



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA E BIOFÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLÓGIA E FARMACOLOGIA

SIMONE DE ARAÚJO LIMA

**Papel da via de sinalização da Anexina A1 - FPR2 /
ALX na patogênese da infecção pelo vírus Chikungunya**

Belo Horizonte

2021

SIMONE DE ARAÚJO LIMA

**Papel da via de sinalização da Anexina A1 - FPR2 /
ALX na patogênese da infecção pelo vírus Chikungunya**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa

Belo Horizonte

2021

043 Lima, Simone de Araújo.
Papel da via de sinalização da Anexina A1 - FPR2 / ALX na patogênese da infecção pelo vírus Chikungunya [manuscrito] / Simone de Araújo Lima. - 2021.
131 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira. Co-orientadora: Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Farmacologia. 2. Febre de Chikungunya. 3. Inflamação. 4. Anexina A1. 5. Receptores de Formil Peptídeo. I. Teixeira, Mauro Martins. II. Litwinski, Vivian Vasconcelos Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE TESE DE SIMONE DE ARAÚJO LIMA

"Papel da Via de Sinalização da Anexina A1 - FPR2 / ALX na Patogênese da Infecção pelo Vírus Chikungunya"

SIMONE DE ARAÚJO LIMA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **25 de agosto de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

- Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
- Profa. Dra. Vanessa Pinho da Silva**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais
- Prof. Dr. Fernando Carvalho Lopes**, McGill/Canadá
- Prof. Dr. Rafael Elias Marques Pereira Silva**, CNPEM/Universidade Estadual de Campinas
- Prof. Dra. Vivian Vasconcelos Costa**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Coorientadora
- Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientador

Belo Horizonte, 25 de agosto de 2021

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Mauro Martins Teixeira, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2021, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Lopes, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stéfany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2021, às 14:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Elias Marques Pereira Silva, Usuário Externo**, em 30/08/2021, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Pinho da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 30/08/2021, às 17:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 02/09/2021, às 14:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0909535** e o código CRC **13D2A273**.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, contando com o apoio financeiro do CNPq, da CAPES e da FAPEMIG.

A Deus, por ter me proporcionado resiliência e garra para chegar até aqui. Ao Erick, pelo incentivo e apoio de todos os dias. A minha família por sempre me encorajar a ir mais além.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Mauro Martins Teixeira, pelos ensinamentos, orientação e pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa.

À professora Dra. Vivian Vasconcelos, pelo suporte científico, receptividade, solicitude e orientação sempre que precisei.

À professora Dra. Danielle de Souza, por ter me recebido tão carinhosamente no seu laboratório.

À Ilma Marçal, Frankinéia e Rosemeire Oliveira pelo apoio técnico.

Aos professores Stêfany Cau, Flávio Amaral e Lirlândia Pires, pelas excelentes sugestões durante o Exame de Qualificação.

Ao Victor Costa, pela ajuda na maioria dos experimentos. Tenho imensa gratidão!

As minhas colegas de bancada e companheiras de discussões científicas: Fran, Carla e Thaiane, pela presteza e amizade quando mais precisei.

Ao Gabriel Campolina, ao Franciel e ao Caio Bonilha pela disponibilidade e colaboração nos experimentos.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

À UFMG e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, pela oportunidade de realizar o meu doutorado nesta instituição.

Ao meu esposo Érick Bryan, pelo companheirismo e compreensão durante todos esses anos de pesquisa.

As minhas irmãs e a minha sobrinha Cristal, pelo amor e boas conversas.

A minha família e a família do Erick, pelo cuidado que se estende.

A todos que de alguma forma, direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

LIMA, S.A. ***Papel da via de sinalização da Anexina A1 - FPR2 / ALX na patogênese da infecção pelo vírus Chikungunya.*** Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2021, 131f.

