α and IFN β) in the host's response to the infection. Those models will contribute in the future to the elucidation of mechanisms associated with the pathogenesis of the CHIKV-host interactions and to the development of new antiviral and anti-disease therapeutic potentials.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
1.1. HISTÓRICO DA TRANSMISSÃO DO <i>CHIKUNGUNYA VIRUS</i> (CHIKV) NO MUNDO E EPIDEMIOLOGIA	20
1.2. TRANSMISSÃO	22
1.3. A PARTÍCULA VIRAL	23
1.3.1. Estrutura e organização do genoma viral	23
1.3.2. Ciclo de replicação viral	25
1.4. A FEBRE CHIKUNGUNHA (CHIKF)	27
1.4.1. Manifestações clínicas.....	27
1.4.2. Imunopatogênese	29
1.4.3. Diagnóstico, tratamento e prevenção	33
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. OBJETIVO GERAL	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. ANIMAIS	38
4.2. VÍRUS	38
4.3. PROPAGAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO VÍRUS.....	38
4.4. ESQUEMAS DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	39
4.4.1. Tópico 1 – Definir o inóculo viral a ser utilizado no modelo experimental.....	39
4.4.2. Tópico 2 – Caracterizar os parâmetros de doença e a resposta inflamatória em camundongos selvagens da linhagem C57BL/6j infectados pelo CHIKV	40
4.4.3. Tópico 3 – Avaliar a participação do receptor de Interferons do tipo I (IFN α / β R) na patogênese da infecção causada pelo CHIKV.....	42
4.5. DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL	43
4.6. MEDIDA DO EDEMA PLANTAR.....	44
4.7. MEDIDA DA HIPERNOCICEPÇÃO ARTICULAR INFLAMATÓRIA....	45
4.8. ANÁLISE HEMATOLÓGICA	46
4.9. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ...	47

4.10.	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS IgM e IgG	48
4.11.	DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS (MPO).....	48
4.12.	DETECÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS (NAG).....	49
4.13.	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA TRANSAMINASE HEPÁTICA ALT..	50
4.14.	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	50
4.15.	TESTES COMPORTAMENTAIS	51
4.15.1.	Rota Rod	51
4.15.2.	Placa quente	52
4.15.3.	Campo aberto.....	52
4.16.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5.	RESULTADOS	54
5.1.	TÓPICO 1 – Definir o melhor inóculo viral a ser utilizado no modelo experimental	54
5.2.	TÓPICO 2 – Caracterizar os parâmetros de doença e resposta inflamatória em camundongos adultos selvagens da linhagem C57BL/6j	55
5.2.1.	A infecção i.pl. pelo CHIKV não induz perda de peso corporal e edema de pata nos camundongos.	55
5.2.2.	Os camundongos infectados pelo CHIKV não desenvolvem alterações hematológicas significativas.	56
5.2.3.	Os camundongos infectados pelo CHIKV não apresentam carga viral viável detectada no soro, baço e LNP.	57
5.2.4.	A infecção pelo CHIKV induz aumento do recrutamento de neutrófilos no quadríceps, mas não no baço e no fígado dos camundongos.....	58
5.2.5.	Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam elevados níveis da quimiocina CCL2 e da citocina IL-6 no baço, mas não das quimiocinas CXCL-1 e CCL5 nesse mesmo órgão	59
5.3.	TÓPICO 2 - Caracterizar os parâmetros de doença e a resposta inflamatória em camundongos jovens selvagens (4 semanas) da linhagem C57BL/6j.....	61
5.3.1.	A infecção intraplantar com duas linhagens distintas do CHIKV induz hipernocicepção articular inflamatória prolongada.....	61
5.3.2.	A infecção pelo CHIKV não altera peso corporal e edema de pata em camundongos jovens.	62
5.3.3.	Os camundongos da linhagem C57BL6j jovens desenvolvem alterações hematológicas após a infecção pelo CHIKV	63

5.3.4. Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam carga viral viável detectável no coxim plantar, LNP, quadríceps e baço, mas não no soro, nervo ciático e DRG.	64
5.3.5. Os camundongos infectados pelo CHIKV não apresentam alterações nos níveis de ALT no soro.	65
5.3.6. A infecção pelo CHIKV está associada com um aumento no influxo de neutrófilos no coxim plantar.	66
5.3.7. Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam elevados níveis de quimiocinas e citocinas no coxim plantar.	67
5.3.8. A infecção pelo CHIKV induz a produção de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos no soro dos camundongos.....	70
5.3.9. Alterações histopatológicas induzidas pela infecção i.pl pelo CHIKV. 71	
5.3.10. A infecção pelo CHIKV não induz osteoclastogênese em camundongos.....	75
5.3.11. A infecção pelo CHIKV não está associada a alterações na função motora, mas alterou a sensibilidade nociceptiva em camundongos.	76
5.4. TÓPICO 3 – Avaliar a participação do receptor de interferons do tipo I (IFN α / β R) na patogênese da infecção pelo CHIKV.....	79
5.4.1. Camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam elevada perda de peso e maior taxa de letalidade após a infecção com o CHIKV em relação aos seus controles selvagens da linhagem SV129	79
5.4.2. Camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam níveis aumentados de ALT no soro, bem como elevado recrutamento de neutrófilos e células mononucleares para diversos órgãos, após a infecção pelo CHIKV	80
5.4.3. A ausência do receptor de IFN α / β interfere com a produção de IFN γ e IL-6 durante a infecção pelo CHIKV.....	83
5.4.4. Os animais deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam carga viral elevada após infecção pelo CHIKV.....	84
6. DISCUSSÃO	86

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. HISTÓRICO DA TRANSMISSÃO DO *CHIKUNGUNYA VIRUS* (CHIKV) NO MUNDO E EPIDEMIOLOGIA

O primeiro surto identificado de febre chikungunya, com incidência estimada em 23%, foi relatado em 1952-1953 ao longo dos planaltos costeiros de Mawia, Makonde e Rondo localizados no leste africano, atualmente conhecido como Tanzânia (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Após este primeiro surto, diversas epidemias foram descritas entre as décadas de 1960-1990 na República Centro-Africana, Guiné, Burundi, Angola, Uganda, Malawi, Nigéria, República Democrática do Congo e vários outros países africanos. Na Ásia, o CHIKV foi relatado pela primeira vez durante um surto em Bangkok, Tailândia, em 1958. Então, o vírus se espalhou para outros países até 1964 provocando diversas epidemias e depois ressurgiu em 1975-1976 com alguns casos esporádicos (WAHID *et al.*, 2017).

A próxima epidemia se iniciou em 2004, quando um grande surto na costa do Quênia atingiu mais de 70% da população local, resultando em quase meio milhão de casos, e se espalhou para as ilhas do Oceano Índico (Comores, Mayotte, Seychelles, La Réunion, Sri Lanka e Maurício) até 2005 (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Em 2005-2006, a ilha *La Réunion*, que possui uma população de aproximadamente 750.000 habitantes, vivenciou uma grande epidemia que resultou em mais de 260.000 casos (cerca de um terço da população), entre os quais diversas complicações clínicas incomuns e graves foram relatadas, como, por exemplo, miocardite e pneumopatia aguda (GARDNER *et al.*, 2010; STAIKOWSKY *et al.*, 2009; ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Na Ásia, o CHIKV reapareceu em 2005 em um dos maiores surtos já descritos, no qual aproximadamente 1,3 milhões de casos foram relatados em 13 estados da Índia (BURT *et al.*, 2017). Na Europa, o primeiro surto de CHIKV autóctone foi relatado no nordeste da Itália em 2007, o qual se disseminou e resultou em um total de 214 casos confirmados. Ainda, um número significativo de casos na França foi confirmado nos anos de 2010, 2013 e 2014 (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Nas Américas, o surgimento do CHIKV ocorreu em 2013 na ilha de São Martinho (Caribe) e,

desde então, diversos novos casos foram identificados em 45 países no Caribe, América do Sul e América Central, com mais de um milhão de casos suspeitos e 25.000 casos confirmados nestas regiões (WAHID *et al.*, 2017).

No Brasil, o primeiro caso autóctone de CHIKV foi confirmado em 2014 no município de Oiapoque, Amapá. Ainda, foram confirmados 37 casos importados em 11 estados brasileiros (Ministério da Saúde, 2014). Desde então, o vírus se disseminou para todo o território brasileiro. Em 2015, foram notificados 38.499 casos prováveis de febre do chikungunya (CHIKF), dos quais 17.971 foram confirmados. Ainda, foram registrados 14 óbitos por essa doença, nos seguintes estados: Bahia (5), Sergipe (2) e Pernambuco (7) (Ministério da Saúde, 2015). Já em 2016, 151.318 casos de CHIKF foram confirmados e a região Nordeste apresentou a maior taxa de incidência. Neste mesmo ano, a epidemia resultou em 196 óbitos (Ministério da Saúde, 2016). De acordo com o último Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde (Ministério da Saúde, 2017), em 2017 foram registrados e confirmados 151.101 casos da doença, dos quais 168 resultaram em óbito.

Atualmente, o CHIKV está distribuído geograficamente em mais de 60 países, permanecendo endêmico na África, na Índia e em vários países do Sudeste Asiático, bem como na América Latina, conforme ilustrado na figura 1 (MATHEW *et al.*, 2017). Essa elevada distribuição ao redor do globo se deve principalmente à prevalência do mosquito vetor e sua alta eficiência na transmissão do vírus, além do processo de urbanização e fácil deslocamento de indivíduos virêmicos pelo mundo devido à modernização dos meios de transporte (WAHID. *et al.*, 2017).

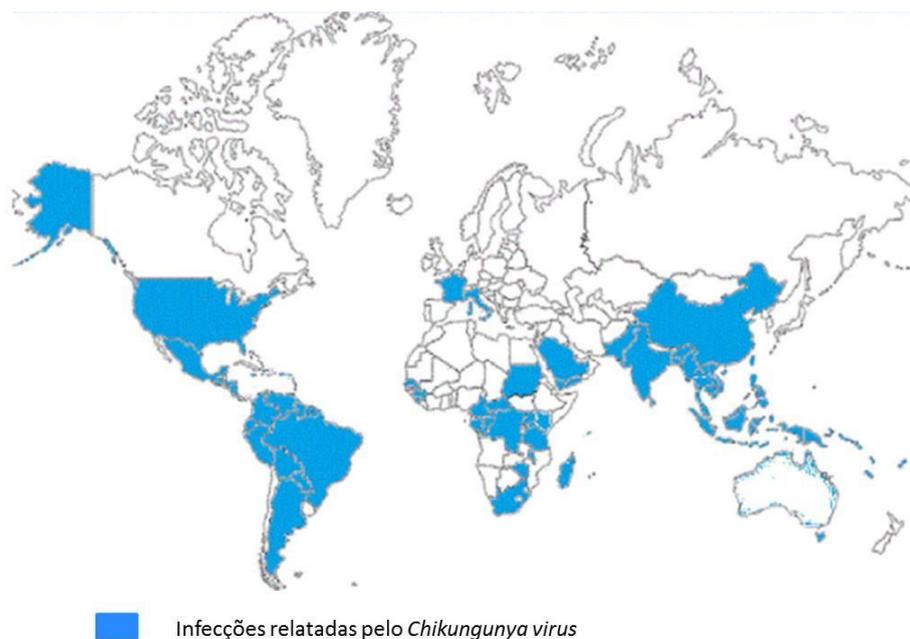


Figura 1: Distribuição geográfica dos casos relatados de febre chikungunya no mundo em 2016. Adaptado de CDC, 2016.

1.2. TRANSMISSÃO

A transmissão do *Chikungunya virus* envolve principalmente mosquitos do gênero *Aedes* (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016). Conforme demonstrado na figura 2, existem dois ciclos de transmissão distintos do vírus, sendo eles o ciclo enzoótico e urbano. O primeiro é comum principalmente na África, em áreas de florestas ou savanas com a presença de vetores competentes, onde o vírus é transmitido por várias espécies do *Aedes* (*A. africanus*, *A. Cordellieri*, *A. furcifer-taylori*, *A. Luteocephalus*, entre outros) a primatas não humanos (macacos), os quais se apresentam como reservatório do vírus (NG & HAPUARACHCHI, 2010). A infecção do homem pode eventualmente ocorrer quando ele adentra estes ambientes selvagens e conseqüentemente, pode dar início ao ciclo urbano. Esse, por sua vez, envolve duas espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, altamente urbanizados, o *A. aegypti* e o *A. albopictus*, os quais transmitem o vírus ao homem (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

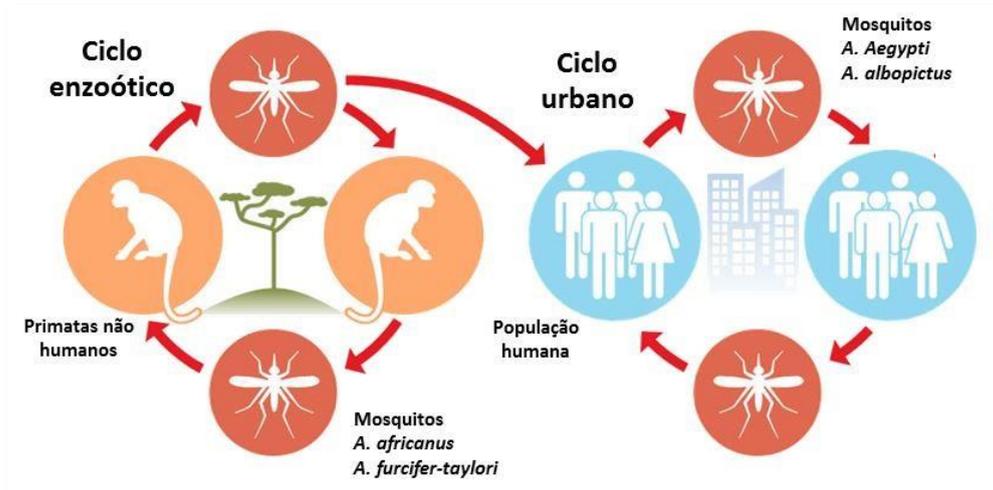


Figura 2: Ciclo de transmissão do *Chikungunya virus* pelo mosquito vetor em ciclo enzoótico e urbano. No ciclo enzoótico, os vetores são mosquitos com hábitos silvestres e os primatas não humanos são os principais hospedeiros, reservatórios e disseminadores do vírus. Nesse ciclo, o homem participa como um hospedeiro acidental ao adentrar áreas de mata. Já no ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão ocorre a partir do vetor urbano infectado, o *Aedes aegypti* /*Aedes albopictus*, na maioria dos casos. Adaptado de CDC & PLOS & REUTERS.

Além dos ciclos descritos acima, outras formas de transmissão têm sido relatadas, como por exemplo, nosocomiais (PAROLA *et al.*, 2006), vertical (GÉRARDIN *et al.*, 2008), via doação de sangue (SIMMONS *et al.*, 2016) e enxerto da córnea (COUDERC *et al.*, 2012).

1.3. A PARTÍCULA VIRAL

1.3.1. Estrutura e organização do genoma viral

O CHIKV é um arbovírus pertencente à família *Togaviridae* e gênero *Alphavirus*, envelopado e com estrutura icosaédrica. Conforme demonstrado na imagem A da figura 3, o vírion apresenta um diâmetro de aproximadamente 70-100nm e é composto por unidades repetidas de glicoproteínas transmembrana (E1 e E2), a proteína do capsídeo (C) e uma bicamada lipídica (HER *et al.*,

2009). Seu genoma consiste de um RNA de fita simples com polaridade positiva, com tamanho aproximado de 12kb e duas janelas abertas de leitura. Quando traduzido, codifica duas poliproteínas, as quais, quando clivadas, dão origem a quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) na extremidade 5' e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K/TF e E1) na extremidade 3', conforme demonstrado na imagem B da figura 3 (BURT *et al.*, 2017).

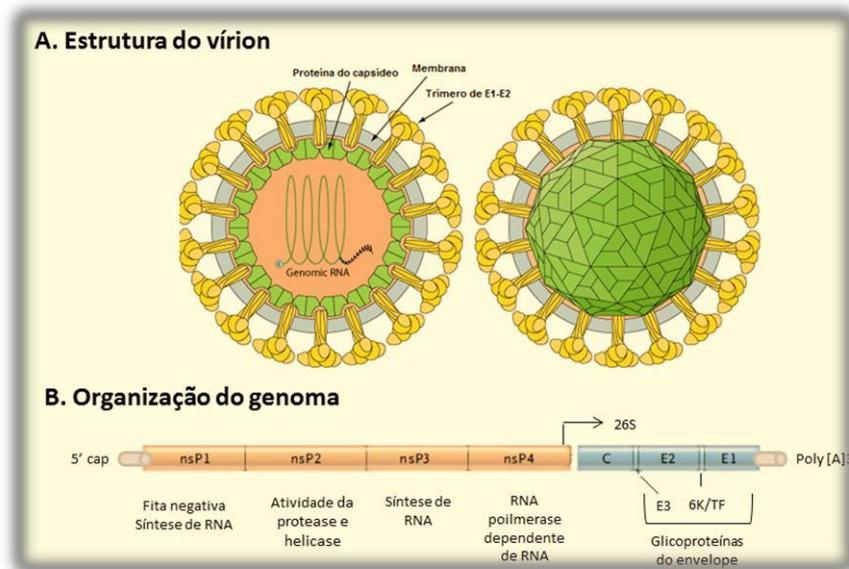


Figura 3: Representação esquemática da estrutura conformacional e genética do *Chikungunya virus*. A imagem A mostra a estrutura icosaédrica do vírion, a qual é composta por três proteínas estruturais, sendo elas as proteínas do envelope (E1 e E2) e a proteína do capsídeo (C). Conforme a mesma figura, as proteínas E1 e E2 formam tríades de glicoproteínas, em forma de espigões, ancorados na membrana que cobrem a superfície viral. Já a imagem B mostra a organização do genoma do vírus, incluindo suas proteínas não estruturais 1 a 4 (nsP1-nsP4) e proteínas estruturais (E1-E3, C, 6K/TF). Adaptado de WEAVER & LECUIT, 2015; Swiss Institute of Bioinformatics, viralZone, 2017.

De acordo com análises filogenéticas, até o momento existem quatro linhagens do CHIKV identificadas, as quais apresentam características genóticas e antigênicas distintas e únicas. (1) O genótipo do Oeste Africano que consiste em isolados do Senegal e da Nigéria. (2) O genótipo do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA), outro genótipo enzoótico encontrado na

África. (3) Isolados de países da Ásia que estão incluídos no genótipo Asiático e, finalmente, (4) o genótipo mais recente, uma Linhagem do Oceano Índico (IOL), o qual se espalhou das ilhas Comores em 2004 e resultou em epidemias graves no sudeste asiático e na Índia durante os anos 2005-2008 (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015; WAHID *et al.*, 2017).

1.3.2. Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação do CHIKV envolve a sua adsorção na célula hospedeira, a qual é facilitada pela interação da glicoproteína do envelope E2 com receptores específicos expressos na superfície das células alvo, conforme representado na figura 4. Alguns receptores têm sido apontados como participantes no processo de internalização/penetração do vírus, tais como o DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*), CLEC4M (*C-type lectin domain family 4 member M*), sulfato de heparano, laminina e integrinas (SCHWARTZ; ALBERT, 2010). Após a ligação ao receptor, o vírus é internalizado pelo processo de endocitose mediada por receptor e, em seguida, ocorrem alterações conformacionais no envelope viral, devido ao ambiente ácido no interior do endossoma, que permitem a liberação do genoma viral no citoplasma da célula (GOULD *et al.*, 2010). Em seguida, dois precursores de proteínas não estruturais são traduzidos a partir do mRNA viral e, então, clivados, o que resulta nas proteínas não estruturais (nsP1-nsP4), as quais apresentam as seguintes funções: (1) nsP1 está envolvida na síntese da fita negativa do RNA viral; (2) nsP2 exibe atividades de RNA helicase, trifosfatase e proteinase, além de estar associada ao desligamento da transcrição na célula hospedeira; (3) nsP3 faz parte da unidade replicase e (4) nsP4 é a RNA polimerase viral (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; SCHWARTZ & ALBERT, 2010).

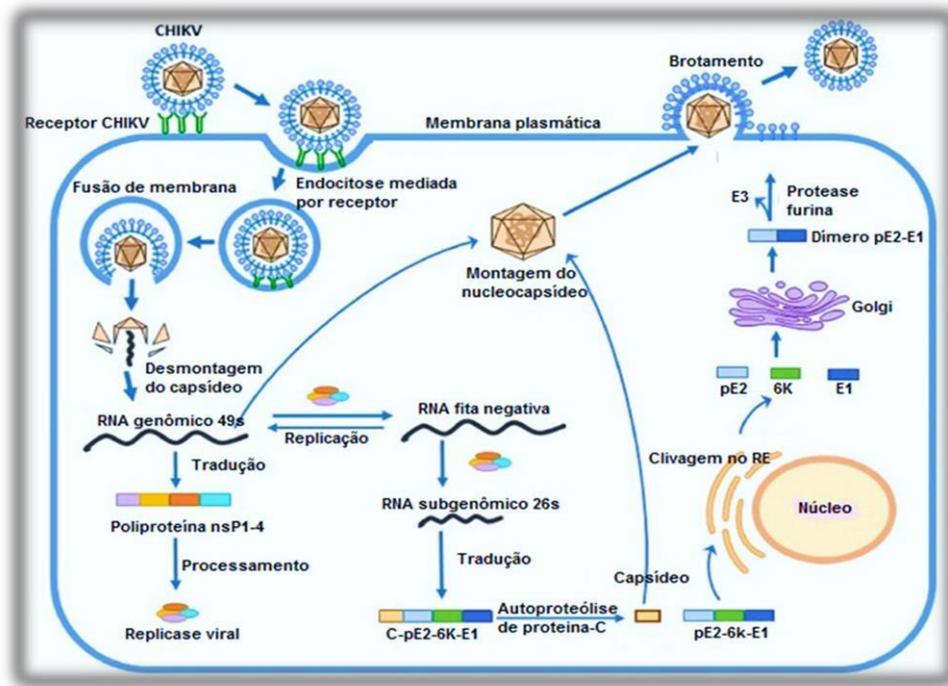


Figura 4: Ciclo de replicação do *Chikungunya virus*. Por meio do processo de endocitose mediada por receptor, o CHIKV adsorve na célula alvo. Em seguida, o ambiente ácido no interior do endossoma desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, levando à liberação do genoma viral no citoplasma. Esse, por sua vez, é traduzido em proteínas virais não estruturais (nsP1-4). Após o processamento, o complexo de proteínas não estruturais forma a replicase viral, a qual catalisa a síntese de uma cadeia de RNA de sentido negativo para servir como molde para a síntese do genoma de sentido positivo e do RNA subgenômico (26S). O RNA subgenômico (26S) é traduzido e produz a poliproteína estrutural (C-E3-E2-6K-E1), a qual é, então, clivada para então produzir as proteínas estruturais individuais, seguida da montagem dos componentes virais. Por fim, a partícula viral madura (ou vírion) montada é liberada por brotamento através da membrana plasmática, onde adquire o envelope com glicoproteínas do hospedeiro incorporadas. Adaptado de ABDELNABI *et al.*, 2015.

As proteínas não estruturais, em conjunto, formam o complexo de replicação viral, o qual sintetiza um intermediário de RNA de fita negativa. Esse, por sua vez, serve como molde para a síntese de RNA subgenômico (26S) e genômico (49S). O RNA subgenômico conduz a expressão do precursor da poliproteína C-pE2-6K-E1, a qual é processada por uma serina

protease autoproteolítica. A proteína do capsídeo (C) é liberada e as glicoproteínas pE2 e E1 são geradas por processamento posterior no retículo endoplasmático. As glicoproteínas pE2 e E1 formam complexos de heterodímeros que migram para a membrana celular através do complexo de Golgi. Durante esta migração para a superfície celular, pE2 é clivado em E2 e E3, as quais estão envolvidas na ligação do receptor e dobramento adequado de pE2, respectivamente. Finalmente, a montagem do vírion é promovida pela ligação do nucleocapsídeo ao RNA viral e pelo recrutamento das glicoproteínas de envelope associadas à membrana (ABDELNABI; NEYTS; DELANG, 2015; GOULD *et al.*, 2010; SCHWARTZ & ALBERT, 2010).