Introdução: O Chikungunya (CHIKV) é um alfavírus artritogênico que causa uma doença autolimitada geralmente acompanhada por dores nas articulações e / ou poliartralgia com características incapacitantes. Evidências sugerem que as respostas imunes elaboradas durante a fase aguda da infecção por CHIKV determinam o grau de progressão e resolução da doença. Além das intervenções terapêuticas disponíveis serem limitadas, o estudo das vias da resolução da inflamação no contexto da infecção pelo CHIKV pode levar à geração de novos alvos terapêuticos. A Anexina A1 (AnxA1) é uma proteína envolvida na resolução da inflamação que regula as funções de uma variedade de células do sistema imunológico pela ligação ao seu receptor, FPR2/ALX. Neste estudo, avaliamos o potencial da AnxA1 como um alvo terapêutico para a infecção por CHIKV. **Objetivo:** Avaliar o papel da AnxA1 e FPR2 durante a infecção por CHIKV em camundongos. **Métodos:** Camundongos nocaute para AnxA1 (AnxA1^{-/-}) ou FPR2 (Fpr2/3^{-/-}) assim como os seus controles do tipo selvagem (WT) foram infectados com CHIKV 10⁶ PFU por meio de injeção intraplantar ou foram tratados profilaticamente ou terapêuticamente com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆, 150 µg / animal, i.p.). Foram avaliados os níveis de mediadores inflamatórios, o acúmulo de células imunes na pata ou no linfonodo poplíteo (pLN), o título viral, o dano histopatológico na pata, bem como os parâmetros de hipernocicepção mecânica e edema de pata. **Resultados:** Os camundongos AnxA1^{-/-} apresentaram inflamação exacerbada com níveis aumentados de MPO, CXCL1 e IL-6; maior acúmulo de células CD11b⁺Ly6G⁺ na pata no 2º dia pós-infecção (dpi) e maior acúmulo de células dendríticas convencionais tipo 1 (cDCs1) e células T CD8⁺ na pata no 7º dpi, quando comparados com animais WT. A deficiência de AnxA1 aumentou a depuração viral nos órgãos de camundongos, agravou o dano tecidual na pata, mas não alterou o fenótipo da hipernocicepção e edema de pata induzidos pelo vírus. Os camundongos Fpr2/3^{-/-} exibiram um fenótipo de doença semelhante ao encontrado em camundongos AnxA1^{-/-}, com níveis aumentados de MPO no coxim plantar, maior

depuração viral em alguns órgãos e dano tecidual exacerbado na pata quando comparados aos animais WT. Curiosamente, a hipernocicepção mecânica foi mais prolongada sob a deficiência do receptor da AnxA1. O tratamento de camundongos WT com o peptídeo Ac₂₋₂₆ diminuiu a inflamação, reduzindo os níveis de MPO, CXCL1 e IL-6 no coxim plantar. Além disso, o Ac₂₋₂₆ diminuiu o acúmulo de células CD11b⁺Ly6G⁺ na pata e reduziu a porcentagem de células T CD4⁺ no pLN de camundongos infectados com CHIKV 2dpi, reduzindo o pico do edema de pata e diminuindo a hipernocicepção mecânica observada durante a infecção. **Conclusão:** Em conjunto, esses resultados indicam o papel relevante da AnxA1 na infecção por CHIKV e propõe o direcionamento da via AnxA1-FPR2/ALX como uma possível estratégia terapêutica para controlar a inflamação aguda induzida pelo CHIKV.

Palavras-Chave: AnxA1.FPR2. Resolução da inflamação. Chikungunya.

ABSTRACT

LIMA, S.A. *The role of AnxA1-Fpr2/ALX Signaling Axis in the pathogenesis of Chikungunya virus*. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil, 2021, 131f

Introduction: Chikungunya (CHIKV) is an arthritogenic alphavirus that causes a self-limiting disease usually accompanied by joint pain and/or poly-arthralgia with disabling characteristics. Evidence suggests that immune responses mounted during the acute phase of CHIKV infection determine the degree of disease progression and resolution. In addition to the limited available therapeutic interventions, the study of inflammation resolution pathways in the context of CHIKV infection could lead to the generation of new therapeutic interventions. Annexin A1 (AnxA1) is a soluble protein involved in inflammation resolution that regulates functions of a variety of immune cells by binding to formyl peptide receptor 2 (FPR2/ALX). In this study we evaluated the potential of the AnxA1 as a therapeutic target for CHIKV infection. **Objective:** To evaluate the role of AnxA1 and FPR2 during CHIKV infection in mice. **Methods:** AnxA1, Fpr2/3 knockout (KO) or wild-type (WT) mice were infected with CHIKV 10^6 PFU through footpad injections and treated prophylactically or therapeutically with AnxA1 mimetic peptide (Ac₂₋₂₆, 150µg / animal, i.p). The level of inflammatory mediators, accumulation of immune cells in the paw or in the popliteal lymph node (pLN), the viral titer, the histopathological damage in the paw, as well as the parameters of mechanical hypernociception and paw edema were evaluated. **Results:** AnxA1 KO mice showed uncontrolled inflammation with increased levels of MPO, CXCL1 and IL-6 and greater accumulation of CD11b⁺Ly6G⁺ cells in the paw on the 2nd day post-infection (dpi) and increased accumulation of type 1 conventional dendritic cells (cDCs1) and CD8⁺ T cells in the paw 7 dpi when compared to WT animals. AnxA1 deficiency increased viral clearance in the organs of mice, aggravated tissue damage in the paw, but did not change the phenotype of virus-induced hypernociception and paw edema. Fpr2/3 KO mice exhibited a disease phenotype similar to the one found in AnxA1 KO mice with increased levels of MPO in the footpad, greater viral clearance in some organs and exacerbated tissue damage in the paw when compared to WT animals. Interestingly, mechanical hypernociception was more prolonged under AnxA1 receptor deficiency. Treatment of WT-infected mice with Ac₂₋₂₆ decreased inflammation by controlling the levels of MPO, CXCL1 and IL-6 in the footpad. Furthermore, Ac₂₋₂₆ decreased the

accumulation of CD11b⁺Ly6G⁺ cells in the paw and reduced the percentage of CD4⁺ T cells in the pLN of mice infected with CHIKV 2 dpi, reducing the peak of paw edema and decreasing the mechanical hypernociception observed during the infection. **Conclusion:** Taken together, these findings indicate the relevant role of AnxA1 pathway in CHIKV infection and proposes the AnxA1-FPR2/ALX pathway as a possible therapeutic strategy to control virus-induced acute inflammation induced by CHIKV infection.

Keywords: AnxA1.FPR2. Inflammation resolution. Chikungunya.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE: anti-inflamatório não esteroide

ANOVA: análise de variância

AnxA1: *annexin A1* - anexina A1

BALB/c: linhagem de camundongos albinos

BMDM: *bone marrow-derived macrophages* - macrófagos derivados da medula óssea

C57BL/6: linhagem de camundongos black

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCL2: *C-C motif chemokine ligand 2* – proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1)

CHIKF: febre chikungunya

CHIKV: vírus Chikungunya

cm: centímetro

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX: cicloxigenase

CXCL1: *chemokine (C-X-C motif) ligand 1 or keratinocyte-derived chemokine (KC)*

DCs - dendritic cells – células dendríticas

DENV: vírus da dengue

DMSO – dimetilsulfóxido

dpi: dia pós-infecção

ECSA – *East / Central / South/Africa* - linhagem do leste-centro-sul africana

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EPM: erro padrão da média

FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FPR: *formyl peptide receptor* - receptor de formil peptídeo

GPCR: *G protein coupled receptors* – receptor transmembrânico acoplado à proteína G

hpi: horas pós-infecção

hrAnxA1: AnxA1 recombinante humana

i.p.: intraperitoneal

IAV: vírus influenza A

IL- (): *Interleukin* - interleucina-()

IRF (): - *interferon regulatory factor* - fator regulador de interferon

Kg: quilograma

KO: *knockout* – geneticamente modificado

LPS: lipopolissacarídeo

MDA5: *melanoma differentiation-associated gene 5* - gene associado à diferenciação de melanoma 5

mg: miligrama

mL: mililitro

mm: milímetro

MPO: mieloperoxidase

NETs: *neutrophil extracellular traps* – armadilhas extracelulares de neutrófilos

ng: nanograma

NK: *Natural Killer Cell* – células exterminadoras naturais

OD: densidade óptica

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell* - célula mononuclear do sangue periférico

PBS: *phosphate-Buffered Saline* – tampão fosfato salina

PFU: unidades formadoras de placas

PGE₂: prostaglandina E2

PLA₂: *phospholipase A₂* - fosfolipase A₂

PMN: *polymorphonuclear* – leucócitos polimorfonucleares

PRRs: receptores de reconhecimento de patógenos

RIG-I: *retinoic acid-inducible gene* - gene I induzível pelo ácido retinoico

RNA: *ribonucleic acid* – ácido ribonucleico

ROS: *oxigen-reactive species* - espécies reativas de oxigênio

SFB: soro fetal bovino

TBS: *tris-buffered saline* - Solução salina tamponada com Tris

TLRs (): receptores do tipo *Toll*

TMB: 3,3,5,5 - tetrametilbenzidina

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

VERO: células epiteliais derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)