1.4. A FEBRE CHIKUNGUNHA (CHIKF)

1.4.1. Manifestações clínicas

A febre chikungunya (CHIKF) é uma doença febril aguda, na maioria dos casos, associada a sintomas como febre, erupção cutânea e artralgia incapacitante (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). A palavra “chikungunya” significa “aquele que se curva” no dialeto africano Makonde e faz referência à postura encurvada associada à artralgia crônica presente nos pacientes infectados (HER *et al.*, 2009).

Assim como ocorre com outras doenças virais, a infecção por CHIKV pode ser assintomática (cerca de 30% dos indivíduos infectados) ou produzir um espectro variável de manifestações clínicas, desde formas mais leves até condições graves e incapacitantes (CUNHA; TRINTA, 2017). A CHIKF apresenta um período médio de incubação de três dias e duas fases, aguda e crônica, podem ser observadas nessa doença.

Durante a fase aguda, os pacientes podem apresentar febre alta (>39°C), calafrio, cefaleia, náusea, vômito, fadiga, erupções cutâneas eritematosas e maculopapulares (imagem A, figura 6), dor nas costas, mialgia e artralgia simétrica (imagem B, figura 6). Essa última pode ser intensa e, geralmente, afeta as extremidades, principalmente as articulações dos

tornozelos, punhos e falanges. O padrão da artralgia é errático, embora haja uma tendência para que seja mais intensa pela manhã e piore com atividade física mais intensa (CASTRO; LIMA; NASCIMENTO, 2016). Os sinais e sintomas agudos geralmente se resolvem em menos de duas semanas, mas a artralgia pode persistir por mais tempo, sendo este um sintoma clínico que pode distinguir a febre causada pelo CHIKV da infecção pelo vírus da dengue (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015). Quando a dor articular persiste além da fase aguda (3 meses ou mais), tem-se a fase crônica da doença. Nessa, a poliartralgia prolonga-se por semanas a anos e, dessa forma, compromete a qualidade de vida do paciente, bem como gera um grande impacto na sociedade em termos de morbidade e produtividade econômica (BURT *et al.*, 2017).



Figura 5: Sinais da febre chikungunya. Na imagem A, o paciente apresenta, durante a fase aguda da doença, erupções cutâneas eritematosas e maculopapulares, as quais podem envolver mais de 90% da pele. Ainda na fase aguda, os pacientes podem apresentar artralgia simétrica (B), a qual pode persistir por anos. Adaptado de Burt *et al.*, 2017; Calabrese, 2015.

Com relação aos achados laboratoriais, as alterações durante a fase aguda da doença são inespecíficas. Leucopenia com linfopenia menor que $1.000 \text{ células/mm}^3$ é a observação mais frequente. A trombocitopenia inferior a $100.000 \text{ células/mm}^3$ é rara e pode ser um importante fator de distinção da infecção causada pelo *Dengue virus* (DENV). A velocidade de hemossedimentação e a Proteína C-Reativa encontram-se geralmente

elevadas, podendo permanecer assim por algumas semanas. Outras alterações podem ser detectadas, como elevação discreta das enzimas hepáticas ALT e AST, da creatinina e da creatinofosfoquinase. Uma viremia alta é comum em pacientes infectados e variam de 10^8 a 10^{12} cópias de RNA viral/mL por até sete dias após o início dos sintomas clínicos. Os pacientes infectados apresentam níveis de IgG mensuráveis na primeira semana e que perduram anos após a infecção inicial. Além disso, muitos estudos demonstraram níveis persistentes de IgM em pacientes com duração de 18 meses ou mais. Os anticorpos IgM neutralizantes também podem ser encontrados no fluido sinovial dos pacientes três meses após a infecção inicial, o que sugere que a estimulação imune contínua pode desempenhar um papel deletério em alguns casos de artrite prolongada associada ao CHIKV (GOUPIL; MORES, 2016; Ministério da Saúde, 2017).

Embora a CHIKF seja normalmente uma doença autolimitada, os relatos de manifestações graves da doença com complicações têm sido cada vez mais comuns, principalmente nos grupos de risco: neonatos, crianças, idosos, indivíduos imunocomprometidos e pessoas que apresentam comorbidades associadas. As manifestações graves incluem doença gastrointestinal, complicações neurológicas (meningoencefalite e convulsões), complicações oftalmológicas (conjuntivite, retinite e uveíte), doenças cardiovasculares, manifestações hemorrágicas e morte (GOUPIL; MORES, 2016; ROHATGI *et al.*, 2014). O aumento no número de complicações da doença se deve a diversos fatores, como a ocorrência de surtos em grande escala, a melhor adaptação viral aos vetores artrópodes urbanos e às novas mutações das linhagens de CHIKV circulantes que aumentam sua virulência e patogenicidade (SCHWAMEIS *et al.*, 2016).

1.4.2. Imunopatogênese

A infecção pelo CHIKV ocorre a partir da picada do mosquito infectado que inocula o vírus na pele do hospedeiro. O vírus realiza um ciclo de replicação inicial no interior dos fibroblastos dérmicos e então se dissemina

pela corrente sanguínea, atingindo diversos órgãos, como o fígado, músculos, articulações, baço e cérebro, conforme demonstrado na figura 5 (CUNHA; TRINTA, 2017; ROHATGI *et al.*, 2014). Estudos recentes identificaram diferentes tipos de células suscetíveis ao vírus, como as células endoteliais, epiteliais e os fibroblastos (NG, L. F. P., 2017).

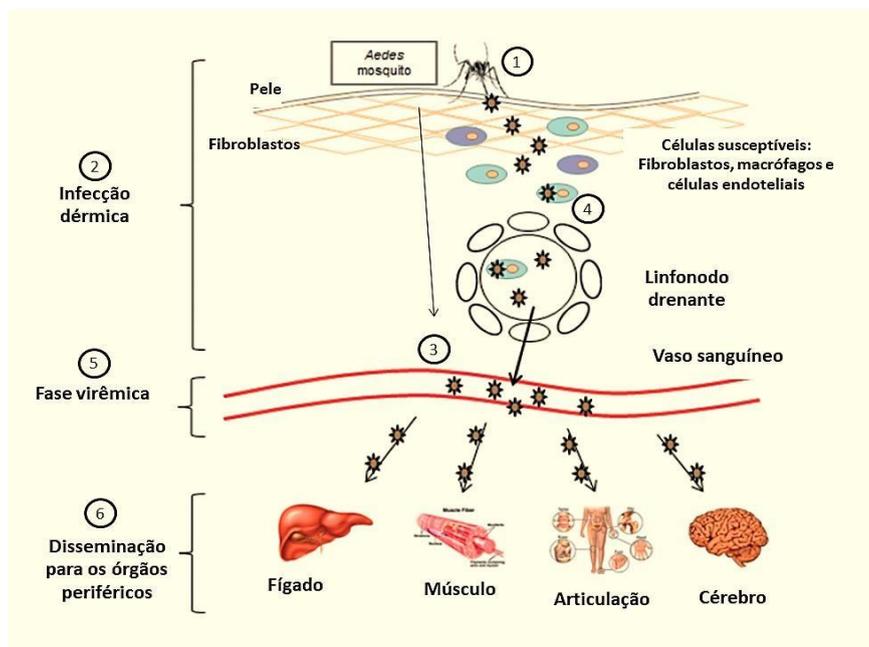


Figura 6: Disseminação do *Chikungunya virus* no hospedeiro. A infecção por CHIKV tem início pela picada de um mosquito infectado que inocula o vírus na derme do hospedeiro (1). Então, ocorre uma replicação inicial do vírus no interior de fibroblastos dérmicos e células residentes (2). A picada do mosquito também pode levar à inoculação direta do vírus na circulação sanguínea (3). O vírus se dissemina para os gânglios linfáticos (4) e, então, é liberado para a circulação sanguínea (5). Finalmente, ocorre a disseminação do vírus para os órgãos periféricos, como fígado, baço, músculo, bem como para o cérebro e articulações (6). Adaptação de CAGLIOTI *et al.*, 2013.

Níveis elevados das citocinas IL-1 β , IL-6 e o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) foram detectados no soro de pacientes infectados na fase aguda e retornaram à normalidade após a diminuição da febre e da viremia. Essas citocinas pirogênicas contribuem para a febre presente na fase aguda da doença (HOARAU, J. J. *et al.*, 2010). Entretanto, diferentes coortes de pacientes exibem padrões de mediadores inflamatórios distintos, sugerindo que

os níveis basais desses mediadores diferem entre as populações. Especificamente, as citocinas pró-inflamatórias, Interferon α (IFN- α), IL-6 e CCL2, estão elevadas durante a fase aguda da doença em várias coortes de pacientes (NG, L. F. P., 2017). Ainda, a expressão de IL-6 e CCL2 foi correlacionada com alta carga viral em pacientes infectados com CHIKV. Por fim, a IL-6 e o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos de Granulócitos (GM-CSF) também foram associados à artralgia persistente (CHOW *et al.*, 2011).

Uma meta-análise comparativa demonstrou que as citocinas pró-inflamatórias, incluindo 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; as quimiocinas CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL3, CCL4; e o GM-CSF, e o Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (FGF) formam uma assinatura genérica da infecção aguda por CHIKV em todas as coortes de pacientes do mundo (TENG *et al.*, 2015). Esses biomarcadores são consistentes durante a patogênese da doença e definir os subconjuntos imunes específicos envolvidos nesse processo pode levar ao desenvolvimento de terapias que reduzem a gravidade da doença e sua progressão (NG, L. F. P., 2017).

Estudos demonstram que os fibroblastos são suscetíveis à replicação primária pelo CHIKV e que os monócitos e os macrófagos são os principais subconjuntos hematopoiéticos associados à infecção sistêmica pelo CHIKV em pacientes e em modelos animais. Além disso, a CCL2, um quimioatraente de monócitos/macrófagos, está associada à fase aguda da infecção por CHIKV em pacientes e camundongos (HOARAU *et al.*, 2010; NG, L. F. P., 2017). Em modelos experimentais, a inibição de CCL2 utilizando o fármaco Bindarit, resultou em melhora significativa do quadro da doença, diminuição de danos nos tecidos e menor recrutamento de células inflamatórias no sítio da lesão após a infecção pelos *Alphavirus Ross River* (RRV) e CHIKV (RULLI *et al.*, 2009, 2011). Os osteoblastos também foram demonstrados ser alvo para a infecção pelo CHIKV, o que resultou em um processo de osteoclastogênese com consequente erosão óssea, indicando a importância dessas células na patologia induzida por alfavírus (CHEN *et al.*, 2014). Um modelo utilizando este mesmo fármaco, o Bindarit, demonstrou que a inibição de CCL2 reduz

significativamente a perda óssea induzida pela infecção por CHIKV, o que sugere que essa quimiocina está também envolvida no processo de osteoclastogênese (CHEN *et al.*, 2015). Apesar dos trabalhos acima terem demonstrado um efeito protetor decorrente da inibição da CCL2, outro modelo demonstrou que a infecção por CHIKV de camundongos deficientes para o receptor de CCL2, o CCR2 (CCR2^{-/-}), resultou em uma artrite mais grave, prolongada e erosiva, sem efeito sobre a replicação do vírus (POO *et al.*, 2014). Coletivamente, esses dados sugerem que monócitos e macrófagos representam os subtipos celulares associados à disseminação do vírus, bem como um reservatório celular para infecção persistente do CHIKV em mamíferos.

Outro estudo demonstrou que em pacientes infectados, as células *Natural Killer* (NK) são fortemente ativadas nos primeiros dias pós-infecção e induzem uma resposta secundária de células T CD4⁺ e CD8⁺ mais sustentável contra várias proteínas virais (HOARAU, J. *et al.*, 2013). Ainda foi demonstrado que a resposta imune inata é seguida pela indução da imunidade adaptativa, através da ativação e proliferação de células T CD8⁺, nos estágios iniciais da doença (SOURISSEAU *et al.*, 2007). As células T desempenham um importante papel durante a infecção viral, sendo as células T CD4⁺ e CD8⁺ necessárias para eliminar células infectadas por vírus em camundongos (NG, L. F. P., 2017). As células T CD4⁺ aparecem na fase tardia da doença e auxiliam na produção de imunoglobulinas (Igs) específicas contra o vírus (NG, L. F. P., 2017). Ainda, a IL-17, uma citocina produzida por células T (Th17), foi detectada em pacientes infectados com CHIKV em várias coortes (CHOW *et al.*, 2011). Essa, por sua vez, está associada com a patogênese de outras infecções causadas por alfavírus (KULCSAR *et al.*, 2014), bem como na artrite reumatóide (KOTAKE *et al.*, 1999), entretanto o seu papel durante a infecção pelo CHIKV permanece obscuro.

O fim da fase aguda é caracterizado pela produção dos mediadores inflamatórios tais como o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), CCL4, CXCL12 e IL-6 e IL-8. Os níveis de CCL5 também estavam elevados em todos os pacientes durante a primeira semana após o início dos sintomas. Um estudo demonstrou que os mediadores CCL5, CCL2, CXCL10, CCL4 e IL-8

são produzidos por macrófagos ativados que são suscetíveis à infecção por CHIKV. Essas quimiocinas exercem papel importante no recrutamento de leucócitos para locais de infecção, além de influenciar na montagem de defesas com atividade antiviral (WEAVER *et al.*, 2012).

1.4.3. Diagnóstico, tratamento e prevenção

O diagnóstico da CHIKF, em pacientes com quadro clínico sugestivo da doença, se dá pela confirmação laboratorial da infecção, seja pela sorologia, PCR em tempo real (RT-PCR) ou isolamento viral. Os testes sorológicos permitem a detecção de anticorpos específicos do tipo IgM, que podem ser detectados a partir do segundo dia após o aparecimento dos sintomas, e do tipo IgG a partir do sexto dia (Ministério da Saúde, 2017).

Até o momento, não há tratamento antiviral específico para a febre Chikungunya. A terapia utilizada é de suporte sintomático, com a utilização de anti-inflamatórios, hidratação e repouso. Como medida não farmacológica, recomenda-se a utilização de compressas frias nas articulações acometidas para alívio da dor, bem como realização de fisioterapia (Ministério da Saúde, 2017).

Com relação à prevenção da doença, as únicas medidas realmente efetivas consistem em proteção individual contra picada de mosquitos e o controle da disseminação dos vetores, uma vez que ainda não existem vacinas disponíveis no mercado. Para a proteção individual, é recomendado o uso de repelentes e também a utilização de roupas que minimizem a exposição da pele aos vetores diurnos, ou mosquiteiros, a noite. Já para o controle de vetores, recomenda-se combater os focos de acúmulo de água em diversos recipientes (latas, copos plásticos, pneus velhos, vasos de plantas, garrafas, caixas d'água e lixeiras), os quais são locais propícios para a criação do mosquito transmissor (GALÁN-HUERTA *et al.*, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Os dados epidemiológicos da infecção pelo CHIKV no Brasil são alarmantes e, juntamente com a dengue, colocam a febre Chikungunya como uma das arboviroses mais importantes que acometem o homem na atualidade. Essa emergência se deve principalmente a elevada taxa de morbidade da população acometida, devido à indução da artralgia crônica persistente nestes pacientes, o que resulta em uma redução da produtividade da população trabalhadora, queda massiva da qualidade de vida dos indivíduos acometidos e grande impacto econômico aos órgãos públicos de saúde. O tratamento da doença é limitado, visto que ainda não existem fármacos específicos e/ou vacina aprovada. Normalmente, o tratamento é de suporte sintomático, com uso de medicamentos anti-inflamatórios, hidratação e repouso. Com relação à forma de prevenção, assim como nos casos da infecção pelo DENV e pelo ZIKV, o método mais eficaz consiste em evitar a propagação do mosquito vetor.

Estudos recentes têm sido conduzidos em sistemas *in vivo* e *in vitro* visando elucidar a fisiopatologia da infecção pelo CHIKV, a exemplo do tropismo viral, perfil de replicação viral, células e mediadores inflamatórios envolvidos na resposta do hospedeiro frente à infecção, nas duas fases da doença. Contudo, diversas questões envolvendo a interação vírus-hospedeiro permanecem por ser esclarecidas. Tal entendimento passa, pelo menos em parte, pelo desenvolvimento de modelos experimentais *in vivo* que permitam o estudo da interação CHIKV-hospedeiro. Neste contexto, modelos murinos representam uma boa ferramenta para se atingir tais objetivos, uma vez que apresentam um custo relativamente baixo, além de permitir a alteração genética, construção de animais *knockout* para gene específicos, os quais permitem a avaliação do papel de moléculas ou vias específicas do hospedeiro durante a infecção e também avaliar a eficácia de potenciais vacinas e terapias.

Deste modo, levando em consideração a importância de se compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na infecção pelo CHIKV (a) e ainda, o limitado número de trabalhos na literatura envolvendo tal questão (b), torna-se plausível propor a padronização de um modelo murino de infecção pelo CHIKV

em nosso laboratório que nos permita estudar mecanismos associados a patogênese da doença, bem como avaliar possíveis alvos terapêuticos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo experimental de infecção pelo *Chikungunya virus* (CHIKV) em camundongos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Definir o inóculo viral a ser utilizado no modelo experimental

- Avaliar a capacidade do CHIKV de induzir hipernocicepção articular inflamatória em camundongos selvagens da linhagem C57/BL6j.

2 – Caracterizar os parâmetros de doença e resposta inflamatória em camundongos selvagens C57BL/6j com o inóculo pré-definido no objetivo específico 1

- Avaliar os sinais clínicos (hipernocicepção, perda de peso corporal e edema plantar), hematológicos (contagem total e diferencial de leucócitos no sangue, hematócrito e número de plaquetas) nos animais controles e infectados durante a cinética de infecção pelo CHIKV;
- Quantificar o infiltrado de neutrófilos e macrófagos no coxim plantar, quadríceps, baço e fígado dos animais infectados através do ensaio indireto da atividade da mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG), respectivamente;
- Quantificar os níveis das citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, RANKL, OPG) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL-2, CXCL-9 e CXCL-10) no coxim plantar, quadríceps, soro e baço dos animais controles e infectados durante a cinética de infecção pelo CHIKV;
- Quantificar o nível da transaminase hepática ALT no soro dos animais controle e infectados pelo CHIKV;
- Avaliar os níveis de anticorpos séricos IgM e IgG específicos durante a cinética de infecção pelo CHIKV;

- Quantificar a carga viral viável em diversos tecidos durante a cinética da infecção pelo CHIKV;
- Realizar a análise histopatológica das articulações do tornozelo e do joelho durante a cinética da infecção;
- Avaliação das habilidades motoras (teste de rotaroad), de locomoção (campo aberto) e sensibilidade térmica (placa quente) dos camundongos controle e infectados durante a cinética de infecção pelo CHIKV.

3. - Avaliar a participação do receptor de interferon do tipo I (IFN α / β R) na patogênese da infecção por CHIKV

- Verificar a participação das citocinas IFN α e IFN β , através do uso de animais deficientes em seu receptor, durante a infecção pelo CHIKV. Os mesmos parâmetros descritos no objetivo específico 2 serão avaliados.

4. METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos do tipo “selvagem” (WT) da linhagem C57BL/6j com oito ou quatro semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Além disso, foram utilizados camundongos da linhagem SV129 com oito semanas, WT ou deficientes para os receptores de IFN α/β (IFN α/β R^{-/-}), os quais foram adquiridos do Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas, ração e água sem restrições. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 230/2017 (ANEXO 1).

4.2. VÍRUS

Neste trabalho foram utilizadas duas linhagens do CHIKV. A primeira linhagem consiste em um isolado *La Reunion* gentilmente cedida pelo Prof. Suresh Mahalingam da Universidade de Gamberra na Austrália. Já a segunda é uma linhagem Asiática isolada de uma amostra clínica de um paciente virêmico, a qual foi gentilmente cedida pelo Prof. Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, sob número de acesso BHI3762/H 804917.

4.3. PROPAGAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO VÍRUS

O CHIKV foi propagado em células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0343

mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), com atmosfera umidificada a 37°C na presença de meio de cultivo Leibowitz L-15 suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 2% Soro Fetal Bovino – por 5-7 dias.

Os sobrenadantes obtidos das culturas infectadas foram centrifugados a 600g por 10min para retirada dos fragmentos celulares. Subsequentemente, o sobrenadante foi adicionado na coluna de concentração viral (Vivacell 100 centrifugal concentrator – Sartorius, Alemanha) e as partículas virais foram concentradas pelo auxílio de centrifugação (2000g por 10 min). O volume que ultrapassou a membrana foi descartado e o sobrenadante que permaneceu no concentrador foi aliquotado e armazenado em freezer -80°C para uso posterior. O título viral, expresso em unidades formadoras de placa (PFU)/mL, das amostras foi obtido através do ensaio de formação de placas em células permissivas da linhagem VERO, como descrito no ITEM 4.5.

4.4. ESQUEMAS DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.4.1. Tópico 1 – Definir o inóculo viral a ser utilizado no modelo experimental

A avaliação de hipernocicepção foi o primeiro parâmetro a ser realizado, visto que se trata do principal fator incapacitante dos indivíduos acometidos pela febre Chikungunya. A partir dos resultados deste experimento, definimos o inóculo capaz de causar níveis aumentados de hipernocicepção articular inflamatória nos animais, o qual foi utilizado nos experimentos subsequentes.

Para tanto, camundongos selvagens da linhagem C57BL/6j com 8 semanas de idade receberam três inóculos diferentes, baseado na literatura: $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ PFU/animal/50 μ L por via intraplantar (i.pl.). Em seguida, a hipernocicepção foi avaliada em diversos dias (figura 7) durante 30 dias através do teste de medida de pressão eletrônica modificado para camundongos (Von Frey eletrônico), conforme ilustrado na figura 7.

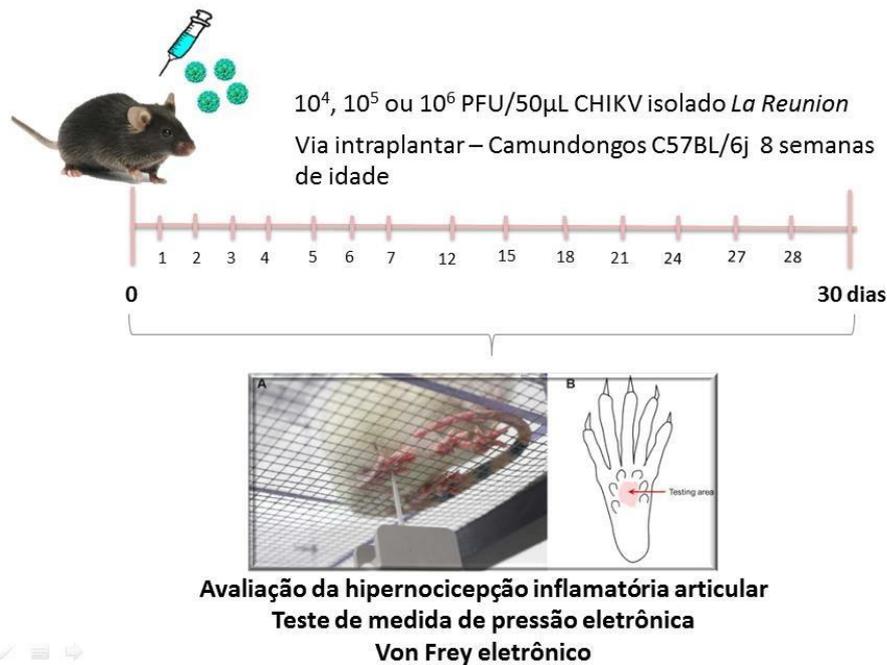


Figura 7: Protocolo experimental para a avaliação da hipernociceção articular inflamatória em camundongos infectados pelo CHIKV.