WT: *wild type* – fenótipo selvagem (natural)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cenário global da distribuição dos genótipos de CHIKV pelos continentes.....	22
Figura 2: Representação esquemática do ciclo de replicação do CHIKV na célula hospedeira.....	24
Figura 3: Reconhecimento do CHIKV por células do sistema imune.....	27
Figura 4: Representação esquemática dos efeitos da Anexina A1 na resolução da inflamação.....	42
Figura 5: Delineamento experimental.....	52
Figura 6: Esquemas terapêuticos com Ac ₂₋₂₆ em camundongos infectados com CHIKV.....	54
Figura 7: Níveis de mediadores inflamatórios no coxim plantar de camundongos BALB/c infectados com 10 ⁶ PFU de CHIKV.....	63
Figura 8: Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos WT infectados pelo CHIKV.....	64
Figura 9: Hipernocicepção mecânica e edema de pata induzidos pelo CHIKV.....	66
Figura 10: Fotomicrografias do tecido da pata de camundongos WT infectados ou não com 10 ⁶ PFU de CHIKV.....	67
Figura 11: Níveis plasmáticos de AnxA1 em camundongos infectados com CHIKV.....	68
Figura 12: Níveis de mediadores inflamatórios produzidos no coxim plantar de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT infectados com 10 ⁶ PFU de CHIKV.....	70
Figura 13: A infecção pelo CHIKV induz edema de pata e hipernocicepção mecânica prolongada nos animais, porém sem diferenças significativas entre os camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT.....	71
Figura 14: Contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT infectados pelo CHIKV.....	72
Figura 15: Recuperação do título viral viável nos órgãos e plasma de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT infectados com CHIKV.....	73
Figura 16: Camundongos AnxA1 ^{-/-} infectados com CHIKV apresentam maior dano tecidual na pata.....	75

Figura 17: Perfil de leucócitos, macrófagos e de neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório das patas de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT com 2 dias pós-infecção por CHIKV.....	77
Figura 18: Perfil de linfócitos T presentes nos linfonodos poplíteos de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT com 2 dias pós-infecção por CHIKV.....	79
Figura 19: Perfil de ativação de linfócitos T (CD4 ou CD8) presentes nos linfonodos poplíteos de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT com 2 dias pós-infecção por CHIKV.....	80
Figura 20: Perfil de macrófagos presentes no infiltrado inflamatório das patas de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT com 7 dias pós-infecção por CHIKV.....	82
Figura 21: Perfil de células dendríticas presentes no infiltrado inflamatório das patas de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT com 7 dias pós-infecção por CHIKV.....	83
Figura 22: Perfil de linfócitos T presentes no infiltrado inflamatório das patas de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT com 7 dias pós-infecção por CHIKV.....	84
Figura 23: Níveis de MPO e de IL-6 no coxim plantar de camundongos Fpr 2/3 ^{-/-} ou WT infectados com 10 ⁶ PFU de CHIKV.....	85
Figura 24: Hipernocicepção mecânica e edema de pata em camundongos Fpr 2/3 ^{-/-} ou WT infectados com 10 ⁶ PFU de CHIKV.....	86
Figura 25: Recuperação do título viral viável nos órgãos e plasma de camundongos Fpr 2/3 ^{-/-} ou WT infectados com CHIKV.....	87
Figura 26: Camundongos Fpr2/3 ^{-/-} infectados com CHIKV apresentam maior dano tecidual na pata.....	89
Figura 27: Efeito do pré-tratamento com Ac ₂₋₂₆ sobre a produção de mediadores inflamatórios na pata de camundongos infectados com CHIKV.....	91
Figura 28: O pós-tratamento com Ac ₂₋₂₆ , administrado em dose única às 24 horas pós-infecção pelo CHIKV, não diminui o acúmulo de neutrófilos e a produção de mediadores inflamatórios em camundongos.....	92
Figura 29: Efeito do tratamento profilático com Ac ₂₋₂₆ na hipernocicepção mecânica e no edema de pata de camundongos infectados com CHIKV.....	93