Uma vez definido o melhor inóculo, foi realizada uma cinética de infecção para avaliar os parâmetros de doença e inflamatórios, como descrito no tópico 2.

4.4.2. Tópico 2 – Caracterizar os parâmetros de doença e a resposta inflamatória em camundongos selvagens da linhagem C57BL/6j infectados pelo CHIKV

Neste protocolo, os camundongos receberam o inóculo pré-estabelecido no tópico I (1,0x10⁶ PFU/animal/50µL i.pl.) e, em seguida, foram eutanasiados em diferentes momentos após a infecção (dias 1, 3, 7 e 14 dias p.i) para a avaliação dos parâmetros clínicos e inflamatórios (Figura 8). Para a eutanásia e coleta das amostras, os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p.) com 100µL de uma solução de ketamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) diluída em PBS. Foi realizada uma laparotomia mediana para a coleta de sangue do animal pela veia cava inferior e obtenção do

sangue e do soro para realização das análises hematológicas. Em seguida, foi feito o deslocamento cervical do animal para coleta dos tecidos, tais como o baço, fígado, cérebro, pata, joelho, quadríceps (QD), linfonodo poplíteo (LNP), nervo ciático e gânglio da raiz dorsal (DRG) para posterior dosagem de mediadores inflamatórios, ensaio de NAG e MPO, análise histopatológica e titulação viral. Cada uma das amostras foi mantida em suas respectivas condições de armazenamento até a análise.

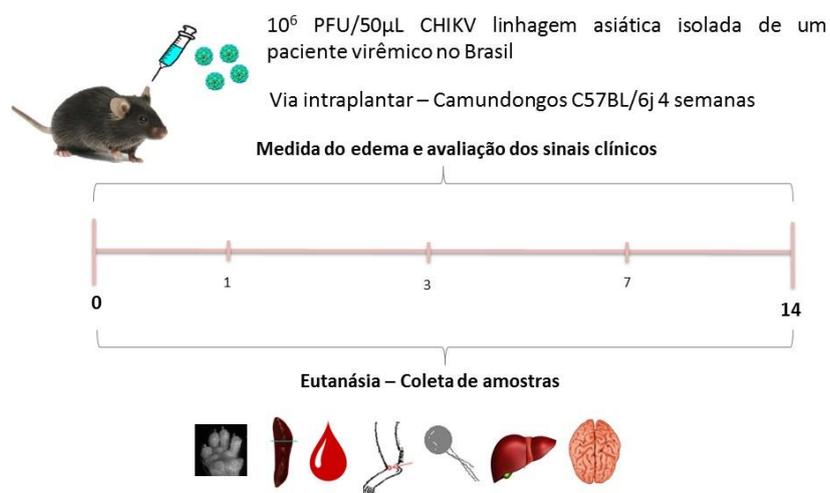


Figura 8: Protocolo experimental para a avaliação dos parâmetros clínicos e da resposta inflamatória em camundongos infectados pelo CHIKV.

Paralelamente, os camundongos receberam o inóculo pré-estabelecido de $1,0 \times 10^6$ PFU/animal/50μL i.pl. e foram acompanhados durante os mesmos tempos p.i para a avaliação comportamental. A avaliação motora (medida de força muscular) foi realizada por meio do teste de Rota Rod, a avaliação locomotora por meio do teste de campo aberto e, por fim, a avaliação sensorial por meio do teste de placa quente. Todas as metodologias dos testes citados acima estão descritas no item 4.19.

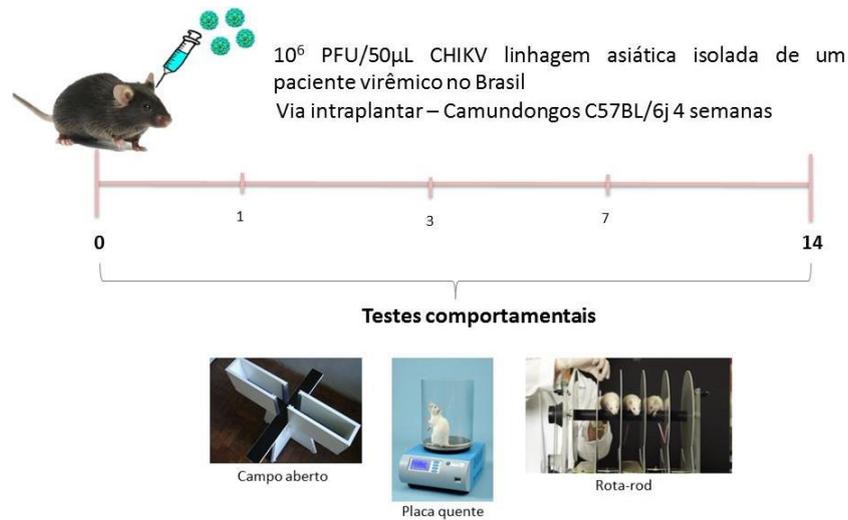


Figura 9: Protocolo experimental para a avaliação comportamental dos camundongos infectados pelo CHIKV.

4.4.3. Tópico 3 – Avaliar a participação do receptor de Interferons do tipo I (IFN α / β R) na patogênese da infecção causada pelo CHIKV

Neste protocolo, os animais da linhagem SV129 (WT) ou deficientes para o receptor de IFN α / β (IFN α / β ^{-/-}), receberam três inóculos diferentes do CHIKV (1X10², 1X10³ ou 1X10⁴ PFU/animal/50µL i.pl.) e foram acompanhados diariamente para a avaliação da letalidade e perda de peso corporal. Uma vez definido o melhor inóculo capaz de induzir perda de peso gradual e doença nos animais, foi realizado um segundo experimento para a retirada de diversos órgãos, conforme descrito na figura 10, e realizada posterior avaliação dos parâmetros inflamatórios e recuperação da carga viral.

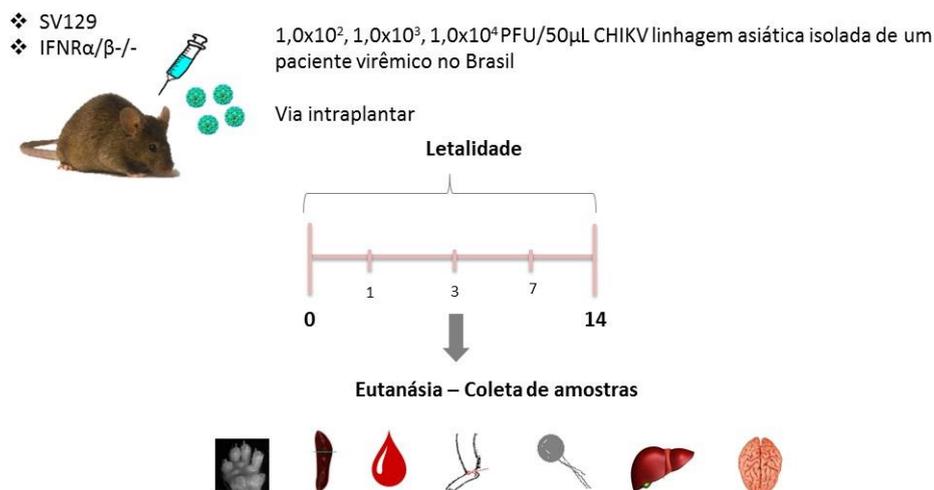


Figura 10: Protocolo experimental para a avaliação da letalidade e parâmetros inflamatórios/recuperação da carga viral em camundongos infectados pelo CHIKV.

4.5. DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL

Para determinar a carga viral nos estoques virais e nas amostras de soro e tecidos dos camundongos infectados pelo CHIKV, foi empregada a técnica de titulação viral por ensaio de formação de placas de lise como descrito por BAER & KEHN-HALL, 2014.

Brevemente, células da linhagem VERO (células derivadas de rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) também provenientes do BCRJ sob numero 0245 foram crescidas em meio RPMI 1X, suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino. As células foram tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placas de 6 ou 12 poços a uma densidade de 1X10⁶ células/poço e 5X10⁵ células/poco, respectivamente. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de 24 horas, quando seus poços apresentavam uma monocamada de células com uma confluência de 85 a 90%.

Os estoques virais e as amostras de soro obtidas dos camundongos infectados foram diluídos serialmente em meio RPMI. As amostras de baço,

fígado, coxim plantar, quadríceps e cérebro foram pesadas, maceradas com auxílio de gral e pistilo de porcelana estéreis e diluídas serialmente, seguindo a proporção de 10% peso/volume, em meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB. As amostras de LNP, nervo ciático e DRG foram maceradas entre lâminas estéreis e diluídas em 500 μ L de meio RPMI. A cada poço de uma placa foi adicionado 400 μ L (para placa de 6 poços) ou 300 μ L (para placa de 12 poços) de cada uma das diluições (10^{-2} a 10^{-7}) de uma dada amostra (tecido) ou diluições de (10^{-2} a 10^{-4}) para o soro. O controle de células foi um poço não inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB nos mesmos volumes. As placas foram incubadas por um período de uma hora a 37°C (período de adsorção viral) durante o qual foram gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com meio RPMI. Em seguida, foi adicionado meio DMEM contendo 1.6% de carboximetilcelulose, antibióticos e 2% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por quatro dias, período no qual os efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio invertido. Após este período, as mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em H₂O deionizada, para a determinação do título das amostras, os quais foram expressos em PFU/g ou PFU/mL (Unidades Formadoras de Placa).

4.6. MEDIDA DO EDEMA PLANTAR

Com a utilização de um paquímetro, foi realizada a medida do edema plantar após a infecção pelo CHIKV. As medidas foram realizadas previamente à injeção intraplantar do vírus, para obtenção dos níveis basais de cada animal, e, então, diariamente até o término do experimento (14º dia). A medida do volume da pata foi realizada sempre duas vezes pelo mesmo operador e a média destes valores foi utilizada para a computação dos dados. O aumento no volume da pata foi calculado através da subtração do volume inicial dos valores

(antes da infecção) pelo volume da pata medido em cada ponto após a infecção e foi expresso como Δ do volume da pata (mm). Para controle do experimento, foram utilizados camundongos que receberam injeção via ipl. contendo apenas PBS.

4.7. MEDIDA DA HIPERNOCICEPÇÃO ARTICULAR INFLAMATÓRIA

A avaliação de hipernocicepção, ou medida de dor em animais de experimentação, foi realizada por teste de medida de pressão eletrônica modificado em camundongos, como descrito por (SACHS *et al.*, 2011). Resumidamente, os camundongos foram colocados em caixas de acrílico sobre uma tela de suporte metálica pelo período de 15 a 30 minutos (período de adaptação). Neste experimento foi utilizado um medidor de pressão eletrônico que visa avaliar a transmissão do estímulo através de um sensor (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O teste consistiu na aplicação de uma ponteira romba de 0,5mm² na parte posterior da pata dos animais infectados pelo CHIKV ou nos animais controle (PBS), onde a força perpendicular aplicada na área central da superfície plantar induziu a flexão da articulação do joelho seguido da resposta de retirada da pata pelo animal. A intensidade da pressão foi automaticamente recordada pelo sensor e os valores para a resposta foram obtidos após três medidas, antes e após a infecção de cada animal individualmente. A hipernocicepção articular inflamatória foi avaliada diariamente após a inoculação do CHIKV. Os resultados foram expressos em média e calculados subtraindo-se o tempo zero da medida (antes da infecção) e as medidas nos intervalos de tempos após a infecção, e expressos como Δ da hipernocicepção, como descrito por Costa e colaboradores (CUNHA *et al.*, 2004).

4.8. ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Amostras de sangue foram obtidas diretamente da veia cava inferior dos animais, coletadas em tubos heparinizados e posteriormente separadas para contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, hematócrito e coleta do soro. Para contagem total, amostras de sangue foram diluídas em solução de Turk a uma proporção de 1:40, contadas em câmara de Neubauer e o resultado foi expresso em número total de leucócitos/mL de sangue. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em lâminas contendo esfregaço sanguíneo, coradas com Kit Panótico, e o resultado expresso em % do número total de cada tipo celular, corrigido proporcionalmente ao resultado de contagem total da amostra. Para a contagem de plaquetas, parte do sangue coletado foi diluído na proporção de 1:100 em solução de oxalato de amônio 1% p/v e deixado em repouso em câmara de Neubauer por no mínimo 15 min. Após a deposição das plaquetas, a contagem foi feita ao microscópio e o resultado expresso em número total de plaquetas/ μ L de sangue. Foi utilizado o microscópio Nikon XP-1000 para todos os procedimentos de contagem de leucócitos e plaquetas. A mensuração do índice de hematócrito foi realizada utilizando capilares heparinizados (Perfecta) para microhematócrito. Capilares contendo sangue foram centrifugados em centrífuga apropriada (Centrifuge hematocrit HT) por 10min e o resultado expresso em porcentagem referente à fração celular do sangue: Fração vermelha (concentração de elementos do sangue) e branca (concentração de plasma), através de uma regra de três simples:

$$\text{Fração branca + vermelha} = 100\%$$

$$\text{Fração vermelha} = X$$

Por fim, o restante de sangue de cada amostra foi centrifugado para separação e coleta de soro (1200g por 10 minutos). Posteriormente, o soro foi dividido em dois tubos, sendo um para quantificação da carga viral (armazenado a -80°C) e o segundo para demais análises (armazenado a -20°C).

4.9. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Para dosagem das citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ RANKL, OPG) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL-2, CXCL-9 e CXCL-10), fragmentos de tecidos (coxim plantar, quadríceps e baço) foram homogeneizados em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1mM *phenylmethanesulfonyl fluoride*; 0,1mM *benzethonium chloride*; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% *Tween 20*, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução; utilizou-se um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) a -20°C, para posterior análise.

As amostras de soro e tecidos foram analisadas na diluição 1:2 para citocinas e 1:3 para quimiocinas em PBS contendo 0,1% de albumina bovina, como previamente padronizado em nosso laboratório. Foram utilizados kits de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), sendo que a sensibilização ocorreu durante 18h a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, 25 EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18h. Os poços foram então lavados e o anticorpo de detecção adicionado pelo período de 2h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem – 1:4000) e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihidrocloride – Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm. Os ensaios apresentaram uma sensibilidade de 8-16pg/ml.

4.10. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS IgM e IgG

A determinação de anticorpos anti-CHIKV IgM ou IgG específicos após a infecção pelo CHIKV foi realizada de maneira semelhante à descrita em (COSTA e colaboradores., 2014). Brevemente, o mesmo isolado viral (CHIKV Brasileiro) utilizado nas infecções experimentais foi plaqueado em placas de 96 poços a uma concentração de $1,0 \times 10^5$ PFU por poço, inativados por luz UV por 30min e incubados por aproximadamente 18 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3x com PBS 1X e os poços bloqueados com solução de albumina bovina 1% em PBS por duas horas e subsequentemente lavadas. Em seguida, as amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:100, plaqueadas em duplicata e incubadas por 3 horas. Após nova lavagem, o anticorpo anti-IgM ou anti-IgG conjugado à peroxidase foi adicionado e as placas incubadas por mais duas horas. A reação foi revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma-Aldrich, EUA) e interrompida com H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil), com filtro para um comprimento de onda de 492nm, e os resultados expressos em densidade óptica (OD).

4.11. DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS (MPO)

O acúmulo de neutrófilos nos tecidos foi avaliado pelo ensaio indireto através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, fragmentos do baço, fígado cérebro, coxim plantar e quadríceps dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20 °C. Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO₄; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução

contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em tampão Na_3PO_4 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 3000g e os sobrenadantes coletados. As amostras dos tecidos de camundongos SV129 (WT ou $\text{IFNR}\alpha/\beta^{-/-}$) foram diluídas previamente à análise em tampão Na_3PO_4 0,05 M na razão de 1:10 para o baço, 1:3 para o fígado e sem diluir para coxim plantar, quadríceps e cérebro.

A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450nm) usando *tetramethylbenzidine* (1.6mM) e H_2O_2 (0.5mM) para a medição das alterações da densidade óptica (OD). Os resultados foram expressos como unidade relativa comparados com neutrófilos de camundongos não infectados. Uma curva padrão do número de neutrófilos *versus* OD foi previamente obtida pelo processamento de neutrófilos purificados do peritônio de camundongos com padronizado anteriormente por Souza e colaboradores., 2004.

4.12. DETECÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS (NAG)

O acúmulo de macrófagos foi avaliado pelo ensaio da quantificação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Fragmentos do baço, fígado, cérebro, coxim plantar e quadríceps dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2 mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO_4 ; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução)

seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspenso em solução salina 0,9%/Triton x-100 0,1% v/v e re-homogeneizado. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000g e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Alíquotas de 100µL da suspensão foram transferidas para placas de 96 poços, em duplicata e 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosiminida) e manter a 37°C. Após 10 minutos, adicionou-se a solução 100µL de tampão glicina 0,2 M e a atividade da NAG foi determinada através de leitor de ELISA (400nm). Os resultados foram expressos como densidade óptica (OD).

4.13. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DA TRANSAMINASE HEPÁTICA ALT

O sangue de animais não infectados e infectados foi coletado pela veia cava inferior, colocado em tubos heparinizados, centrifugados 1200g por 10 minutos para obtenção do soro. A dosagem da transaminase hepática ALT no soro foi realizada através de teste colorimétrico utilizando o Kit K034 da Bioclin/Quibasa. A leitura foi realizada em leitor de ELISA no comprimento de onda de 530nm. Os resultados foram expressos como unidades por litro (U/L).

4.14. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

O membro inferior direito de camundongos, contendo o músculo quadríceps, joelho e o tornozelo, foi coletado ao longo da cinética da infecção e fixado em formol 10%v/v por no mínimo 2 dias. Em seguida, os tecidos permaneceram em uma solução de EDTA 14%p/v, durante aproximadamente 40 dias, com troca da solução a cada 3 dias, para a sua desmineralização. Uma vez desmineralizados, os tecidos foram processados, incluídos em parafina, cortados, montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) ou com Azul de Toluidina (AT) como descrito por Costa e colaboradores (2015). Foram avaliados os seguintes parâmetros nos cortes corados por H&E:

a gravidade da hiperplasia sinovial (0: sem alterações; 1: hiperplasia focal; 2: hiperplasia extensa; 3: hiperplasia generalizada), intensidade de infiltrado inflamatório (0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso; 4: generalizado), hiperemia (0: ausente; 1: presente), presença de células inflamatórias no espaço sinovial (0: ausente; 1: presente), perda da arquitetura tecidual (0: ausente; 1: presente), hiperplasia da medula óssea (0: ausente; 1: presente) e erosão dos ossos para verificar sinais de artrite (0: ausente; 1: lacunas de reabsorção escassas; 2: áreas significativas de reabsorção óssea). Após a análise, as pontuações foram somadas, podendo totalizar 13 pontos. Já nos cortes corados com o AT, verificou-se a presença de proteoglicanos nas cartilagens articulares. A quantificação da perda ou não de proteoglicanos foi efetuada pela avaliação da porcentagem da área corada por AT em relação à superfície total da cartilagem avaliada usando o software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), como descrito por Queiroz-Junior e colaboradores (2011).

Amostras de fígado de camundongos foram coletadas em tempos específicos (3 e 5 dias pi). Posteriormente, foram imediatamente fixadas em 10% de formalina tamponada durante 24 horas, processadas, incluídas em parafina, cortadas, montadas em lâminas, coradas com H&E e avaliadas sob um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Goettingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão). A pontuação histopatológica foi realizada a partir da avaliação do inchaço, degeneração, necrose e hemorragia dos hepatócitos (0: ausente; 1: mínimo; 2: leve; 3: moderado ; 4: marcado e 5: grave).

4.15. TESTES COMPORTAMENTAIS

4.15.1. Rota Rod

A força muscular e capacidade locomotora dos animais foram avaliadas por meio do teste de Rota Rod (teste de função motora), assim como descrito por Rozas e colaboradores (1997). Brevemente, o aparelho de Rot Rod consiste de um cilindro distante 7cm da superfície de apoio, movido por um

motor, que gira a diferentes velocidades determinadas pelo operador (no total, 4 diferentes velocidades ao longo do teste). A capacidade motora (força muscular e locomoção) foi quantificada cronometrando-se o tempo de permanência do camundongo sobre o cilindro (latência). Durante o estudo, os animais foram submetidos a um período de treinamento de três dias seguido da avaliação da medida basal no quarto dia e, por fim, às avaliações posteriores após a cinética de infecção pelo CHIKV. Foram avaliados os dias 1, 3, 7 e 14 após a infecção.

4.15.2. Placa quente

A sensibilidade nociceptiva dos animais foi avaliada através do teste de placa quente, como descrito por Woolfe & Macdonald (1944). O teste avalia o tempo em que os animais levam para responder ao estímulo térmico (chapa metálica aquecida a $50 \pm 0,5$ °C) através do comportamento de levantar ou lambe as patas. As aferições foram realizadas antes da infecção (basal) e nos tempos de 1, 3, 7 e 14 dias após a infecção pelo CHIKV.

4.15.3. Campo aberto

A avaliação da atividade locomotora espontânea dos camundongos foi realizada através do teste de campo aberto (MARTIN & HALL, 1941). A movimentação do animal foi monitorada por meio de uma câmera de vídeo em um espaço circular determinado pelo período de 10min. Brevemente, o campo aberto consiste de uma arena circular com 50cm de diâmetro, fechada com paredes de 40cm localizada em uma sala isolada. Individualmente, cada camundongo foi colocado no centro da arena, durante uma sessão única. A distância percorrida foi analisada automaticamente pelo software Any-maze® (Stoelting Company, EUA). Foram avaliados os dias 1, 3, 7 e 14 após a infecção.

4.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão médio (EPM) por grupo de 3 (linhagem SV129) ou 5 (linhagem C57BL6j) animais, assim como definido no cálculo amostral aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico (MAN-WHITNEY) ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para a realização de todas as análises, utilizou-se o software GraphPad PRISM (GraphPad Software, EUA). Os níveis de significância foram estabelecidos em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. TÓPICO 1 – Definir o melhor inóculo viral a ser utilizado no modelo experimental

Para o desenvolvimento do modelo proposto, definimos primeiramente o inóculo a ser utilizado através da avaliação da hipernociceção articular inflamatória. Para tanto, animais da linhagem C57BL/6j, machos, com 8 semanas de idade, foram infectados com diferentes inóculos do CHIKV pela via i.pl. Estes animais foram monitorados quanto à hipernociceção articular inflamatória por um período de 30 dias (Figura 11). A medida de nociceção desses animais foi iniciada 1 dia antes da infecção para a obtenção dos valores basais de resposta de cada animal e nos dias subsequentes à infecção a partir do 1º dia.

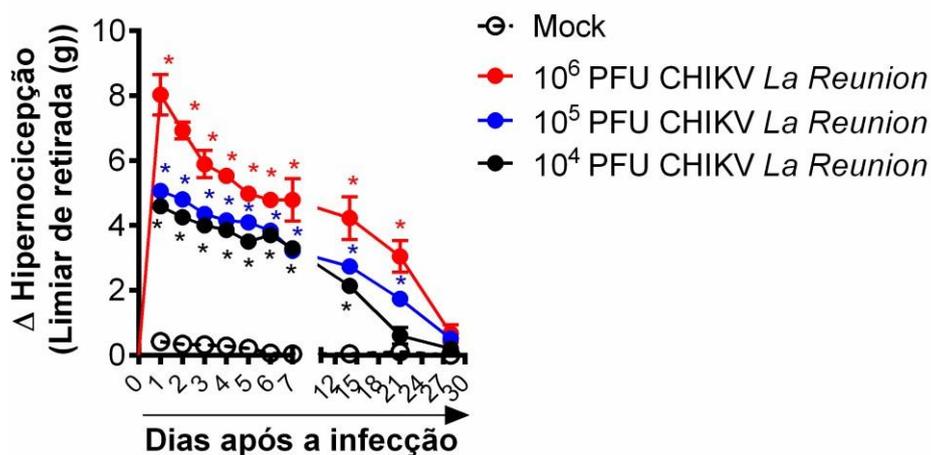


Figura 11: A infecção i.pl. de CHIKV induz hipernociceção articular inflamatória prolongada em camundongos. Os camundongos da linhagem C57/BL6j foram infectados com CHIKV *La Reunion* pela injeção i.pl. de 10⁴, 10⁵ e 10⁶ PFU/50μL em PBS e a hipernociceção foi avaliada durante 28 dias. Os camundongos controle (Mock) receberam injeção i.pl. de PBS e foram igualmente avaliados durante todo o período. Os grupos foram de 5 animais. * para p < 0,05 quando comparados com os animais controle não-infectados (NI).

Nossos resultados demonstraram que a infecção i.pl. pelo CHIKV induz hipernocicepção articular inflamatória em todos os inóculos a partir do 1º dia. Para o inóculo de 10^4 PFU/animal, a hipernocicepção se estendeu até o 14º dia, retornando aos níveis basais no 21º dia, enquanto para os outros inóculos (10^5 e 10^6 PFU/animal) esta manifestação clínica perdurou até o 21º dia e retornou aos níveis basais no 28º dia. Os animais não infectados demonstraram medidas similares aos valores basais durante todo o período avaliado.

Ainda, foi possível perceber que o inóculo de 10^6 PFU/animal induziu uma resposta hipernociceptiva mais acentuada quando comparado com os demais. Diante disso, nós decidimos utilizar o inóculo de 10^6 PFU/animal para a execução dos experimentos subsequentes que objetivaram avaliar a resposta inflamatória e parâmetros de doença neste modelo experimental.

5.2. TÓPICO 2 – Caracterizar os parâmetros de doença e resposta inflamatória em camundongos adultos selvagens da linhagem C57BL/6j

5.2.1. A infecção i.pl. pelo CHIKV não induz perda de peso corporal e edema de pata nos camundongos.

As alterações no edema plantar e peso corporal de camundongos infectados pelo CHIKV foram avaliadas durante 30 dias, conforme demonstrado na figura 12.

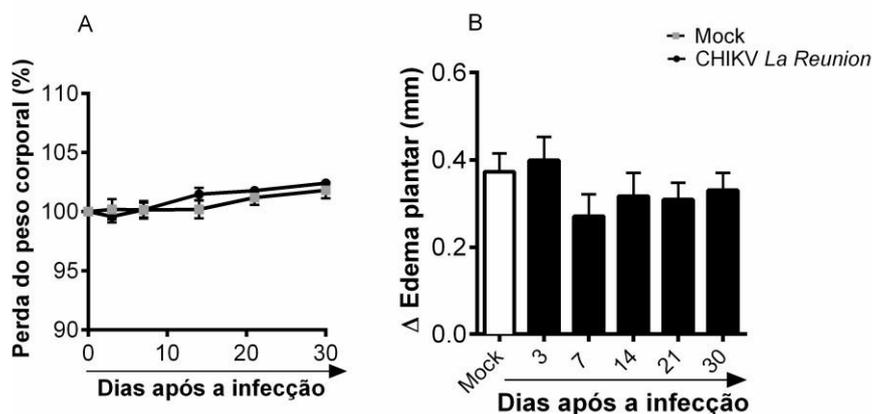


Figura 12: A infecção i.pl. pelo CHIKV não altera peso corporal e edema de pata nos camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV *La Reunion* pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS. Os parâmetros clínicos (A) peso corporal e (B) edema de pata foram avaliados por até 30 dias. Camundongos controle (Mock) receberam injeção intraplantar de PBS e foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

Nossos resultados demonstraram que durante o curso da infecção, os animais não apresentam perda de peso corporal (Figura 12 – A), bem como edema de pata (Figura 12 – B).

5.2.2. Os camundongos infectados pelo CHIKV não desenvolvem alterações hematológicas significativas.

A ocorrência de alterações hematológicas em camundongos foi avaliada durante 30 dias após a infecção pelo CHIKV (Figura 13). Os animais infectados apresentaram um aumento no número total de leucócitos em tempos mais tardios da infecção, especificamente no 14^o e 30^o dias (Figura 13 – A), bem como no hematócrito no 21^o dia após a infecção (Figura 13 – B). Por outro lado, não houve alteração no número de plaquetas durante a cinética de infecção (Figura 13 – C).

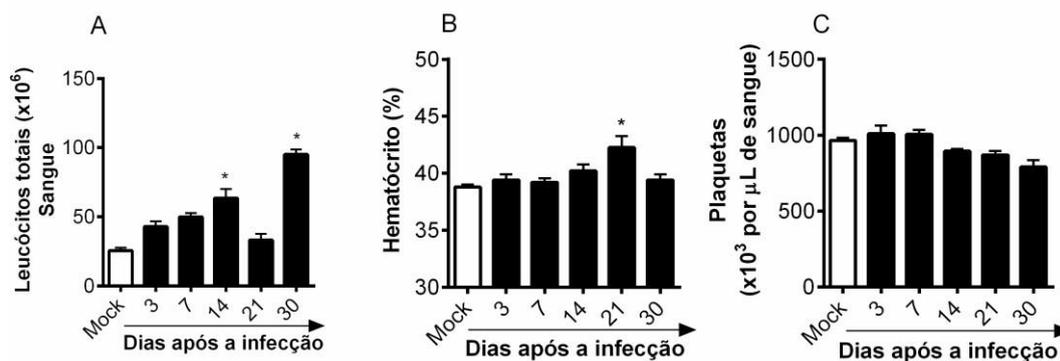


Figura 13: A infecção i.pl. pelo CHIKV induz alterações hematológicas discretas em camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV *La Reunion* pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS. Os parâmetros hematológicos (A) Contagem total de leucócitos, (B) hematócrito e (C) plaquetas foram avaliados por até 30 dias p.i. Camundongos controle (Mock) receberam injeção intraplantar de PBS e foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

5.2.3. Os camundongos infectados pelo CHIKV não apresentam carga viral viável detectada no soro, baço e LNP.

Os animais foram infectados e a quantificação da carga viral avaliada durante 30 dias por meio da técnica de titulação viral (Figura 14). Como resultado, não detectamos a presença de partícula de vírus viável no (A) LNP, (B) baço e (C) soro dos animais.

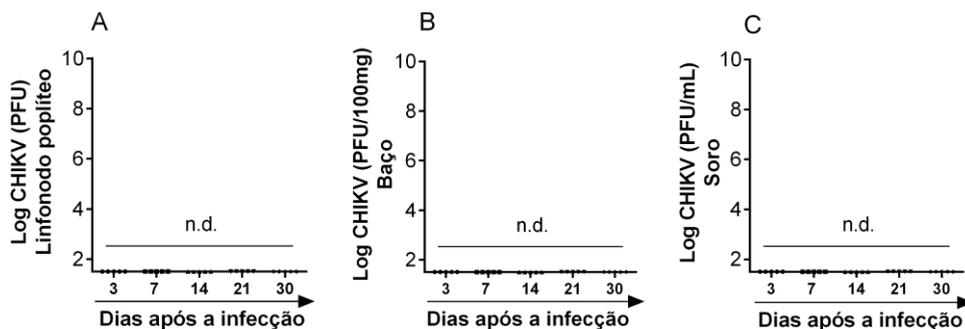


Figura 14: A infecção i.pl. pelo CHIKV não está associada à recuperação de carga viral viável no LNP, baço e soro de camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV *La Reunion* pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta dos órgãos nos dias citados. A quantificação do título viral foi obtida por ensaio de titulação usando células Vero permissivas à infecção. Os resultados são apresentados como PFU por mg de tecido ou PFU por mL de sangue. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle. n.d. (não detectável) - ausência de PFU nas amostras.

5.2.4. A infecção pelo CHIKV induz aumento do recrutamento de neutrófilos no quadríceps, mas não no baço e no fígado dos camundongos.

A figura 15 demonstra a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (análise indireta indicativa do número de neutrófilos) no (A) baço, (B) fígado e (C) quadríceps dos animais infectados com o CHIKV. Pode ser observado que ocorre um aumento discreto no número de neutrófilos apenas no quadríceps dos animais infectados nos dias 14, 21 e 30 p.i, quando comparado com animais controle. Por outro lado, a análise de MPO no baço e no fígado permaneceu com os níveis basais dessas células durante todo o curso da infecção.

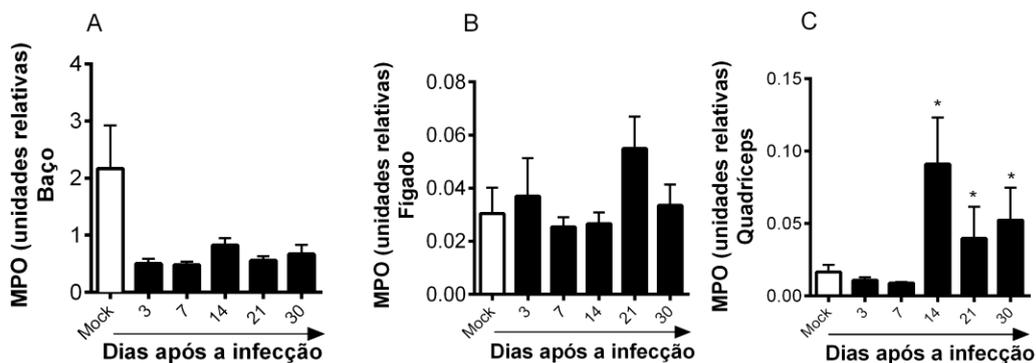


Figura 15: A infecção i.pl. pelo CHIKV induz aumento do recrutamento de neutrófilos no quadríceps, mas não no baço e no fígado dos camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV *La Reunion* pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta dos órgãos nos dias citados. A migração de neutrófilos foi avaliada pela quantificação dos níveis de mieloperoxidase (MPO) no (A) baço, (B) fígado e (C) quadríceps. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

5.2.5. Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam elevados níveis da quimiocina CCL2 e da citocina IL-6 no baço, mas não das quimiocinas CXCL-1 e CCL5 nesse mesmo órgão.

Os níveis de IL-6, CCL2 e CCL5 foram quantificados no baço dos camundongos durante o curso da infecção. Ainda, buscamos averiguar a produção da quimiocina CXCL-1 no baço destes animais, uma vez que essa é sabidamente um importante agente para o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (WHITE *et al.*, 2005).

A Figura 16 (A) demonstra que os níveis de CCL2 estão aumentados, em relação aos animais não infectados, a partir do 3^o até o 28^o dia após a infecção. Já os níveis de IL-6 (Figura 16 – D) encontram-se aumentados apenas no 7^o dia de infecção. Por outro lado, CXCL-1 e CCL5 apresentam níveis inalterados durante todo o curso da infecção (Figura 16 – B e C, respectivamente).

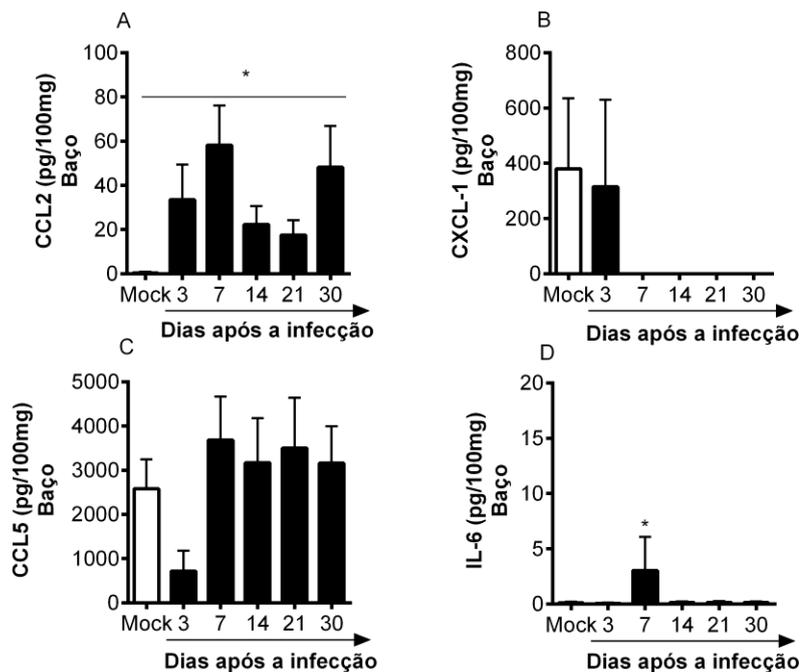


Figura 16: A infecção i.pl. pelo CHIKV está associada a elevados níveis da quimiocina CCL2 e da citocina IL-6 no baço, mas não das quimiocinas CXCL-1 e CCL5 nesse mesmo órgão. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV *La Reunion* pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta do baço nos dias citados. (A) CCL2, (B) CXCL-1, (C) CCL5 e (D) IL-6 foram quantificadas por ELISA. Os resultados são apresentados como pg por 100 mg de tecido. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

Diante dos resultados demonstrados acima, foi possível perceber claramente que a infecção i.pl. pelo CHIKV induziu uma hipernocicepção prolongada em camundongos adultos (8 semanas) da linhagem C57BL/6j, a qual representa o sintoma mais marcante e incapacitante da CHIKF. Entretanto, quando os sinais clínicos e hematológicos foram avaliados, não percebemos alterações significativas quando comparado ao grupo controle NI. Com relação aos parâmetros da resposta inflamatória, nossos resultados demonstraram que o recrutamento de neutrófilos ocorreu de maneira discreta, bem como a produção de mediadores inflamatórios no baço destes animais. Além disso, não foi detectada a recuperação da carga viral em órgãos alvo após a infecção. Desta forma, nossos achados demonstram que estes

camundongos respondem à infecção de forma autorresolutiva e, por esse motivo, este modelo não foi completamente viável para mimetizar e reproduzir muitos dos parâmetros clínicos encontrados na doença humana como esperávamos. Dessa maneira recorremos à literatura e observamos que diversos modelos experimentais de infecção pelo CHIKV utilizam camundongos neonatos ou mais jovens e conseguem reproduzir diversos parâmetros de doença (COUDERC *et al.*, 2008; MORRISON *et al.*, 2011; GOUPIL *et al.*, 2016). Baseado nisto, e levando em consideração nosso intuito de padronizar um modelo experimental em camundongos imunocompetentes que mimetize a maioria dos achados clínicos da doença humana, o nosso próximo tópico consistiu em avaliar os mesmos parâmetros já descritos anteriormente em camundongos jovens com 4 semanas de idade.

5.3. TÓPICO 2 - Caracterizar os parâmetros de doença e a resposta inflamatória em camundongos jovens selvagens (4 semanas) da linhagem C57BL/6j

5.3.1. A infecção intraplantar com duas linhagens distintas do CHIKV induz hipernocicepção articular inflamatória prolongada.

Como mencionado, avaliamos todos os parâmetros já descritos em animais jovens, inclusive a hipernocicepção articular inflamatória. Para tanto, animais da linhagem C57BL/6j, machos, com 4 semanas de idade, foram infectados com duas linhagens de CHIKV (*La Reunion* ou linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico do Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU. Estes animais foram monitorados quanto à hipernocicepção por um período de 30 dias (Figura 17).

Nossos resultados demonstraram que a infecção intraplantar por ambos os isolados do CHIKV induz hipernocicepção articular inflamatória a partir do 1º até o 21º dia p.i, retornando aos níveis basais no 28º dia. Os animais controles NI medidas similares aos valores basais durante todo o período avaliado.

Esses dados reproduziram de maneira similar a hipernocicepção induzida pelo CHIKV em camundongos adultos (Figura 12 –B) e sugerem que

não há diferença do perfil de resposta hipernociceptiva induzida nas duas linhagens virais avaliadas. Por conseguinte, levando em consideração que a linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil representa a população de vírus circulante no país, nós decidimos utilizar o isolado Brasileiro para a execução dos experimentos subsequentes que objetivaram avaliar a resposta inflamatória e parâmetros de doença neste modelo experimental.

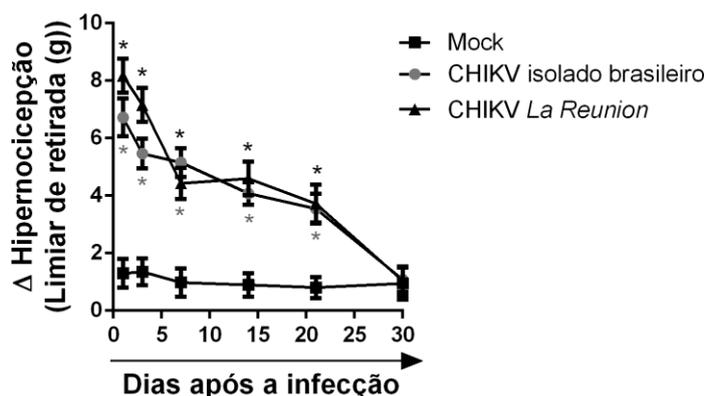


Figura 17: A infecção i.pl. pelo CHIKV induz hipernocicepção articular inflamatória prolongada em camundongos jovens. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com duas linhagens de CHIKV (*La Reunion* ou linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico do Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS e a hipernocicepção articular inflamatória nesses animais foi avaliada durante 30 dias. Os camundongos controle (Mock) receberam injeção i.pl. de PBS e foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

5.3.2. A infecção pelo CHIKV não altera peso corporal e edema de pata em camundongos jovens.

Os sinais clínicos, como perda de peso corporal e edema de pata foram avaliados por até 14 dias, conforme demonstrado na figura 18. Nossos resultados demonstram que mesmo em camundongos jovens, durante o curso da infecção pelo CHIKV, os animais não apresentam (A) perda de peso corporal ou (B) edema de pata. Ainda, os animais NI apresentaram medidas similares durante todo o período avaliado (Figura 18 A-B).

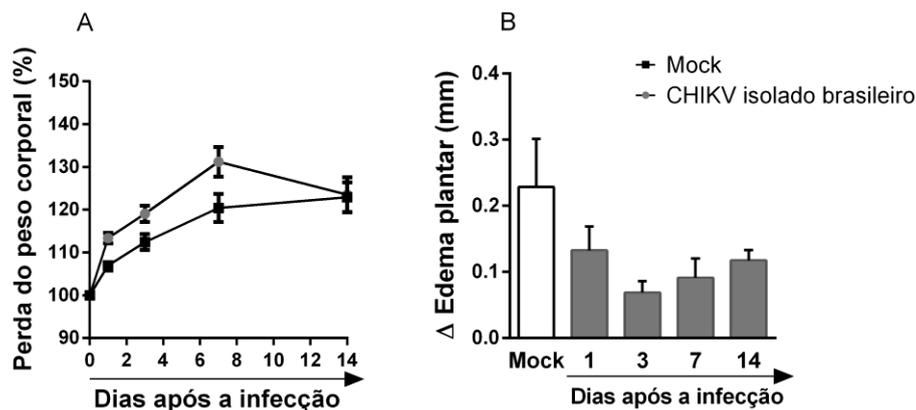


Figura 18: A infecção i.pl. pelo CHIKV não altera o peso corporal e o edema de pata em camundongos. Os camundongos da linhagem C57/BL6 foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS. Os parâmetros clínicos (A) peso corporal e (B) edema de pata foram avaliados por até 14 dias. Camundongos controle (Mock) receberam injeção intraplantar de PBS e foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

5.3.3. Os camundongos da linhagem C57BL6j jovens desenvolvem alterações hematológicas após a infecção pelo CHIKV.

Para a avaliação da ocorrência de alterações hematológicas, os animais foram acompanhados por até 14 dias e diversas análises foram feitas, conforme demonstrado na figura 19. Os animais infectados apresentaram uma redução no número total de leucócitos durante todo o curso da infecção aguda (1, 3, 7 e 14 dias) (A). Esta leucopenia, por sua vez, é resultado de uma redução apenas do número de linfócitos nos mesmos dias citados, mas não de neutrófilos e monócitos (B). Ainda, os animais apresentaram aumento do nível de hematócrito no 1^o e 3^o dia após a infecção (C), mas nenhuma alteração no número de plaquetas (D).

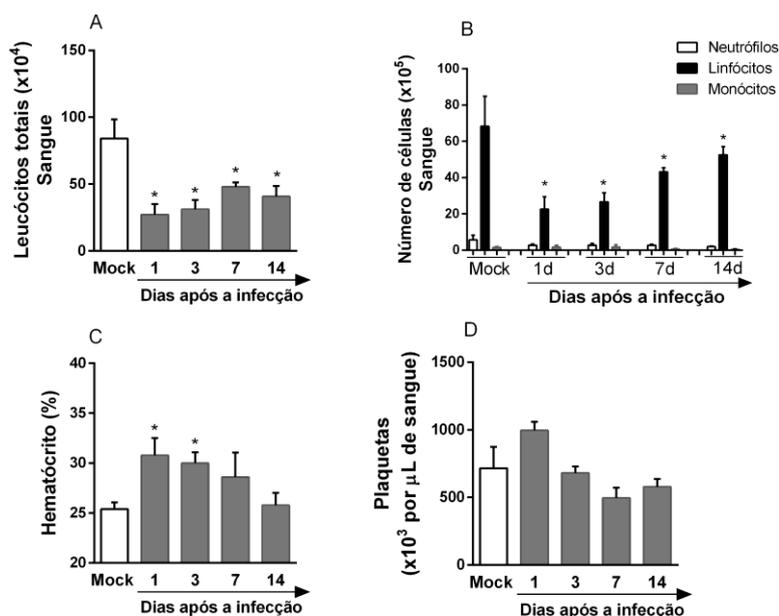


Figura 19: A infecção i.pl. pelo CHIKV em camundongos jovens induz linfocitopenia e aumento do nível de hematócrito, mas nenhuma alteração no número de plaquetas. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10⁶ PFU/50μL em PBS. Os parâmetros hematológicos: (A) Contagem total de leucócitos, (B) Contagem diferencial de leucócitos, (C) hematócrito e (D) plaquetas foram avaliados no sangue dos animais por até 14 dias p.i. Camundongos controle (Mock) receberam injeção intraplantar de PBS e foram igualmente avaliados. Os grupos foram de 5 animais. * para p < 0,05 quando comparados com os animais controle NI.

5.3.4. Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam carga viral viável detectável no coxim plantar, LNP, quadríceps e baço, mas não no soro, nervo ciático e DRG.

A Figura 20 (A) demonstra a presença da carga viral detectável no coxim plantar dos animais infectados pelo CHIKV logo no 1^o dia p.i e níveis ainda mais elevados no 3^o dia. No LNP (B), a carga viral foi encontrada no 1^o dia p.i, com valores duas vezes acima do que foi inoculado, e também no 3^o dia. Nos períodos subsequentes, não houve detecção. No quadríceps (C), a carga viral foi detectada apenas no 3^o dia p.i. Por fim, a carga viral encontrada no baço

(D), foi detectada no 1º e 3º dias de infecção. Em contrapartida, não detectamos a presença de partícula de vírus viável no (E) soro, (F) nervo ciático e (C) gânglios dorsais da medula.