Figura 30: Fotomicrografias do tecido da pata de camundongos WT tratados ou não com Ac ₂₋₂₆ e infectados com CHIKV 7 dpi.....	94
Figura 31: Perfil de leucócitos, macrófagos e de neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório das patas de camundongos WT tratados ou não com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac ₂₋₂₆) na infecção por CHIKV 2dpi.....	96
Figura 32: Perfil de linfócitos T (CD4 ou CD8) presentes nos linfonodos poplíteos de camundongos WT tratados ou não com Ac ₂₋₂₆ e com 2 dias pós-infecção por CHIKV.....	97
Figura 33: Perfil de ativação de linfócitos T (CD4 ou CD8) presentes nos linfonodos poplíteos de camundongos WT tratados ou não com Ac ₂₋₂₆ e com 2 dias pós-infecção por CHIKV.....	98
Figura 34. Papel protetor da via da AnxA1 – FPR2/ALX na infecção pelo CHIKV e o efeito do tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac ₂₋₂₆) em camundongos.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escores histopatológicos atribuídos para a avaliação do tecido da pata de camundongos infectados ou não com CHIKV.....	58
Tabela 2: Painel de mixes de anticorpos utilizados para marcação fluorescente de células imunes das patas de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT para posterior avaliação por citometria de fluxo.....	60
Tabela 3: . Níveis de mediadores inflamatórios produzidos no coxim plantar de camundongos WT infectados ou não com 10 ⁶ PFU de CHIKV.....	127
Tabela 4: Níveis de mediadores inflamatórios produzidos no coxim plantar de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT infectados ou não com 10 ⁶ PFU de CHIKV.....	128
Tabela 5: Níveis de mediadores inflamatórios produzidos no coxim plantar de camundongos WT infectados ou não com 10 ⁶ PFU de CHIKV e tratados ou não com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac ₂₋₂₆)	129
Tabela 6: Título viral recuperado nos órgãos ou plasma de camundongos AnxA1 ^{-/-} ou WT infectados com CHIKV.....	130

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV).....	19
1.1.1	Ciclos de transmissão e epidemiologia	19
1.1.2	Genótipos.....	21
1.1.3	Genoma viral e ciclo de replicação.....	23
1.1.4	Febre Chikungunya (CHIKF)	25
1.1.4.1	Sintomas.....	25
1.1.4.2	Mecanismos imunológicos da CHIKF.....	25
1.1.4.3	Fases da CHIKF.....	31
1.1.4.4	Prevenção, diagnóstico e intervenções terapêuticas.....	34
1.2	RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO.....	36
1.2.1	Anexina A1	38
1.2.2	Anexina A1 e a resposta inflamatória	40
1.2.3	Anexina A1 nas infecções virais.....	44
2	JUSTIFICATIVA	45
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	ANIMAIS.....	49
4.2	VÍRUS	49
4.3	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	51
4.3.1	Modelo murino de infecção pelo vírus Chikungunya	51
4.3.2	Tratamento profilático e terapêutico de camundongos BALB/c com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac ₂₋₂₆) na infecção pelo CHIKV	53

4.3.3	Teste de hipernocicepção mecânica	54
4.3.4	Avaliação do edema de pata	55
4.3.5	Quantificação dos níveis plasmáticos de Anexina A1 (AnxA1)	55
4.3.6	Determinação do acúmulo de neutrófilos no coxim plantar	55
4.3.7	Quantificação dos níveis de quimiocinas e citocinas no coxim plantar.....	56
4.3.8	Análise histopatológica da pata	57
4.3.9	Avaliação de populações de células imunes por citometria de fluxo.....	58
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5	RESULTADOS	62
5.1	FENÓTIPO DA DOENÇA INDUZIDA PELO CHIKV EM CAMUNDONGOS SELVAGENS (WT)	62
5.1.1	A infecção pelo CHIKV induz a produção de MPO, CXCL1, IL-1 β e IL-6 na pata de camundongos BALB/c.....	62
5.1.2	A infecção pelo CHIKV induz leucopenia no sangue periférico de camundongos BALB/c.....	64
5.1.3	A infecção pelo CHIKV induz hipernocicepção mecânica prolongada e edema de pata em camundongos BALB/c	65
5.1.4	A infecção pelo CHIKV induz dano tecidual na pata de camundongos BALB/c.....	67
5.1.5	A infecção pelo CHIKV não altera os níveis plasmáticos da AnxA1 em camundongos BALB/c ou C57BL/6.....	68
5.2	FENÓTIPO DA DOENÇA INDUZIDA PELO CHIKV EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA ANXA1 (ANXA1 ^{-/-})	69
5.2.1	A ausência de AnxA1 aumenta o acúmulo de neutrófilos e os níveis de CXCL1 e de IL-6 no coxim plantar de camundongos infectados com CHIKV.....	69
5.2.2	A deficiência de AnxA1 não altera a hipernocicepção mecânica e o edema de pata induzidos pelo CHIKV em camundongos	71