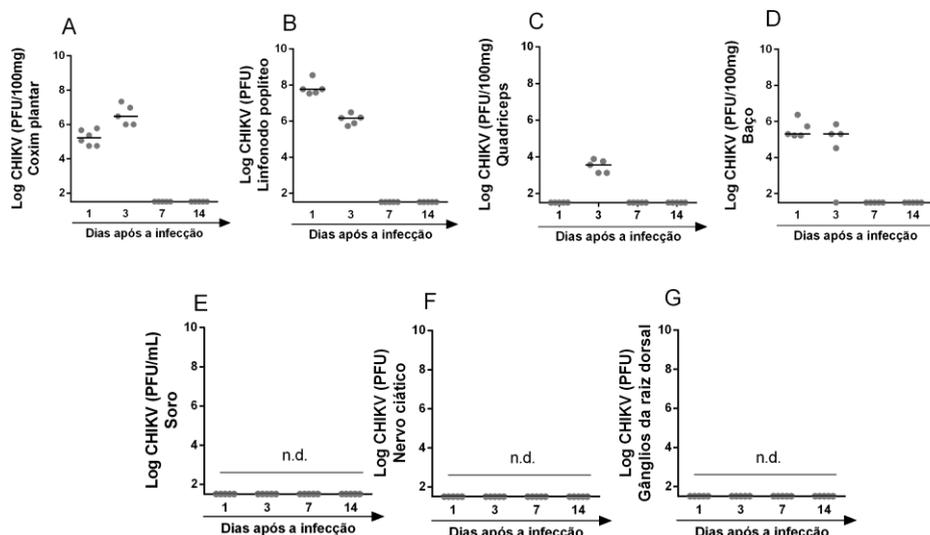


Figura 20: A infecção i.pl. pelo CHIKV está associada à recuperação de carga viral viável no coxim plantar, LNP, quadríceps e baço, mas não no soro, nervo ciático e DRG de camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados pelo CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta dos órgãos nos dias citados. A quantificação do título viral foi obtida por ensaio de titulação usando células permissivas à infecção. Os resultados são apresentados como PFU por mg de tecido ou PFU por mL de sangue. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle e n.d - não detectáveis para ausência de PFU nas amostras.

5.3.5. Os camundongos infectados pelo CHIKV não apresentam alterações nos níveis de ALT no soro.

Sabe-se que pacientes com CHIKF podem apresentar uma elevação discreta das enzimas hepáticas ALT e AST durante a fase aguda da doença (GOUPIL; MORES, 2016; Ministério da Saúde, 2017). Dessa forma, para avaliar uma possível lesão hepática durante a infecção pelo CHIKV, analisamos os níveis de ALT.

A Figura 21 demonstra que os níveis de ALT encontram-se inalterados durante a cinética de infecção pelo CHIKV. Esses resultados foram comparados com os níveis desta mesma transaminase quantificada em animais controles não infectados (NI).

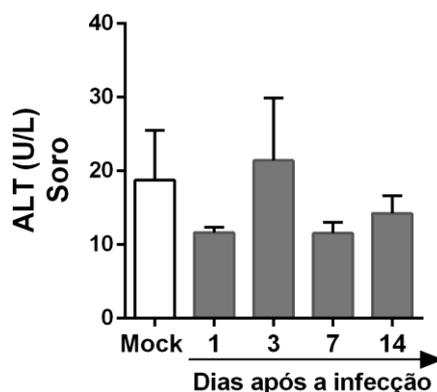


Figura 21: A infecção i.pl. pelo CHIKV não induz alterações nos níveis de ALT no soro de camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados pelo CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 106 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e o soro obtido por centrifugação a partir do sangue proveniente da veia cava destes animais nos dias citados. A quantificação da transaminase ALT foi realizada através do Kit comercial específico (Bioclin/Quibasa). Os resultados são apresentados como ALT U/L. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

5.3.6. A infecção pelo CHIKV está associada com um aumento no influxo de neutrófilos no coxim plantar.

A figura 22 demonstra a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase no (A) coxim plantar, (B) quadríceps e (C) baço, bem como a quantificação da N-acetilglicosaminidase (análise indireta indicativa do número de macrófagos) nestes mesmos órgãos (D, E e F, respectivamente) dos animais infectados pelo CHIKV. Os resultados mostrados evidenciam que a infecção pelo CHIKV induz o recrutamento neutrofílico na pata a partir do 1º dia até o 7º dia p.i, mas não no (B) quadríceps e (C) baço. Ainda, foi observado que durante a infecção pelo CHIKV não há recrutamento de células

mononucleares em nenhum dos tecidos avaliados, (D) coxim plantar, (E) quadríceps ou (F) baço.

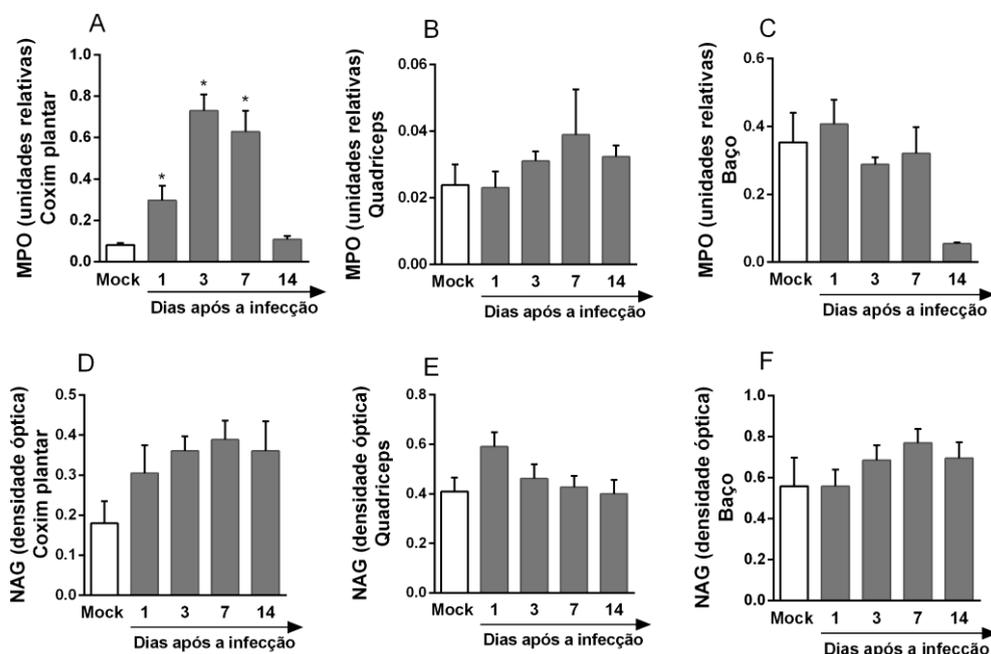


Figura 22: A infecção i.pl. pelo CHIKV está associada com um aumento no influxo de neutrófilos no coxim plantar de camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta dos órgãos nos dias citados. A migração de neutrófilos (A, B e C) foi avaliada pela quantificação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO) e a migração de células mononucleares (D, E e F) pela quantificação dos níveis teciduais de N-acetilglicosaminidase (NAG) nos tecidos avaliados: coxim plantar, quadríceps e baço. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido para MPO e absorvância (O.D.) para NAG. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

5.3.7. Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam elevados níveis de quimiocinas e citocinas no coxim plantar.

Como mencionado, diversos mediadores estão associados à patogênese da febre Chikungunya, como por exemplo, CCL2, CCL3, CCL4, TNF α e IL-1 β (RULLI et al., 2009, 2011; HOARAU et al., 2010; CHEN et al.,

2015; POO et al., 2014; NORET et al., 2012). Desta maneira, os níveis destes foram quantificados no coxim plantar dos camundongos durante o curso da infecção.

A Figura 23 ilustra as citocinas analisadas, TNF α , IL-1 β e IL-6. Como demonstrado em (A), os níveis de TNF α estão aumentados, em relação aos animais não infectados, no 1^o e 7^o dias p.i, e retornam aos níveis basais no 14^o dia. Os níveis de IL-6, por sua vez, têm seu pico no 1^o dia após a infecção, e reduzem esses valores já no 3^o dia após a infecção, de onde permanecem com seus valores basais (Figura 23 – B). Por outro lado, os níveis de IL-1 β permaneceram inalterados durante todo o curso da infecção (Figura 23 – C).

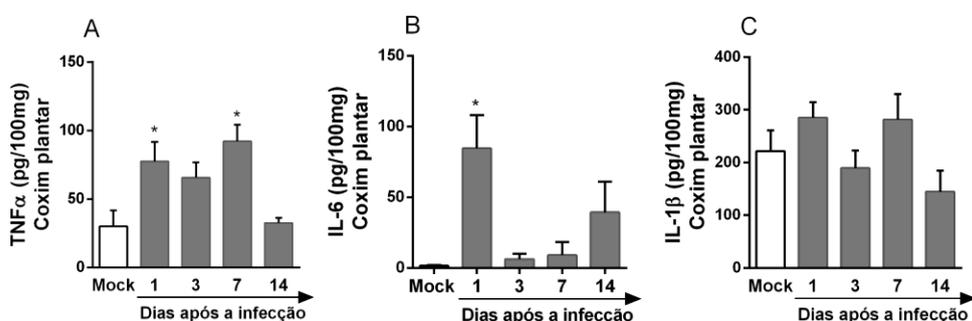


Figura 23: Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam altos níveis de TNF α e IL-6, mas não de IL-1 β no coxim plantar. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados pelo CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10⁶ PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta do coxim plantar nos dias citados. (A) TNF α , (B) IL-6 e (C) IL-1 β foram quantificadas por ELISA no coxim plantar desses animais. Os resultados são apresentados como pg por 100 mg de tecido. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

Com relação às quimiocinas analisadas, foram elas: CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-9 e CXCL-10, conforme demonstrado pela figura 24. Os níveis de CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, as quais são importantes para o recrutamento de diversos tipos celulares (monócitos, linfócitos T, células dendríticas e NK, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) para o sítio inflamatório,

encontram-se aumentados a partir do 1º dia até o 7º dia após a infecção, retornando aos níveis basais no 14º dia (A, B, C, D, respectivamente).

A figura 24 (E) demonstra que os níveis de CXCL-1 permaneceram inalterados durante toda a cinética de infecção, ao passo que a figura 24 (F) mostra que os níveis de CXCL-2 aumentam no 3º p.i, retornando aos níveis basais já no 7º dia. Os níveis de CXCL-9, demonstrados na figura 24 (G), encontram-se aumentados, em relação aos animais não infectados, no 1º e 7º dias, e retornam aos níveis basais no 14º dia. Por outro lado, os níveis de CXCL-10 permaneceram inalterados durante todo o curso da infecção (Figura 24 – G).

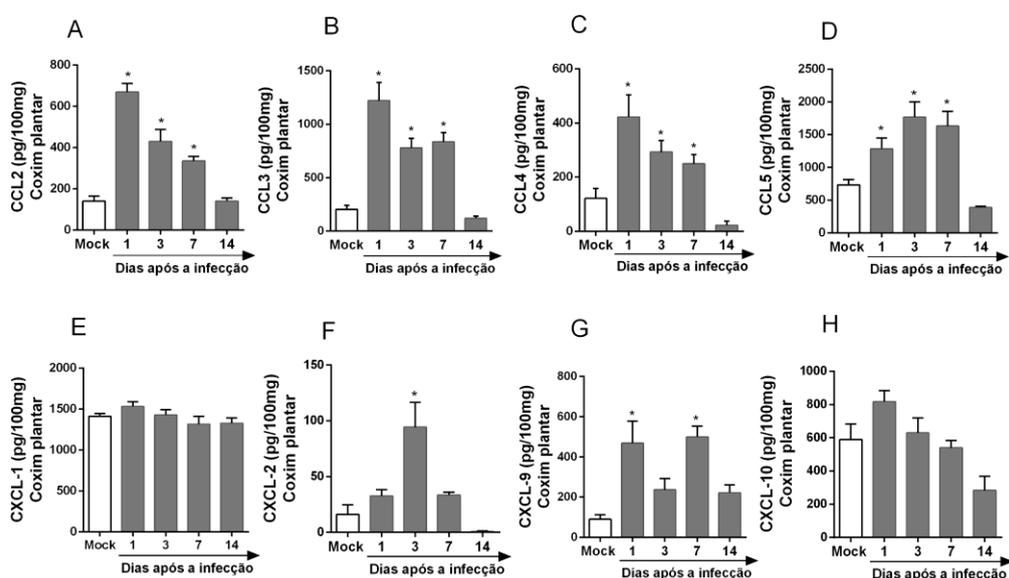


Figura 24: Os camundongos infectados pelo CHIKV apresentam altos níveis de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2, CXCL-9 e CXCL-10, mas não de CXCL-1 no coxim plantar. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.p. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta do coxim plantar nos dias citados. (A) CCL2, (B) CCL3, (C) CCL4, (D) CCL5, (E) CXCL-1, (F) CXCL-2 e (G) CXCL-9 e (H) CXCL-10 foram quantificadas por ELISA no coxim plantar desses animais. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

5.3.8. A infecção pelo CHIKV induz a produção de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos no soro dos camundongos.

Sabe-se que pacientes com CHIKF apresentam níveis de IgG mensuráveis na primeira semana e que perduram por anos após a infecção inicial. Além disso, muitos estudos demonstraram níveis persistentes de IgM em pacientes com duração de 18 meses ou mais. (GOUPIL & MORES, 2016; Ministério da Saúde, 2017). Desta maneira, avaliamos os níveis destes anticorpos no soro dos camundongos infectados pelo CHIKV, conforme demonstrado na figura 25.

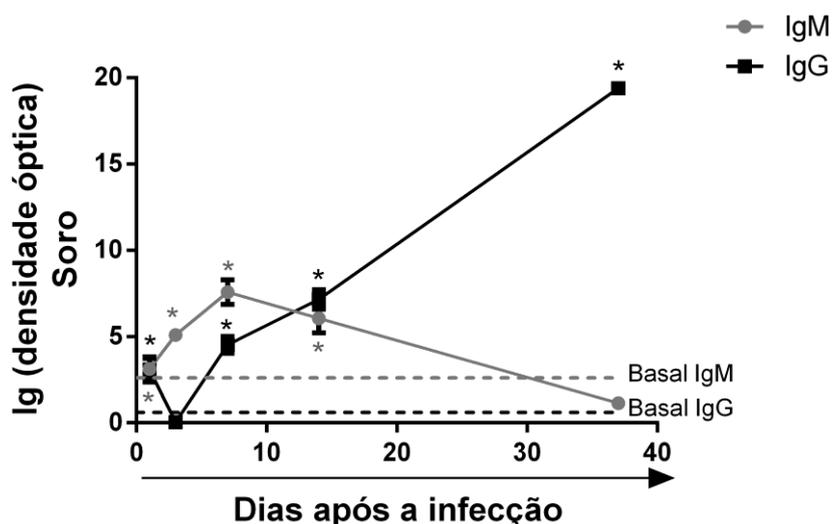


Figura 25: A infecção i.pl. pelo CHIKV induz a produção de anticorpos do tipo IgM e IgG específicos no soro dos camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta do soro nos dias citados. Anticorpos IgM e IgG específicos foram quantificados por ELISA no soro desses animais. Os resultados são apresentados como densidade óptica (O.D). Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

A figura 25 demonstra que os níveis de IgM (linha cinza) encontram-se aumentados a partir do 1º dia de infecção nos animais infectados com o CHIKV e atingem o pico máximo no 7º dia de infecção, caracterizando, desta forma, uma infecção aguda. Conforme a mesma figura, vimos que após 37 dias de infecção, os níveis de IgM retornam aos níveis basais. Ainda, a produção de IgG foi demonstrada a partir do 1º dia de infecção, atingindo seu pico no 37º dia após a infecção (Figura 25 – linha preta).

5.3.9. Alterações histopatológicas induzidas pela infecção i.pl pelo CHIKV.

A análise histopatológica do coxim plantar (Figura 26) de animais infectados ou não pelo CHIKV durante a cinética da infecção (1, 3, 7 e 14 dias) demonstrou que o processo inflamatório foi caracterizado pela presença de infiltrado celular, principalmente de leucócitos polimorfonucleares (PMN), que são células características do processo inflamatório agudo. A intensidade deste processo variou desde ausência de inflamação até inflamação grave no decorrer do tempo. No 14º dia, essas alterações haviam retornado aos valores basais. De maneira mais descritiva, a análise do coxim plantar de camundongos não infectados (NI) ilustra a integridade tecidual e presença rara de células inflamatórias (Figura 26 - A). A figura B corresponde à análise histopatológica de um animal no 1º dia p.i. Nessa fase, nenhuma alteração histopatológica importante pôde ser observada. No 3º dia de infecção, observa-se a presença de infiltrado celular (PMN) e hiperemia dos vasos sanguíneos (Figura 26 – C). No 7º dia de infecção, há o comprometimento generalizado do tecido em questão, evidenciado pela presença de importante infiltrado celular predominantemente PMN (Figura 26 – D). Nesta fase, a perda da arquitetura tecidual é intensa. Já no 14º dia (Figura 26 –E), a arquitetura tecidual é reestabelecida e se apresenta significativamente semelhante ao grupo controle.

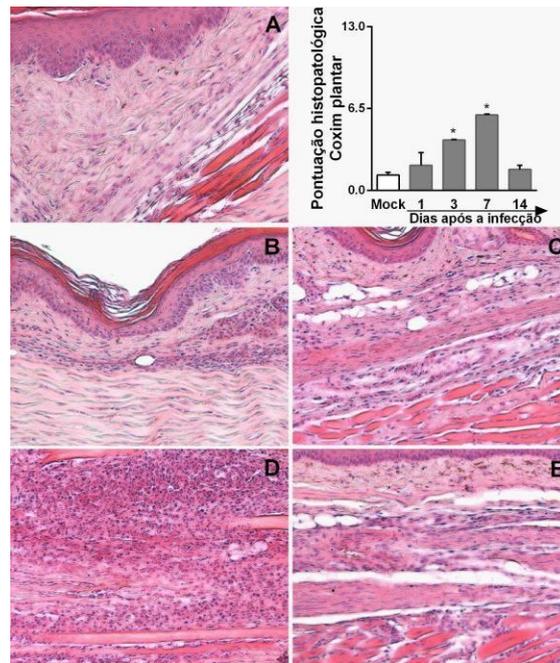


Figura 26: Seções histológicas dos coxins plantares de camundongos infectados e não infectados pelo CHIKV. Em (A) animais não infectados (NI), em (B, C, D e E), os animais foram infectados pelo CHIKV pela injeção i.p.i. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, nos dias 3, 5, 7 e 14 p.i, respectivamente. A) Animal NI. B) 1º dia de infecção. C) 3º dia de infecção. D) 7º dia de infecção. E) 14º dia de infecção (HE, aumento original de 20x). Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

Além de avaliar as lesões causadas no coxim plantar destes animais, nós decidimos avaliar a presença de lesão nas articulações do joelho, especificamente a articulação fêmuro-tibial, dado que a literatura importante acometimento dessa articulação causadas pelo CHIKV (GARDNER *et al.*, 2010; MORRISON *et al.*, 2011). Desta maneira, a figura 27 ilustra a análise histopatológica da articulação fêmuro-tibial de animais da linhagem C57BL/6j (A) não infectados e infectados nos dias (B) 1, (C) 3, (D) 7 e (E) 14 pelo CHIKV. No 1º dia de infecção (B), os animais não apresentam nenhuma alteração evidente de alteração articular. A partir do 3º até o 14º dia após a infecção (C a E, respectivamente) tem-se presença de infiltrado celular predominantemente PMN, hiperplasia sinovial e hiperemia dos vasos sanguíneos.

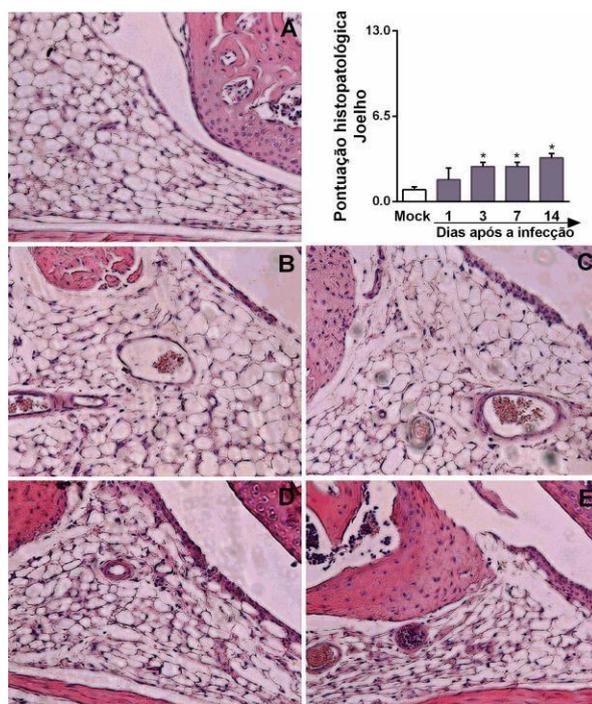


Figura 27: Seções histológicas da articulação do joelho de camundongos infectados e não infectados pelo CHIKV. Em (A) animais não infectados (NI), em (B, C, D e E), os animais foram infectados pelo CHIKV pela injeção i.p.l. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, nos dias 3, 5, 7 e 14 após a infecção, respectivamente. A) Animal não NI. B) 1º dia de infecção. C) 3º dia de infecção. D) 7º dia de infecção. E) 14º dia de infecção (HE, aumento original de 20x). Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

Sabe-se que os proteoglicanos são constituintes das cartilagens articulares e apresentam a função de “mola biológica”, sendo responsáveis pelo amortecimento das articulações. Em processos artrósicos, há um desequilíbrio entre a produção de componentes da matriz extracelular, o que resulta em degradação e perda do tecido cartilaginoso, incluindo os fragmentos de proteoglicanos (VELOSA; TEODORO, YOSHINARI, 2003). Desta forma, nós analisamos a perda de proteoglicanos nas cartilagens articulares de camundongos infectados ou não pelo CHIKV (Figura 28).

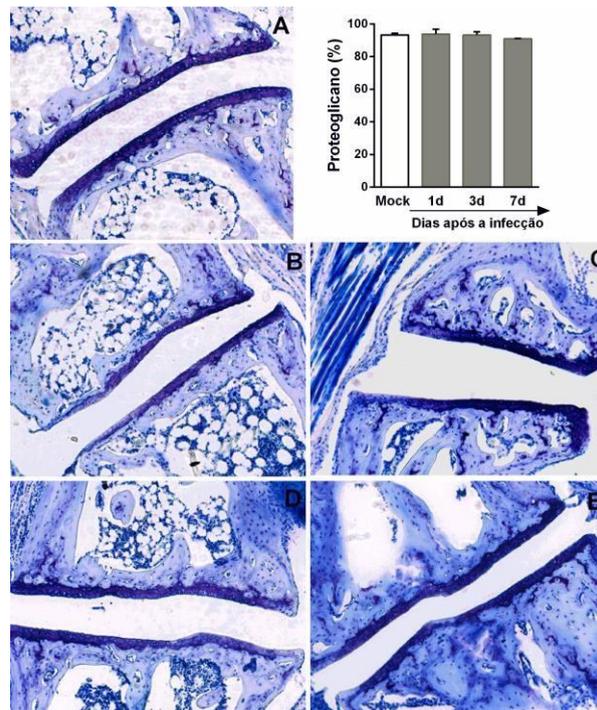


Figura 28: Seções histológicas da articulação do joelho de camundongos infectados e não infectados pelo CHIKV. Em (A) animais não infectados, em (B, C, D e E), os animais foram infectados pelo CHIKV pela injeção i.p.i. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, nos dias 3, 5, 7 e 14 p.i, respectivamente. A) Animal não infectado (NI). B) 1^o dia de infecção. C) 3^o dia de infecção. D) 7^o dia de infecção. E) 14^o dia de infecção (AT, aumento original de 20x). Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

A figura 28 (A) corresponde a camundongos NI e ilustra a integridade do tecido cartilaginoso com a presença marcante de proteoglicanos, os quais podem ser identificados pela intensa coloração azul. As figuras B, C, D e E, por sua vez, representam os dias 1, 3, 7 e 14 dias p.i, respectivamente. Conforme pode ser observado, não houve diferença na quantificação, indicativa de ausência de perda de proteoglicanos durante a cinética de infecção pelo CHIKV.

5.3.10.A infecção pelo CHIKV não induz osteoclastogênese em camundongos.

A manutenção da estrutura óssea normal e saudável é um processo controlado que requer ações coordenadas de osteoclastos e osteoblastos. Estas, por sua vez, são reguladas através de sinalizações provenientes de células do microambiente ósseo local. Atualmente, sabe-se que as células imunes e seus mediadores podem contribuir para a homeostase óssea normal e são os principais impulsionadores da perda óssea em condições inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide (DANKS & TAKAYANAGI, 2013; CHEN *et al.*, 2015).

A diferenciação dos osteoclastos requer a presença local de uma citocina pró-osteoclastogênica denominada RANKL e sua interação com seu receptor, RANK. As ações do RANKL podem ser inibidas pela osteoprotegerina (OPG), um receptor de chamariz natural para RANKL que previne sua interação com o RANK. A expressão relativa de RANKL para OPG (razão RANKL: OPG) dentro do microambiente ósseo local controla a diferenciação dos osteoclastos (CHEN *et al.*, 2015). Neste sentido, para avaliar se a infecção pelo CHIKV induz osteoclastogênese, quantificamos a liberação de RANKL e OPG no soro de camundongos infectados ou não pelo CHIKV, conforme a figura 29.

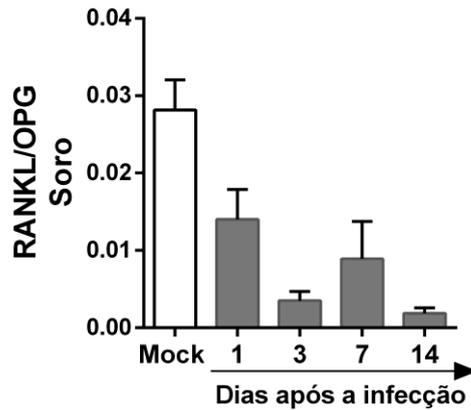


Figura 29: Os camundongos infectados pelo CHIKV não apresentam alterações na razão entre RANKL e OPG. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados pelo CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta do soro nos dias citados. Os níveis de RANKL e OPG foram quantificados por ELISA no soro desses animais. Os resultados são apresentados como a relação entre RANKL e OPG. Os grupos foram de 5 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

Como demonstrado na figura 29, a relação entre RANKL e OPG foi menor que 1 em todos os tempos avaliados após a infecção, o que significa que os níveis de RANKL são menores que os de OPG e, portanto, é indicativo de que a infecção não induz osteoclastogênese.

5.3.11.A infecção pelo CHIKV não está associada a alterações na função motora, mas alterou a sensibilidade nociceptiva em camundongos.

Uma vez que alguns trabalhos têm demonstrado que a infecção pelo CHIKV está associada com o comprometimento articular, nós decidimos avaliar a função motora e locomotiva de camundongos durante o curso da infecção (1, 3, 7 e 14 dias), conforme demonstrado na figura 30 (A e C, respectivamente) (MORRISON *et al.*, 2011). Ainda, analisamos a sensibilidade nociceptiva

destes camundongos nestes mesmos tempos através do teste de placa quente, o qual utiliza a temperatura como o estímulo nociceptivo.

Como pode ser visualizado na figura 30 (A), os camundongos infectados apresentaram uma porcentagem de latência maior ou igual para cair do Rota Rod quando comparados aos camundongos controle, indicando um bom desempenho durante o teste de função motora. Com relação à figura 30 (B), pode ser observado que os camundongos infectados pelo CHIKV apresentaram uma maior sensibilidade nociceptiva no 3º dia da infecção, uma vez que reagiram ao estímulo térmico mais rapidamente que os camundongos controle. Ainda, pode ser observado na figura 30 (C) que os camundongos infectados pelo CHIKV não apresentaram alterações na atividade locomotora, uma vez que, durante o teste de campo aberto, percorreram distâncias semelhantes aos camundongos não infectados.

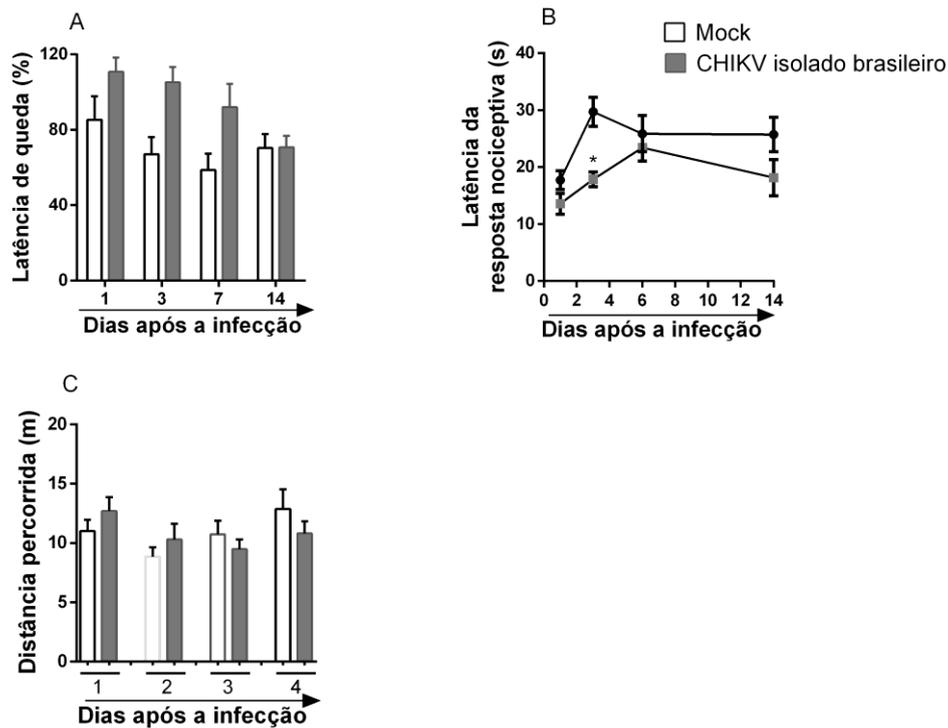


Figura 30: A infecção pelo CHIKV não induz alterações motoras e de locomoção, mas está associada a comprometimento da sensibilidade nociceptiva dos camundongos. Os camundongos da linhagem C57BL/6j foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10^6 PFU/50 μ L em PBS e, então, foram acompanhados durante os tempos descritos após a infecção para a avaliação comportamental. O desempenho motor foi avaliado por meio do teste de Rota Rod e expresso como a latência de queda medida em segundos (A). A avaliação sensorial por meio do teste de placa quente e expressa como latência de resposta nociceptiva em segundos (B). Já a avaliação da atividade locomotora espontânea dos camundongos foi realizada através do teste de campo aberto e expressa em distância percorrida (m) (C). Os grupos foram de 7-8 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados com os animais controle NI.

De maneira geral, demonstramos nesse tópico que a infecção de camundongos imunocompetentes jovens pelo CHIKV induziu uma hipernocicepção prolongada, mas não foi capaz de induzir letalidade ou alterações clínicas significativas. Entretanto, observamos que os camundongos apresentaram marcante leucopenia, principalmente de linfócitos, em relação aos camundongos controles não infectados. Ainda, observamos uma maior

resposta inflamatória frente à infecção, demonstrada por um maior recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção, aumento na produção de diversos mediadores inflamatórios, citocinas (TNF α e IL-6) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CLL5, CXCL-2 e CXCL-9), e elevada carga viral no coxim plantar, LNP, QD e baço dos animais. Ainda, esses camundongos demonstraram alteração sensitiva em resposta a um estímulo nociceptivo (teste de placa quente) e alterações histopatológicas importantes nas articulações do tornozelo e joelho, mesmo sem haver aumento de perda óssea ou alterações na função motora.

5.4. TÓPICO 3 – Avaliar a participação do receptor de interferons do tipo I (IFN α / β R) na patogênese da infecção pelo CHIKV

5.4.1. Camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam elevada perda de peso e maior taxa de letalidade após a infecção com o CHIKV em relação aos seus controles selvagens da linhagem SV129.

Para avaliar o papel das citocina IFN α e IFN β na patogênese da infecção pelo CHIKV, animais deficientes para o receptor de IFN α / β (IFN α / β R $^{-/-}$) e seus respectivos controles selvagens (SV129) foram infectados por via i.pl. com 3 diferentes inóculos do CHIKV (10^2 , 10^3 e 10^4 PFU/50 μ L) e monitorados quanto à perda de peso e taxa de sobrevivência (Figura 30). De acordo com a figura 30 (A), observamos que a perda de peso corporal dos animais IFN α / β R $^{-/-}$ com os diferentes inóculos durante a cinética da infecção não é significativa quando comparada aos animais WT infectados. Com relação à taxa de sobrevivência (Figura 30 – B), ao passo que 100% dos animais WT infectados estavam vivos após 14 dias da infecção, todos os animais deficientes para o receptor de IFN α / β sucumbiram à infecção até o 6 $^{\circ}$ dia de infecção. O inóculo de 10^4 resultou em morte de todos os animais após 5 dias de infecção, enquanto os inóculos de 10^3 e 10^2 levaram à morte dos animais a partir do 5 $^{\circ}$ dia até o 6 $^{\circ}$. Uma vez que grande parte dos animais do grupo IFN α / β R $^{-/-}$ sucumbiu à infecção entre o quinto e sexto dia de infecção, os demais

parâmetros inflamatórios foram analisados utilizando o inóculo intermediário de 10^3 . A eutanásia destes animais foi realizado nos dias 3 e 5 após a infecção.

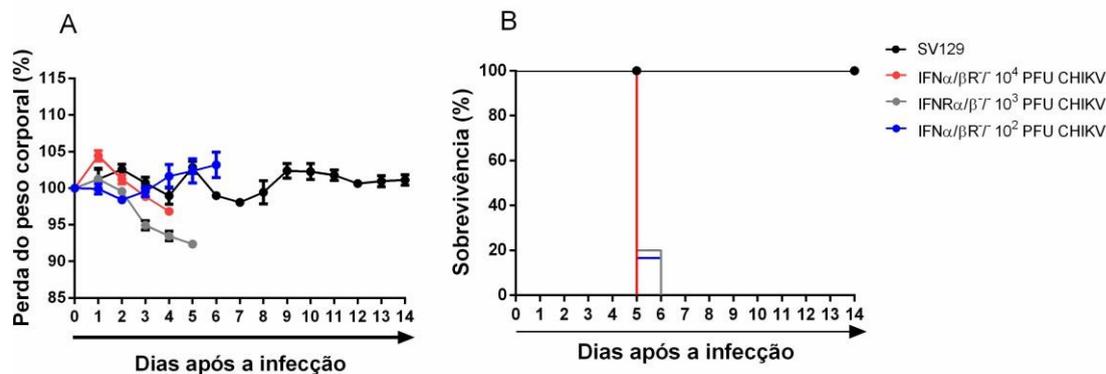


Figura 31: A infecção i.pl. pelo CHIKV em camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β (IFN α / β R $^{-/-}$) induz perda de peso e alta taxa de letalidade. Os camundongos da linhagem SV129 com 8 semanas, WT ou deficientes para o receptor de IFN α / β (IFN α / β R $^{-/-}$), foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.p.l. de 10^2 , 10^3 e 10^4 PFU/50 μ L em PBS. Os grupos foram de 7-8 animais. O peso corporal (A) e a sobrevivência (B) dos animais infectados com diferentes inóculos foram avaliados no decorrer de 14 dias.

5.4.2. Camundongos deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam níveis aumentados de ALT no soro, bem como elevado recrutamento de neutrófilos e células mononucleares para diversos órgãos, após a infecção pelo CHIKV.

A Figura 31 demonstra o aumento nos níveis da transaminase hepática ALT no soro dos animais deficientes para os receptores de IFN α / β (IFN α / β R $^{-/-}$) no 3 o e 5 o dia após a infecção pelo CHIKV, quando comparados aos animais não infectados. Conforme a mesma figura, pôde ser observado que os animais selvagens (SV129) apresentaram níveis inalterados de ALT durante a infecção pelo CHIKV.

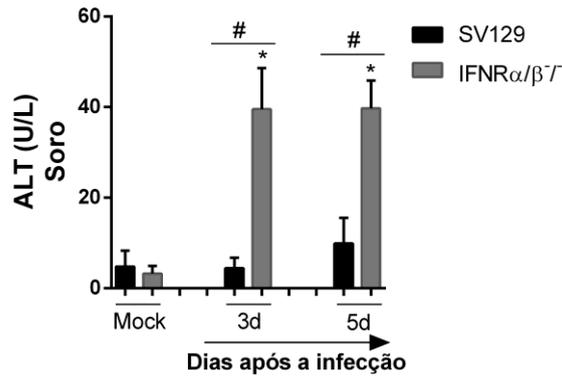


Figura 32: Os camundongos deficientes para o receptor de IFN α/β apresentam níveis aumentados da transaminase hepática ALT no soro, após a infecção pelo CHIKV. Os camundongos da linhagem SV129 com oito semanas, WT ou deficientes para o receptor de IFN α/β (IFN α/β R $^{-/-}$), foram infectados pelo CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.p.l. de 10^3 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e o soro obtido por centrifugação a partir do sangue proveniente da veia cava destes animais nos dias citados. A quantificação da transaminase foi realizada através da utilização do Kit comercial específico (Bioclin/Quibasa). Os resultados são apresentados como ALT U/L. Os grupos foram de 7-8 animais. * para $p < 0,05$ quando comparados os animais WT ou IFN α/β R $^{-/-}$ não infectados. # para $p < 0,05$ quando comparados os animais WT e IFN α/β R $^{-/-}$ infectados nos mesmos dias.

A figura 32 demonstra a quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (análise indireta indicativa do número de neutrófilos) no (A) coxim plantar, (B) quadríceps, (C) baço e (D) fígado, bem como a quantificação da N-acetilglicosaminidase (análise indireta indicativa do número de células mononucleares) nos mesmos órgãos (E, F, G e H, respectivamente) dos animais WT e IFNR α/β R $^{-/-}$ infectados pelo CHIKV. Pode ser observado um aumento expressivo de neutrófilos no (C) baço durante o 3 $^{\circ}$ e 5 $^{\circ}$ dias de infecção e no (B) quadríceps e (D) fígado apenas no 5 $^{\circ}$ dia da infecção nos animais deficientes para os receptores de IFN α/β , e todos estes valores diferem dos encontrados nos respectivos controles selvagens (SV129). Com relação ao (A) coxim plantar, houve um aumento de neutrófilos apenas no 3 $^{\circ}$ dia após a infecção nos animais selvagens. Ainda, foi observado que durante a infecção pelo CHIKV não há recrutamento de células mononucleares no (A)

coxim plantar e (C) baço dos animais WT e IFN α/β R $^{-/-}$. Por outro lado, há um aumento destas células no (H) fígado no 3^o dia, atingindo o pico no 5^o dia, e no (F) quadríceps apenas no 5^o dia da infecção nos animais deficientes para os receptores de IFN α/β , e todos estes valores diferem dos encontrados nos respectivos controles selvagens (SV129).

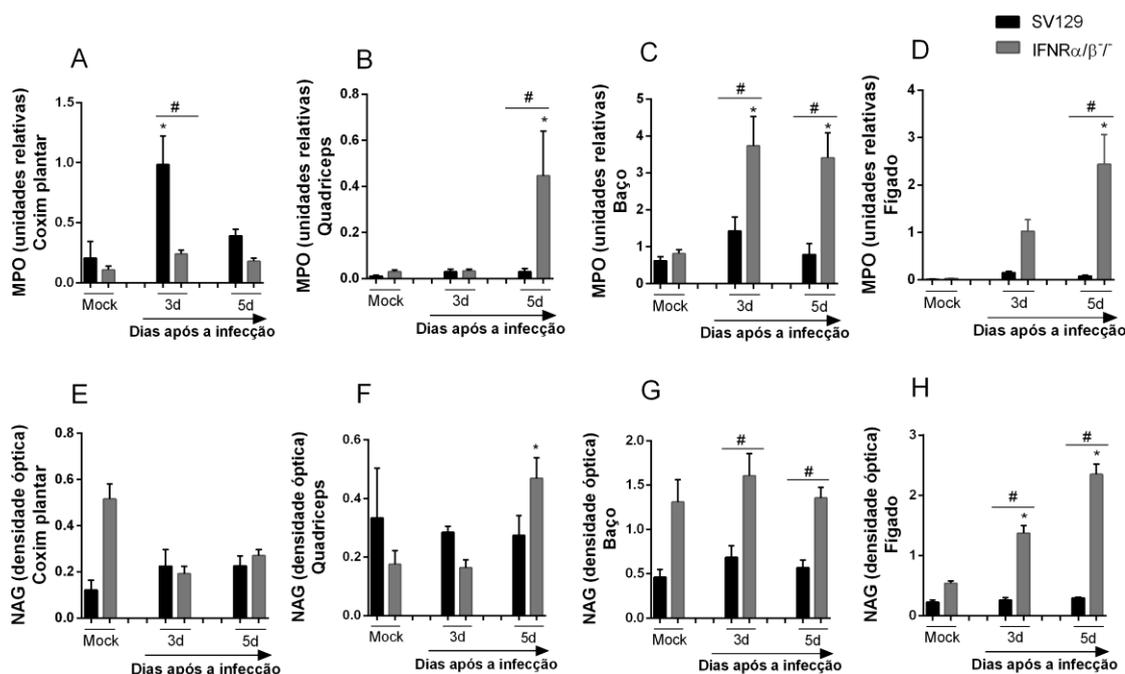


Figura 33: Acúmulo de neutrófilos e macrófagos no coxim plantar, quadríceps, baço e fígado de camundongos deficientes para o receptor de IFN α/β após a infecção pelo CHIKV. Os camundongos da linhagem SV129 com oito semanas, WT ou deficientes para os receptores de IFN α/β (IFN α/β R $^{-/-}$), foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.pl. de 10³ PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta dos órgãos nos dias citados. A migração de neutrófilos (A, B, C e D) foi avaliada pela quantificação dos níveis teciduais de mieloperoxidase (MPO) e a migração de células mononucleares (E, F, G e H) pela quantificação dos níveis teciduais de N-acetilglicosaminidase (NAG) nos tecidos avaliados: coxim plantar, quadríceps, baço e fígado. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por 100mg de tecido para MPO e densidade óptica para NAG. Os grupos foram de 7-8 animais. * para p<0,05 quando comparados os animais WT ou IFN α/β R $^{-/-}$ não infectados. # para p<0,05 quando comparados os animais WT e IFN α/β R $^{-/-}$ infectados nos mesmos dias.

5.4.3. A ausência do receptor de IFN α/β interfere com a produção de IFN γ e IL-6 durante a infecção pelo CHIKV.

Os níveis de IFN γ e IL-6 foram medidos no soro dos animais selvagens (SV129) e deficientes para os receptores de IFN α/β , infectados ou não pelo CHIKV (Figura 33). A Figura 33 (A) mostra que a citocina IFN γ estava aumentada no soro dos animais IFN α/β R $^{-/-}$ no 5 $^{\circ}$ dia da infecção, quando comparada ao controle selvagem e aos animais não infectados. Já a IL-6, apresentou níveis aumentados em ambos os grupos no 3 $^{\circ}$ dia p.i., principalmente nos animais WT. De forma interessante, os animais WT retornaram aos níveis basais dessa citocina no 5 $^{\circ}$ p.i., ao passo que os animais IFN α/β R $^{-/-}$ atingiram seu pico nesse mesmo tempo.

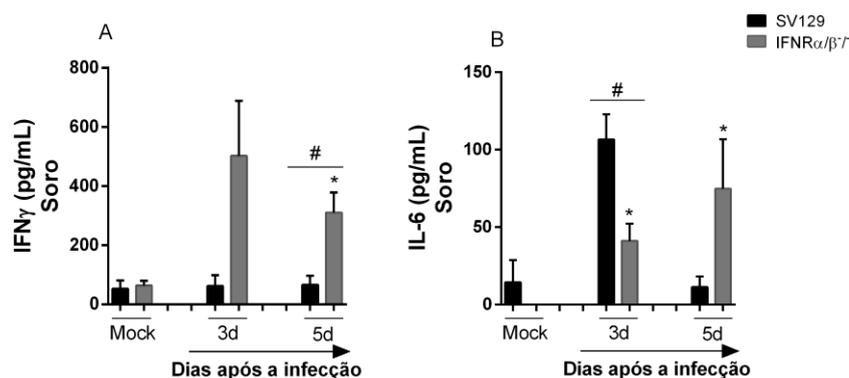


Figura 34: Quantificação dos níveis das citocinas IFN γ e IL-6 no soro de camundongos deficientes para o receptor de IFN α/β após a infecção pelo CHIKV. Os camundongos da linhagem SV129 com oito semanas, WT ou deficientes para os receptores de IFN α/β (IFN α/β R $^{-/-}$), foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.p.i. de 10 3 PFU/50 μ L em PBS, anestesiados e o soro obtido por centrifugação a partir do sangue proveniente da veia cava inferior destes animais nos dias citados. (A) IFN γ e (B) IL-6 foram quantificadas por ELISA no soro desses animais. Os resultados são apresentados como pg por mL. Os grupos foram de 7-8 animais. * para p<0,05 quando comparados os animais WT ou IFN α/β R $^{-/-}$ não infectados. # para p<0.05 quando comparados os animais WT e IFN α/β R $^{-/-}$ infectados nos mesmos dias.

5.4.4. Os animais deficientes para o receptor de IFN α / β apresentam carga viral elevada após infecção pelo CHIKV.

Os resultados anteriores apontaram para uma maior susceptibilidade por parte dos animais IFN α / β R $^{-/-}$ frente à infecção pelo CHIKV. Além disso, alguns estudos têm sugerido que essas citocinas apresentam um importante papel no controle da replicação do vírus e na sua disseminação para outros tecidos, incluindo para o sistema nervoso central (COUDERC *et al.*, 2008). Dessa forma, nós decidimos averiguar se a maior susceptibilidade dos animais IFN α / β R $^{-/-}$ à infecção está associada à incapacidade destes animais em combater a replicação viral e, conseqüentemente, uma maior disseminação do vírus.

A Figura 33 demonstra a presença da carga viral viável nos animais SV129 (WT) a partir do 1º dia p.i. em todos os tecidos analisados (LNP, QD, baço, fígado, soro e cérebro – A, B, C, D, E e F, respectivamente), perdurando em quantidades menores até o 5º dia no QD, baço, fígado e cérebro. De forma interessante, a carga viral detectada no grupo IFN α / β R $^{-/-}$ nos mesmos tecidos e tempos citados estava significativamente maior em relação aos animais WT. Exceto para o linfonodo poplíteo, no qual não houve diferença da carga viral entre os grupos IFN α / β R $^{-/-}$ e WT, todos os outros tecidos de animais deficientes para o receptor de IFN α / β apresentaram um aumento aproximado de 5 logaritmos no 3º dia da infecção. Como pode ser visualizada, a carga viral atinge seu pico no 5º, no qual animais IFN α / β R $^{-/-}$ apresentam um aumento de até 10 logaritmos em relação aos animais WT.

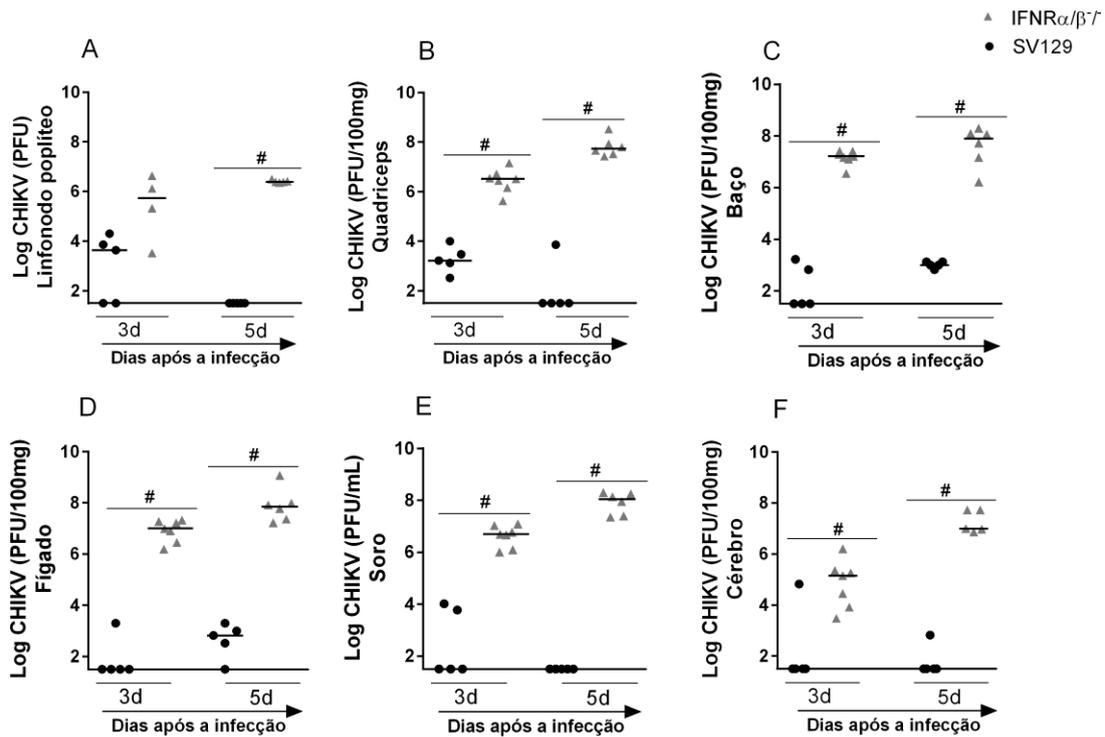


Figura 35: Os camundongos deficientes para o receptor de IFN α/β apresentam carga viral viável elevada no LNP, quadríceps, baço, fígado, soro e cérebro após a infecção pelo CHIKV. Os camundongos da linhagem SV129 com oito semanas, WT ou deficientes para o receptor de IFN α/β (IFN α/β ^{-/-}), foram infectados com o CHIKV (linhagem Asiática isolada de um paciente virêmico no Brasil) pela injeção i.p.i. de 10³ PFU/50 μ L em PBS. A quantificação do título viral foi obtida por ensaio de titulação usando células permissivas à infecção. Os resultados são apresentados como PFU por mg de tecido ou PFU por mL de sangue. Os grupos foram de 7-8 animais. # para p<0.05 quando comparados os animais WT e IFN α/β ^{-/-} infectados nos mesmos dias.

De maneira geral, demonstramos nesse tópico que a ausência do receptor de IFN α/β (IFNR α/β ^{-/-}) está associada a um agravamento da infecção pelo CHIKV. Durante a infecção, os camundongos IFNR α/β ^{-/-} apresentam uma elevada taxa de mortalidade e isso está associado a um agravamento de diversos os parâmetros, como aumento de ALT, recrutamento de células mono e polimorfonucleares, mediadores inflamatórios, bem como elevada replicação e disseminação do vírus.

6. DISCUSSÃO

Embora a febre Chikungunya tenha sido relatada pela primeira vez há mais de meio século, muitos aspectos acerca de sua patogênese, permanecem por ser elucidados (NG, L. F. P., 2017). Durante a última década, o CHIKV se disseminou pelo mundo de forma acentuada e, conseqüentemente, tem recebido grande atenção por parte das autoridades de saúde pública. Apesar de apresentar uma taxa de mortalidade baixa, os sintomas e a natureza crônica da febre Chikungunya são preocupantes, uma vez que resultam em queda massiva da qualidade de vida dos indivíduos acometidos e grande impacto econômico aos órgãos públicos de saúde (GANESAN *et al.*, 2017). Somado a isso, a ineficácia das medidas preventivas contra o mosquito vetor, a ausência de terapia específica, bem como a ausência de uma vacina, desencadearam, nos últimos tempos, um cenário preocupante em escala mundial (BURT *et al.*, 2017).

O estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na resposta do hospedeiro durante a infecção pelo CHIKV se mostra extremamente necessário, visto que possibilitará a identificação de potenciais alvos terapêuticos. Dados epidemiológicos e experimentais *in vitro* têm contribuído para o entendimento de questões acerca da biologia do vírus e sua interação com as células alvo (THIRUVENGADAM *et al.*, 1965; SISSOKO *et al.*, 2009; STAIKOWSKY *et al.*, 2009; PLANTE *et al.*, 2011; ROHATGI *et al.*, 2014; LONG *et al.*, 2013; KULKARNI *et al.*, 2017; ROBERTS *et al.*, 2017; HEATH *et al.*, 2018). Entretanto, o estudo da interação vírus-hospedeiro requer, pelo menos em parte, a realização de experimentos *in vivo*. Atualmente, existem poucos modelos *in vivo* de infecção pelo CHIKV que mimetizem os diversos parâmetros de doença observados durante a infecção aguda e crônica. Os modelos de infecção aguda são divididos em três categorias: a) na presença de replicação viral; b) nas manifestações da doença e; c) no desenvolvimento de artrite/miosite associada à infecção (GARDNER *et al.*, 2011; PLANTE *et al.*, 2011). Já os modelos de infecção crônica são utilizados para avaliar a persistência da infecção pelo CHIKV e a sua associação com o desenvolvimento de manifestações crônicas (HAWMAN *et al.*, 2013;

SEYMOUR *et al.*, 2015). Contudo, uma grande desvantagem destes modelos consiste na utilização de camundongos que não possuem um sistema imunológico intacto, a saber: a) camundongos recém-nascidos (2-3 dias) ou muito jovens (14 dias de idade); b) camundongos deficientes no gene de recombinação 1 (RAG1) que não possuem linfócitos; c) camundongos da linhagem NOD-SCID IL-2 $\gamma^{\text{null/-}}$ (NSG) que são deficientes em linfócitos e em células *natural Killer*; d) camundongos deficientes no receptor de interferons do tipo I (IFN $\alpha/\beta R^{-/-}$), entre outros (COUDERC *et al.*, 2008; HAWMAN *et al.*, 2013; POO *et al.*, 2014; SEYMOUR *et al.*, 2015). Diante do exposto acima, parece que o sistema imune exerce um importante papel no controle da infecção pelo CHIKV. Dessa forma, o nosso objetivo consistiu em desenvolver um modelo experimental de infecção pelo CHIKV em camundongos de linhagem imunocompetente com idade mais avançada em relação aos modelos descritos na literatura, buscando mimetizar de maneira mais fidedigna os parâmetros associados à doença e estudar os mecanismos e mediadores inflamatórios induzidos pela infecção *in vivo*.

Um parâmetro clínico importante e característico da febre Chikungunya, mas até então não abordado em outros modelos experimentais, é a dor, ou hipernocicepção inflamatória em animais experimentais. A dor é um fator patognomônico associado às artrites de diversas origens: artrite reumatóide, gota e a artrite infecciosa, por exemplo, causada por bactérias (artrite séptica) (SACHS *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2016; BOFF *et al.*, 2017; GALVÃO *et al.*, 2017). De maneira semelhante, diversos trabalhos têm associado dores articulares persistentes e muitas vezes incapacitante com a febre Chikungunya em humanos (SISSOKO *et al.*, 2009; MANIMUNDA *et al.*, 2010; DUPUIS-MAGUIRAGA *et al.*, 2012; HEATH *et al.*, 2018). A dor articular associada à artrite é decorrente da ação de mediadores inflamatórios, os quais sensibilizam os nociceptores e induzem o dano tecidual (NG, L. F. P., 2017). Dessa forma, decidimos utilizar este parâmetro clínico para definir o inóculo do vírus a ser utilizado durante a padronização do modelo. Neste trabalho, nós demonstramos que os camundongos da linhagem C57BL/6j selvagens (WT) adultos (8 semanas de idade), infectados via intraplantar pelo CHIKV, desenvolveram hipernocicepção articular inflamatória prolongada (por até 21

dias) de maneira dependente do inóculo. De forma interessante, o nosso grupo também demonstrou que a infecção pelo vírus da dengue foi capaz de induzir hipernocicepção mecânica em camundongos adultos (COSTA *et al.*, 2012). Entretanto, camundongos adultos infectados pelo CHIKV não apresentaram alterações clínicas (perda de peso e edema plantar), hematológicas (alteração nos níveis hematócrito, número de plaquetas e leucócitos totais) ou recuperação da carga viral em diversos órgãos. Observamos apenas um recrutamento de neutrófilos discretamente alterado, assim como uma discreta alteração na produção de alguns mediadores inflamatórios. Estes dados vão de acordo com a literatura que demonstra que para o estabelecimento de modelos animais murinos de infecção por diversos alfavírus, como CHIKV e *Ross River virus*, a idade do animal tem sido considerada um fator determinante na suscetibilidade e gravidade da doença. Uma vez que os camundongos neonatos e muito jovens (até 14 dias de vida) são mais susceptíveis, eles têm sido mais usados para reproduzir a doença alfaviral (MORRISON *et al.*, 2006; COURDERC *et al.*, 2008; ZIEGLER *et al.*, 2008; TAYLOR *et al.*, 2015). A resistência de camundongos adultos à infecção é devido principalmente à produção de interferons do tipo I (IFN α/β) que rapidamente exercem atividade antiviral após a infecção (RYMAN *et al.*, 2000; COURDERC *et al.*, 2008). Assim, diante dos nossos resultados e tendo conhecimento dessa limitação, optamos por uma idade intermediária e, para tanto, utilizamos camundongos da linhagem C57BL/6J WT jovens com 4 semanas de idade para a padronização do modelo. Decidimo-nos por camundongos desta idade a fim de tentar minimizar o impacto de um sistema imune muito debilitado.

Ao contrário do que foi demonstrado em diversos trabalhos (ZIEGLER *et al.*, 2008; GARDNER *et al.*, 2010; MORRISON *et al.*, 2011), os camundongos de 4 semanas infectados pelo CHIKV não apresentaram alterações de sinais clínicos como peso corporal e edema de pata durante a infecção pelo CHIKV. Entretanto, conseguimos demonstrar a ocorrência de alterações hematológicas importantes durante a infecção, a exemplo de leucopenia devido a uma linfocitopenia e o aumento no índice de hematócrito, as quais são usualmente relatadas em pacientes com febre Chikungunya (GOUPIL; MORES, 2016; Ministério da Saúde, 2017). Ainda, demonstramos a ocorrência de

hipernocicepção articular inflamatória prolongada (21 dias), bem como a diminuição do limiar de resposta a um estímulo nociceptivo térmico (placa quente) após 3 dias de infecção, o que caracteriza alteração sensorial nestes animais. Trabalhos anteriores mostram a presença de hiperalgesia térmica e mecânica em camundongos artríticos (COSTA *et al.*, 2015; NEELAKANDAN & VENKATESAN, 2016; BOFF *et al.*, 2017; CHAGAS *et al.*, 2017).

Interessantemente, não houve comprometimento motor após a infecção pelo CHIKV nestes camundongos, como verificado pelos resultados obtidos nos testes de Rotaroad e campo aberto. Estes achados divergem de trabalhos que demonstram uma redução significativa da locomoção e força motora de camundongos com artrite induzida por colágeno quando submetidos aos mesmos testes citados (GUPTA & SINGH, 2014; LEE *et al.*, 2017). Contudo, isso se deve provavelmente porque as alterações inflamatórias induzidas pela infecção pelo CHIKV são menos intensas do que aquelas observadas em outros modelos de artrite e, dessa maneira, pouco sensíveis aos testes realizados. Além disso, mediadores diferentes ou com cinética de produção diferente podem estar associado a cada uma dessas formas de artrite.

Ainda, diversos trabalhos já demonstraram que a hipernocicepção inflamatória está associada com a produção de uma cascata de mediadores inflamatórios, a exemplo de CXCL-1, IL-6, TNF- α , IL1- β e prostaglandinas em resposta a um estímulo, seja ele infeccioso ou não (CUNHA *et al.*, 2005). Nossos resultados corroboram estes achados e demonstram um elevado nível de TNF α e IL-6 encontrados no coxim plantar dos camundongos nos dias iniciais da infecção. De forma interessante, Chow e colaboradores (2011) demonstraram que os pacientes acometidos pela febre Chikungunya apresentaram um aumento da expressão de IL-6 na fase aguda e que, à medida que a doença progrediu, os altos níveis dessa citocina foram associados à artralgia persistente presente em alguns grupos. Entretanto, apesar de outros trabalhos terem também relacionado os perfis de mediadores presentes na fase crônica da doença, os mecanismos exatos pelos quais a infecção pelo CHIKV induz a hipernocicepção articular inflamatória ainda permanecem por ser elucidados (TENG *et al.*, 2015).

Outro fator associado ao desenvolvimento de dor e manifestações mais graves da doença em pacientes infectados pelo CHIKV seria a elevada carga viral no organismo e disseminação para outros órgãos, incluindo o tecido muscular e as articulações (Gardner *et al.*, 2010). Gardner e colaboradores mostraram que em camundongos WT com 6 semanas de idade, o CHIKV foi capaz de infectar diversos tecidos (como o linfonodo, tecido muscular, fígado e baço) por até 9 dias, levando os camundongos a um quadro virêmico pelo período de 4 dias. Em nosso modelo, não foi observada viremia, entretanto observamos a recuperação de partículas de vírus viáveis em diversos tecidos por até 3 dias de infecção no coxim plantar, linfonodo poplíteo, quadríceps e baço. Contudo, vale ressaltar que no estudo de Gardner e colaboradores, o vírus utilizado foi uma cepa adaptada e conseqüentemente mais virulenta, ao passo que no nosso modelo foi utilizado uma cepa isolada de um paciente virêmico e com poucas passagens em células.

Diversos trabalhos atribuem um importante papel às células mononucleares na patogênese da artralgia induzida por alfavírus, as quais são sabidamente características de um processo inflamatório crônico (MORRISON *et al.*, 2006; LIDBURY *et al.*, 2008; RULLI *et al.*, 2009;; GARDNER *et al.*, 2010; PENNY *et al.*, 2012). Contudo, em nosso modelo, observamos um infiltrado inflamatório local (coxim plantar) predominantemente polimorfonuclear, não havendo nenhum aumento de macrófagos durante a infecção pelo CHIKV. De fato, apesar do papel protetor exercido pelos neutrófilos durante as infecções, essas células também podem exercer um papel deletério levando à destruição tecidual em certas doenças crônicas, como artrite reumatóide (AR) e a gota (AMARAL *et al.*, 2016; FATTORI *et al.*, 2016). Existem diversos mecanismos pelos quais os neutrófilos contribuem para lesões articulares na artrite, como por exemplo: a) Os neutrófilos podem exacerbar a inflamação ao serem ativados por complexos imunes (como o fator reumatóide) e depositados na superfície da cartilagem articular, o que resulta em liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS), sua degranulação e atraso na apoptose; b) a produção aumentada de CXCL-2 induz o recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente a produção de RANKL, a qual é associada ao fenômeno de osteoclastogênese; c) A depleção de neutrófilos pode aumentar a produção

de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF α e IL-6) (FATTORI *et al.*, 2016).

Corroborando o elevado número de neutrófilos encontrados no coxim plantar dos animais, observamos um aumento dos níveis da quimiocina CXCL-2 no 3º dia pós infecção, a qual é um importante agente quimioatraente de neutrófilos para o sítio inflamatório (ZHANG *et al.*, 2001). Até o momento, pouco se sabe sobre o papel de neutrófilos durante a infecção pelo CHIKV e este papel necessita ser investigado. Entretanto, Poo e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos deficientes para o receptor da quimiocina CCL2 (CCR2^{-/-}) apresentaram uma exacerbação da artrite crônica induzida pelo CHIKV e isso foi relacionado com um intenso infiltrado de neutrófilos, bem como com alterações nos níveis de expressão de diversos mediadores inflamatórios (CXCL-1, CXCL22, IL-1 β e IL-10). No presente trabalho, demonstramos aumentados níveis das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL-9 no coxim plantar dos camundongos nos dias 1 a 7 após a infecção que sugerem para uma possível ativação de diversos subtipos celulares (monócitos, linfócitos T, células dendríticas, células NK, neutrófilos, eosinófilos e basófilos) durante a infecção. A caracterização fenotípica destes tipos celulares, bem como a sua cinética de ativação durante a infecção pelo CHIKV, é o nosso próximo foco de estudo. De maneira geral, o perfil de citocinas e quimiocinas encontrados em nosso trabalho está de acordo com a assinatura genérica da infecção aguda por CHIKV em todas as coortes de pacientes do mundo (TENG *et al.*, 2015), bem como com diversos modelos murinos para alfavírus (GARDNER *et al.*, 2010; LIDBURY *et al.*, 2008; SANTIAGO *et al.*, 2015).

Uma característica marcante da infecção pelo CHIKV é a ocorrência de artrite após a fase aguda da infecção (MORRISON *et al.*, 2011; GOUPIL & MORES, 2016). Nossos resultados demonstraram que a infecção pelo CHIKV resultou em alterações histopatológicas nas articulações do tornozelo e fêmuro-tibial dos camundongos. Observamos um intenso infiltrado polimorfonuclear, presença de hiperemia, presença discreta de células no espaço sinovial e escassas lacunas de reabsorção óssea. Nossos achados divergem de trabalhos que demonstram intenso infiltrado celular misto (macrófagos, células

NK, linfócitos e neutrófilos, tenossinovite grave (inflamação do tendão), necrose e miosite necrotizante (GARDNER *et al.*, 2010; MORRISON *et al.*, 2011; PEENY *et al.*, 2012). Contudo, vale ressaltar que todos esses trabalhos utilizaram camundongos com idade inferior a 21 dias de idade, bem como amostras infecciosas (adaptadas ou geneticamente construídas), ao passo que no nosso modelo foram utilizados camundongos com 4 semanas de idade e uma amostra isolada de um paciente virêmico com poucas passagens em células. Ainda, demonstramos que durante a cinética de infecção pelo CHIKV, não há a degradação e perda do tecido cartilaginoso, bem como não há a evidência da ocorrência de osteoclastogênese nos camundongos, uma vez que a razão RANKL:OPG se mostrou inalterada durante a cinética de infecção. De maneira semelhante, os poucos estudos que incluíram análise da estrutura óssea, a maioria dos pacientes infectados pelo CHIKV não apresentaram sinais radiográficos de erosão local de ossos (JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 2009). No entanto, vários relatos de caso sugerem a ocorrência de erosão óssea em alguns pacientes (MALVY *et al.*, 2009), bem como em modelos animais para alfavírus (CHEN *et al.*, 2014; 2015). Mais especificamente, Chen e colaboradores (2015) demonstraram uma redução do volume ósseo de camundongos infectados pelo CHIKV, bem como aumento da razão RANKL:OPG nas articulações desses animais e no soro de pacientes acometidos pela febre Chikungunya. Entretanto, vale ressaltar que nesse estudo (CHEN *et al.*, 2015), foram utilizados camundongos com 25 dias de idade e uma amostra infectante geneticamente construída (TSETSARKIN *et al.*, 2006).

Sabe-se que a transaminase hepática ALT está aumentada em diversas infecções virais (PAES *et al.*, 2009; PARKASH *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2012). Dessa forma, os níveis de ALT foram avaliados no soro dos camundongos como indicação de lesão hepática. Em nosso modelo, mostramos que a infecção pelo CHIKV não acarretou danos hepáticos, o que corrobora com nossos achados relacionados à carga viral, uma vez que não demonstramos viremia.

Diversos trabalhos tem demonstrado o papel protetor dos interferons do tipo I (IFN α / β) durante a infecção por alfavírus (RYMAN *et al.*, 2000;

COUDERC *et al.*, 2008; PENNY *et al.*, 2012; RUDD *et al.*, 2012; SCHILTE *et al.*, 2012). Uma vez que essas moléculas são essenciais para o controle da replicação viral, estes modelos tem sido importantes para a avaliação de potenciais terapêuticos, a exemplo de drogas antivirais. Para tanto, decidimos estabelecer um modelo experimental utilizando camundongos deficientes no receptor dos IFN-I (IFNR α / β R $^{-/-}$). Demonstramos que, enquanto os animais WT sobrevivem durante a infecção pelo CHIKV, os animais IFNR α / β R $^{-/-}$ apresentam elevada taxa de mortalidade, a qual se mostrou dependente do inóculo. De maneira similar aos dados encontrados por Couderc e colaboradores (2008), observamos que a maior letalidade e morbidade destes animais é devido principalmente a uma elevada viremia e intensa replicação viral em diferentes órgãos. Ainda, demonstramos que a mortalidade destes animais também está associada à lesão hepática, aumento no recrutamento de células mono e polimorfonucleares em diversos tecidos, bem como aumento das citocinas IFN γ e IL-6 no soro destes animais. Estes dados são semelhantes ao encontrado em modelos de outras infecções virais, a exemplo de DENV (ZUST *et al.*, 2014; SARATHY *et al.*, 2015; 2015).

Sumarizando, neste trabalho demonstramos que o modelo animal de infecção pelo CHIKV utilizando camundongos da linhagem C57BL/6J WT jovens com 4 semanas de idade foi capaz de reproduzir grande parte das manifestações associadas a doença aguda assim como ocorre em humanos. Demonstramos a ocorrência da hipernocicepção articular inflamatória associada a um intenso infiltrado inflamatório local, bem como a produção de citocinas (TNF α e IL-6) e quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL-9 e CXCL-2) sabidamente características dessa infecção. Deste modo, a padronização deste modelo permitiu identificar potenciais mediadores associados à infecção e abre novas perspectivas acerca do estudo do papel destes mediadores durante a patogênese dessa importante doença humana. Ainda neste trabalho, demonstramos que a infecção pelo CHIKV utilizando camundongos imunocomprometidos (IFNR α / β R $^{-/-}$) resulta em alta letalidade e morbidade e disseminação do vírus em diversos tecidos dos animais sendo, capaz de mimetizar um quadro de doença grave de caráter sistêmico, o que

nos permite utilizá-lo como uma plataforma para testar possíveis vacinas e antivirais.

ANEXO 1



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: 230/2017

Título do projeto: IMPLEMENTAÇÃO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO CHIKUNGUNYA VIRUS.

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Danielle da Gloria de Souza

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: **Decisão Final - Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 25/09/2017. Validade: 25/09/2017 à 24/09/2022
Belo Horizonte, 25/09/2017.

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against *Chikungunya virus*. **Antiviral Research**, v. 121, p. 59–68, 2015.
- AMARAL, F. A.; BASTOS, L. F. S.; OLIVEIRA, T. H. C.; DIAS, A. C. F.; OLIVEIRA, V. L. S.; TAVARES, L. D.; COSTA, V. V.; GALVÃO, I.; SORIANI, F. M.; SZYMKOWSKI, D. E.; RYFFEL, B.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Transmembrane TNF- α is sufficient for articular inflammation and hypernociception in a mouse model of gout. **European Journal of Immunology**, v. 46, p. 204-211, 2016.
- BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay Systems. **National Center for Biodefense and Infectious**, v 93, n. e52065, p.1-10, 2014.
- BOFF, D.; OLIVEIRA, V. L. S.; QUEIROZ JUNIOR, C. M.; SILVA, T. A.; ALLEGRETTI, M.; VERRI, W. A.; PROOST, P.; TEIXEIRA, M. M.; AMARAL, F. A. CXCR2 is critical for bacterial control and development of joint damage and pain in *Staphylococcus aureus* -induced septic arthritis in mouse. **European journal of immunology**, v. 47, p. 11, 2017.
- BURT, F. J.; CHEN, W.; MINER, J. J.; LENSCHOW, D. J.; MERITS, A.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A.; RUDD, P. A.; TAYLOR, A.; HERRERO, L. J.; ZAID, A.; NG, L. F. P.; MAHALINGAM, S. *Chikungunya virus*: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 107–117, 2017.
- CASTRO, A. P. C. R.; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. D. S. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p. 299–302, 2016.
- CHAGAS, P. M.; FULCO, B. C. W.; SARI, M. H. M.; ROEHRS, J. A.; NOGUEIRA, C. W. Bis(phenylimidazoselenazoly) diselenide elicits antinociceptive effect by modulating myeloperoxidase activity, NO_x and NF κ B levels in the collagen-induced arthritis mouse model. **J Pharm Pharmacol**, v. 69, n.8, p. 1022-1032, 2017.
- CHEN, W.; FOO, S.; RULLI, N. E.; TAYLOR, A.; SHENG, K. C.; HERRERO, L. J.; HERRING, B. L.; LIDBURY, B. A.; LI, R. W.; WALSH, N. C.; SIMS, N. A.; SMITH, P. N.; MAHALINGAM, S. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. 6040–6045, 2014.
- CHEN, W.; FOO, S.; TAYLOR, A.; LULLA, A.; MERITS, A.; HUESTON, L.; FORWOOD, M. R.; WALSH, N. C.; SIMS, N. A.; HERRERO, L. J.; MAHALINGAM, S. Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein

Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by *Chikungunya virus* Infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 581–593, 2015.

CHOW, A.; HER, Z.; ONG, E. K. S.; CHEN, J. M.; DIMATATAC, F.; KWEK, D. J. C.; BARKHAM, T.; YANG, H.; RÉNIA, L.; LEO, Y. S.; NG, L. F. P. Persistent Arthralgia Induced by *Chikungunya virus* Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

COSTA, V. V.; AMARAL, F.; COELHO, F. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MALAGOLI, B. G.; GOMES, J. H. S.; LOPES, F.; SILVEIRA, K. D.; SACHS, D.; FAGUNDES, C. T.; TAVARES, L. D.; PINHO, V.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. M.; BRAGA, F. C.; SOUZA, D. G. Lithothamnion muelleri Treatment Ameliorates Inflammatory and Hypernociceptive Responses in Antigen-Induced Arthritis in Mice. **Plos One**, v. 10, 2015.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T. ; VALADÃO, D. F.; ÁVILA, T. V.; CISALPINO, D.; ROCHA, R. F.; RIBEIRO, L. S.; ASCENÇÃO, F. R.; KANGUSSU, L. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; ASTIGARRAGA, R. G.; GOUVEIA, F. L.; SILVA, T. A.; BONAVENTURA, D.; DE ALMEIDA, D. S.; LEITE, A. C. L.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of *Dengue virus* infection induces severe disease in immunocompetent mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, p. 231-250, 2014.

COSTA, V. V.; FAGUNDES, C. T.; VALADÃO, D. F.; CISALPINO, D.; DIAS, A. C. F.; SILVEIRA, K. D.; KANGUSSU, L. M.; AVILA, T. V.; BONFIM, M. R.; BONAVENTURA, D. SILVA, T. A.; SOUSA, L. P.; RACHID, M.; VIEIRA, L. Q.; MENEZES, G. B.; PAULA, A. M.; ATRASHEUSKAYA, A.; IGNATYEV, G.; TEIXEIRA, M. M.; SOUZA, D. G. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN- γ in Host Resistance to Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

COUDERC, T.; CHRÉTIEN, F.; SCHILTE, C.; DISSON, O.; BRIGITTE, M.; GUIVEL-BENHASSINE, F. A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 2, 2008.

COUDERC, T.; GANGNEUX, N.; CHRÉTIEN, F.; CARO, V.; LUONG, T. L.; DUCLOUX, B.; TOLOU, H.; LECUIT, M.; GRANDADAM, M. *Chikungunya virus* infection of corneal grafts. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 851–859, 2012.

CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S. *Chikungunya virus*: clinical aspects and treatment - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523–531, 2017.

CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 102, n.5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M.; VIVANCOS, G. G.; VERRI JUNIOR, W. A.; SCHIVO, I. R. S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirao Preto, v. 37, n.3, p. 391-399, 2004.

DANKS, L.; TAKAYANAGI, H. Immunology and bone. **J Biochem.**, v. 154, p. 29–39, 2013.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L.; NORET, M.; BRUN, S.; GRAND, R. L.; GRAS, G.; ROQUES, P. Chikungunya disease: Infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, 2012.

FATTORI, V.; AMARAL, F. A.; VERRI, W. A. Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. **Pharmacological Research**, v. 1, p. 1, 2016.

GALÁN-HUERTA, K. A.; RIVAS-ESTILLA, A. M.; FERNÁNDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J. A.; RAMOS-JIMÉNEZ, J. *Chikungunya virus*: A general overview. **Medicina Universitaria**, v. 17, n. 68, p. 175–183, 2015.

GALVÃO, I.; VAGO, J. P.; BARROSO, L. C.; TAVARES, L. P.; QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; COSTA, V. V.; CARNEIRO, F. S.; FERREIRA, T. P.; SILVA, P. M. R.; AMARAL, F. A.; SOUSA, L. P.; TEIXEIRA, M. M. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. **European Journal of Immunology**, v. 47, p. 585-596, 2017.

GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. *Chikungunya virus*: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses**, v. 9, n. 12, p.368, 2017

GARDNER, J.; ANRAKU, I.; LE, T. T.; LARCHER, T.; MAJOR, L.; ROQUES, P. SCHRODER, W. A.; HIGGS, S.; SUHRBIER, A. *Chikungunya virus* Arthritis in Adult Wild-Type Mice. **Journal of Virology**, v. 84, n. 16, p. 8021–8032, 2010.

GÉRARDIN, P.; BARAU, G.; MICHAULT, A.; BINTNER, M.; RANDRIANAIVO, H.; CHOKER, G.; LENGLET, Y.; TOURET, Y.; BOUVERET, A.; GRIVARD, P.; ROUX, K. L.; BLANC, S.; SCHUFFENECKER, I.; COUDERC, T.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; LECUIT, M.; ROBILLARD, P. Y. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child *Chikungunya virus* infections on the island of La Réunion. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. 0413–0423, 2008.

GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A Review of *Chikungunya virus* induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. **The open rheumatology journal**, v. 10, p. 129–140, 2016.

GUPTA, A.; SINGH, S. Evaluation of anti-inflammatory effect of *Withania somnifera* root on collagen-induced arthritis in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 3, p. 308-320, 2014.

HAWMAN, D. W.; STOERMER, A. K.; MONTGOMERY, S. A.; PAL, P.; OKO, L.; DIAMOND, M. S.; MORRISON, T. E. Chronic Joint Disease Caused by Persistent *Chikungunya virus* Infection Is Controlled by the Adaptive Immune Response. **Journal of Virology**, v. 87, n. 24, p. 13878 –13888, 2013.

HEATH, C. J.; LOWTHER, J.; NOËL, T. P.; MARK-GEORGE, I.; BOOTHROYD, D. B.; MITCHELL, G.; MACPHERSON, C.; DESIREE LABEAUD, A. The Identification of Risk Factors for Chronic *Chikungunya* Arthralgia in Grenada, West Indies: A Cross-Sectional Cohort Study. **Open Forum Infect Dis**, v. 5, n. 1, 2018.

HER, Z.; KAM, Y. W.; LIN, R. T. P.; NG, L. F. P. *Chikungunya*: a bending reality. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1165–1176, 2009.

HOARAU, J. J.; JAFFAR, B. M. C.; KREJBICH, T.; LI-PAT-YUEN, G.; DASSA, B. Persistent chronic inflammation and infection by *Chikungunya* arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **J Immunol**, b. 184, n. 10, p. 5914-27, 2010.

HOARAU, J.; GAY, F.; PELLE, O.; SAMRI, A.; JAFFAR-BANDJEE, M.; GASQUE, P.; AUTRAN, B. Identical Strength of the T Cell Responses against E2 , nsP1 and Capsid CHIKV Proteins in Recovered and Chronic Patients after the Epidemics of 2005-2006 in La Reunion Island. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–9, 2013.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; DAS, T.; HOARAU, J. J.; KREJBICH, T. P.; DENIZOT, M.; RIBERA, A., et al. *Chikungunya virus* takes centre stage in virally induced arthritis: possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. **Microbes Infect**, v. 11, p. 1206–1218, 2009.

KOTAKE, S.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N.; MATSUZAKI, K.; ITOH, K.; ISHIYAMA, S.; SAITO, S.; INOUE, K.; KAMATANI, N.; GILLESPIE, M. T.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J. Clin Invest.**, v. 103, n. 9, p. 1345-52, 1999.

KULCSAR, K. A.; BAXTER, V. K.; GREENE, I. P.; GRIFFIN, D. E. Interleukin 10 modulation of pathogenic Th17 cells during fatal alphavirus

encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 16053–16058, 2014.

KULKARNI, S. P.; GANU, M.; JAYAWANT, P.; THANAPATI, S.; GANU, A.; TRIPATHY, A. S. Regulatory T cells and IL-10 as modulators of chikungunya disease outcome: a preliminary study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 36, n. 12, p. 2475-2481, 2017.

LEE, M.; KANG, J.; GO, R.; BYUN, Y.; WI, Y. J.; HWANG, H.; CHOI, J.; KIM, H.; CHOI, K.; NAM, K. Collagen-Induced Arthritis Analysis in Rhd2 Knockout Mouse. **Biomol Ther**, 2017.

LIDBURY, B. A.; RULLI, N. E.; SUHRBIER, A.; SMITH, P. N.; MCCOLL, S. R.; CUNNINGHAM, A. L., et al. Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus. **J Infect Dis.**, v. 197, n. 11, p. 1585–93, 2008.

LONG, K. M.; WHITMORE, A. C.; FERRIS, M. T.; SEMPOWSKI, G. D.; MCGEE, C.; TROLLINGER, B., et al. Dendritic cell immunoreceptor regulates *Chikungunya virus* pathogenesis in mice. **Journal of Virology.**, v. 87, n. 10, p. 5697–706, 2013.

MALVY, D.; EZZEDINE, K.; MAMANI-MATSUDA, M.; AUTRAN, B.; TOLOU, H.; RECEVEUR, M. C., et al. Destructive arthritis in a patient with *Chikungunya virus* infection with persistent specific IgM antibodies. **BMC Infect Dis**, v.9, n. 200, 2009.

MANIMUNDA, S. P.; VIJAYACHARI, P.; UPPOOR, R.; SUGUNAN, A. P.; SINGH, S. S.; RAI, S. K.; SUDEEP, A. B.; MURUGANANDAM, N.; CHAITANYA, I. K.; GURUPRASAD, D. R. Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 104, p. 392–399, 2010.

MARTIN, R. F., HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. V. The incidence of behavior derangements resulting from air-blast stimulation in emotional and non-emotional strains of rats. **Journal of Comparative Psychology**, v. 32, n. 1, p. 191-204, 1941.

MATHEW, A. J.; GANAPATI, A.; KABEERDOSS, J.; NAIR, A.; GUPTA, N.; CHEBBI, P.; MANDAL, S. K.; DANDA, D. Chikungunya Infection: a Global Public Health Menace. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 17, n. 2, p. 1–9, 2017.

MORRISON, T. E.; OKO, L.; MONTGOMERY, S. A.; et al. A mouse model of *Chikungunya virus*-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of

arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. **Am J Pathol**, v. 178, p. 32–40, 2011.

MORRISON, T. E.; WHITMORE, A. C.; SHABMAN, R. S.; LIDBURY, B. A.; MAHALINGAM, S.; HEISE, M. T. Characterization of *Ross River virus* tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis. **Journal of Virology**, v. 80, p. 737–749, 2006.

NEELAKANDAN, Y.; VENKATESAN, A. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of sulfated polysaccharide fractions from *Sargassum wightii* and *Halophila ovalis* in male Wistar rats. **Indian J Pharmacol**, v. 48, n. 5, p. 562-570, 2016.

NG, L. C.; HAPUARACHCHI, H. C. Tracing the path of *Chikungunya virus* Evolution and adaptation. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 876–885, 2010.

NG, L. F. P. Immunopathology of *Chikungunya virus* Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. **Annual Review of Virology**, v. 4, n. jun., p. 5.1-5.15, 2017.

NORET M.; HERRERO L.; RULLI N.; ROLPH M.; SMITH P. N.; LI R. W.; ROQUES P.; GRAS G.; MAHALINGAM S. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by *Chikungunya virus* infected human osteoblasts. **J Infect Dis.**, v. 206, n. 1, p. 455--9, 2012.

PAES, M. V., et al. Hepatic damage associated with *Dengue-2 virus* replication in liver cells of BALB/c mice. **Lab Invest**, n. 89, p. 1140–1151, 2009.

PARKASH O.; ALMAS, A.; JAFRI, S. W.; HAMID, S.; AKHTAR, J.; ALISHAH, H. Severity of acute hepatitis and its outcome in patients with dengue fever in a tertiary care hospital Karachi, Pakistan. **BMC Gastroenterol**, v. 10, n. 1, p. 43, 2010.

PAROLA, P.; LAMMBALLERIE, X.; JOURDAN, J.; ROVERY, C.; VAILLANT, V.; MINODIER, P.; BROUQUI, P.; FLAHAUT, A.; RAOULT, D.; CHARREL, R. N. Novel *Chikungunya virus* variant in travelers returning from Indian Ocean islands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1493–1499, 2006.

PENNY, A.; RUDD, A. B.; JANE W. A. C.; JOY GARDNER, A.; THIBAUT L. D.; CANDICE B. D.; THUY T.; LE, A.; ITARU, A. A.; YUTARO; K. I.; YUEH-MING, L. F.; MICHAEL, G. J. R.; SHIZUO, A. E.; ALEXANDER, A.; KHROMYKH, B.; ANDREAS S. Interferon Response Factors 3 and 7 Protect against *Chikungunya virus* Hemorrhagic Fever and Shock. **Journal of Virology**, v. 86, n. 18, p. 9888–9898, 2012.

PLANTE, K.; WANG, E.; PARTIDOS, C. D.; et al. Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. **PLoS Pathog**, v.7, n. 28, 2011.

POO, Y. S.; NAKAYA, H.; GARDNER, J.; LARCHER, T.; SCHRODER, W. A.; LE, T. T.; MAJOR, L. D.; SUHRBIER, A. CCR2 Deficiency Promotes Exacerbated Chronic Erosive Neutrophil-Dominated *Chikungunya virus* Arthritis. **Journal of Virology**, v. 88, n. 12, p. 6862–6872, 2014.

POO, Y. S.; RUDD, P. A.; GARDNER, J.; et al. Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic *Chikungunya virus* infection. **PLoS Negl Trop Dis**; v. 8, n. e3354, 2014.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; MADEIRA, M. F. M. ; COELHO, F. M. ; COSTA, V. V.; BESSONI, R. L. C. ; SOUSA, L. F. D. C. ; GARLET, G. P. ; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. ; SILVA, T. A. Experimental Arthritis Triggers Periodontal Disease in Mice: Involvement of TNF- α and the Oral Microbiota. **The Journal of Immunology**, v. 187, p. 3821-3830, 2011.

ROBERTS, G. C.; ZOTHNER, C.; REMENYI, R.; MERITS, A.; STONEHOUSE, N. J.; HARRIS, M. Evaluation of a range of mammalian and mosquito cell lines for use in *Chikungunya virus* research. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 14641, 2017.

ROHATGI, A.; CORBO, J. C.; MONTE, K.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D. L.; KARDON, G.; LENSCHOW, D. J. Infection of Myofibers Contributes to Increased Pathogenicity during Infection with an Epidemic Strain of *Chikungunya virus*. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2414–2425, 2014.

ROZAS, G.; GUERRA, M. J.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 2, n. 1, p. 75-84, 1997.

RUDD, P. A.; WILSON, J.; GARDNER, J.; et al. Interferon response factors 3 and 7 protect against *Chikungunya virus* hemorrhagic fever and shock. **Journal of Virology**, v.86, p. 9888–98, 2012.

RULLI, N. E.; Guglielmotti, A.; MANGANO, G.; ROLPH, M. S.; APICELLA, C.; ZAID, A.; SUHRBIER, A.; MAHALINGAM, S. Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 8, p. 2513–2523, 2009.

RULLI, N. E.; ROLPH, M. S.; SRIKIATKHACHORN, A.; ANANTAPREECHA, S.; GUGLIELMOTTI, A.; MAHALINGAM, S. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute *Chikungunya virus* disease by bindarit, an inhibitor of

monocyte chemotactic protein-1 synthesis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1026–1030, 2011.

RYMAN, K. D.; KLIMSTRA, W. B.; NGUYEN, K. B.; BIRON, C. A.; JOHNSTON, R. E. Alpha/beta interferon protects adult mice from fatal *Sindbis virus* infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. **Journal of Virology**, v. 74, p. 3366-3378, 2000.

SACHS, D.; COELHO, F. M.; COSTA, V. V.; LOPES, F.; PINHO, V.; AMARAL, F. A.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, A. L.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. **Br J Pharmacol** v. 162, n. 1; p. 72-83, 2011.

SANTIAGO, F. W., HALSEY, E. S., SILES, C. et al. Long-Term Arthralgia after *Mayaro virus* Infection Correlates with Sustained Pro-inflammatory Cytokine Response. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1–14, 2015.

SARATHY VV, INFANTE E, LI L, CAMPBELL GA, WANG T, PAESSLER S. Characterization of lethal *Dengue virus* type 4 (DENV-4) TVP-376 infection in mice lacking both IFN- α/β and IFN- γ receptors (AG129) and comparison with the DENV-2 AG129 mouse model. **J Gen Virol**, v. 96, n. 10, p. 3035-3048, 2015.

SARATHY, V. V.; MILLIGAN, G. N.; BOURNE, N.; BARRETT, A. D. Mouse models of *Dengue virus* infection for vaccine testing. **Vaccine**, v. 33, n. 50, p.7051-7060, 2015.

SCHILTE, C.; BUCKWALTER, M. R.; LAIRD, M. E.; DIAMOND, M. S.; SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Cutting edge: independent roles for IRF-3 and IRF-7 in hematopoietic and nonhematopoietic cells during host response to chikungunya infection. **J Immunol** , n. 188, p. 2967–71, 2012.

SCHWAMEIS, M.; BUCHTELE, N.; WADOWSKI, P. P.; SCHOERGENHOFER, C.; JILMA, B. Chikungunya vaccines in development. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 716–731, 2016.

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

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica (SE) 53, 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 3, 2015.

Disponível em: <
<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at---SE-53.pdf>>

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 3, 2016.

Disponível em: <
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>>

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 3, 2017.

Disponível em: <
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/06/2017-002-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-52--2016.pdf>>.

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 29, 2017.

Disponível em: <
<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/15/2017-028-Monitoramento-dos-casos-de-dengue--febre-de-chikungunya-e-febre-pelo-virus-Zika-ate-a-Semana-Epidemiologica-35.pdf>>

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 45, 2017.

Disponível em: <
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/10/2017-046-Publicacao.pdf>

SEYMOUR, R. L.; ADAMS, A. P.; LEAL, G.; ALCORN, M. D.; WEAVER, S. C.; A rodent model of *Chikungunya virus* infection in RAG1 -/- mice, with features of persistence, for vaccine safety evaluation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. e0003800, 2015.

SIMMONS, G.; BRÉS, V.; LU, K.; LISS, N. M.; BRAMBILLA, D. .; RYFF, K. R.; BRUHN, R.; VELEZ, E.; OCAMPO, D.; LINNEN, J. M.; LATONI, G.; PETERSEN, L. R.; Williamson, P. C.; BUSCH, M. P. High incidence of *Chikungunya virus* and frequency of viremic blood donations during epidemic, Puerto Rico, USA, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p. 1221–1228, 2016.

SISSOKO, D.; MALVY, D.; EZZEDINE, K., et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. e389, 2009.

SOURISSEAU, M.; SCHILTE, C.; CASARTELLI, N.; TROUILLET, C.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; RUDNICKA, D.; SOL-FOULON, N.; LEROUX, K.; PREVOST, M. C.; FSIHI, H.; FRENKIELS, M. P.; BLANCHET, F.; AFONSO, P. V.; CECCALDI, P. E.; OZDEN, S. GESSAIN, A.; SCHUFFERNECKER, I.; VERHASSELT, B.; ZAMBORLINI, A.; SAIB, A.; REY, F. A.; ARENZANA-SEISDEDOS, F.; DESPRE, P.; MICHAULT, A.; ALBERT, M. L.; SCHWARTZ, O. Characterization of reemerging *Chikungunya virus*. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.

SOUZA, D. G.; SOARES, A. C.; Pinho, V.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R.; TEIXEIRA, M. M. The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **Journal of Immunology**, v. 173, p. 4137-4146, 2004.

STAIKOWSKY, F.; TALARMIN, F. O.; GRIVARD, P.; SOUAB, A.; SCHUFFENECKER, I.; LE ROUX, K.; LECUIT, M.; MICHAULT, A. Prospective study of Chikungunya virus acute infection in the Island of La Réunion during the 2005-2006 outbreak. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

TAYLOR, A.; HERRERO, L. J.; RUDD, P. A., et al. Mouse models of alphavirus-induced inflammatory disease. **J Gen Virol**, v. 96, p. 221–238, 2015.

TENG, T. S.; KAM, Y. W.; LEE, B.; HAPUARACHCHI, H. C.; WIMAL, A.; NG, L. C.; NG, L. F. P. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute *Chikungunya virus* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 12, p. 1925–1935, 2015.

THIRUVENGADAM, K. V.; KALYANASUNDARAM, V.; RAJGOPAL, J. Clinical and pathological studies on Chikungunya fever in Madras city. **Indian J Med Res**, v. 53, n. 8, p. 729-44, 1965.

TSETSARKIN, K.; HIGGS, S.; MCGEE, C. E.; DE LAMBALLERIE, X.; CHARREL, R. N.; Infectious clones of *Chikungunya virus* (La Reunion isolate) for vector competence studies. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v.6, p. 325–337, 2006.

VELOSA, A. P. P.; TEODORO, W. R.; YOSHINARI, N. H. Colágeno na cartilagem osteoartrítica. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 160-166, 2003.

WAHID, B.; ALI, A.; RAFIQUE, S.; IDREES, M. Global expansion of *Chikungunya virus*: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 58, p. 69–76, 2017.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. *Chikungunya virus* and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**, v. 372, p. 1231–1239, 2015.

WEAVER, S. C.; OSORIO, J. E.; LIVENGOOD, J. A.; CHEN, R.; STINCHCOMB, D. T. *Chikungunya virus* and prospects for a vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1087–1101, 2012.

WHITE, F. A.; BHANGOO, S. K.; MILLER, R. J. Chemokines: Integrators of pain and inflammation. **Nature Reviews/ Drug Discovery**, v.4, p.834-844, 2005.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.

ZELLER, H.; VAN BORTEL, W.; SUDRE, B. Chikungunya: Its history in Africa and Asia and its spread to new regions in 2013-2014. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. Suppl 5, p. S436–S440, 2016.

ZIEGLER, S. A.; LU, L.; DA ROSA, A. P.; XIAO, S. Y.; TESH, R. B. An animal model for studying the pathogenesis of *Chikungunya virus* infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, p. 133–139, 2008.

ZUST R, et al. Type I interferon signals in macrophages and dendritic cells control infection: implications for a new mouse model to test dengue vaccines. **Journal of Virology**, v. 88, p. 7276–7285, 2014.