5.2.3 Na ausência de AnxA1 não ocorrem alterações nos parâmetros hematológicos do sangue periférico de camundongos infectados com CHIKV.....	72
5.2.4 A deficiência de AnxA1 aumenta o <i>clearance</i> viral de CHIKV nos órgãos de camundongos.....	72
5.2.5 Camundongos deficientes para AnxA1 apresentam maior dano tecidual na pata em resposta a infecção pelo CHIKV	74
5.2.6 Na ausência de AnxA1 ocorre maior acúmulo de neutrófilos CD11b ⁺ Ly6G ⁺ na pata de camundongos infectados com CHIKV 2 dpi.....	76
5.2.7 A deficiência de AnxA1 não altera o perfil de ativação de linfócitos T no linfonodo poplíteo de camundongos infectados com CHIKV 2 dpi.....	78
5.2.8 A deficiência de AnxA1 aumenta o acúmulo de células dendríticas convencionais (subpopulação cDCs1) e de linfócitos T CD8 ⁺ na pata de camundongos infectados com CHIKV 7 dpi.....	81
5.3 FENÓTIPO DA DOENÇA INDUZIDA PELO CHIKV EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES PARA O RECEPTOR DA ANXA1 (Fpr2/3 ^{-/-}) ..	85
5.3.1 A ausência do receptor FPR2/ALX aumenta o acúmulo de neutrófilos no coxim plantar de camundongos infectados com CHIKV	85
5.3.2 A deficiência do receptor FPR2/ALX prolonga a hipernocicepção mecânica, mas não altera o edema de pata induzido pelo CHIKV em camundongos.....	86
5.3.3 A deficiência do receptor FPR2/ALX aumenta o <i>clearance</i> viral de CHIKV nos órgãos de camundongos	87
5.3.4 Camundongos deficientes para Fpr2/3 apresentam maior dano tecidual na pata em resposta a infecção pelo CHIKV	88
5.4 FENÓTIPO DA DOENÇA INDUZIDA PELO CHIKV EM CAMUNDONGOS WT TRATADOS COM O PEPTÍDEO MIMÉTICO DA ANXA1 (Ac2-26).....	90
5.4.1 O tratamento profilático com o peptídeo mimético da AnxA1, Ac2-26, diminui os níveis de MPO, de CXCL1 e de IL-6 no coxim plantar de camundongos infectados com CHIKV	90

5.4.2 O tratamento profilático com o peptídeo mimético da AnxA1 diminui a hipernocicepção mecânica e o edema de pata em camundongos infectados com CHIKV.....	93
5.4.3 O tratamento profilático com o peptídeo AC ₂₋₂₆ não foi suficiente para proteger contra o dano tecidual na pata em resposta a infecção pelo CHIKV.....	94
5.4.4 O tratamento profilático com Ac ₂₋₂₆ diminui o acúmulo de neutrófilos CD11b ⁺ Ly6G ⁺ na pata de camundongos infectados com CHIKV 2dpi.....	95
5.4.5 O tratamento profilático com Ac ₂₋₂₆ reduz a porcentagem de linfócitos T CD4 ⁺ no linfonodo poplíteo de camundongos infectados com CHIKV 2dpi.....	97
6 DISCUSSÃO.....	100
7 CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS.....	113
ANEXOS.....	127
ANEXO 1 – Estatística descritiva	127
ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA / UFMG.....	131

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)

O Chikungunya (CHIKV) é um vírus do gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*. Esse vírus causa uma doença autolimitada conhecida como febre chikungunya (CHIKF), que é frequentemente acompanhada por intensas dores nas articulações (poliartralgia) com característica incapacitante. As dores podem se prolongar por semanas, meses e até anos em alguns indivíduos. O termo “chikungunya” deriva de uma palavra em língua Makonde ou Kimakonde que significa “aquele que se encolhe” e descreve a aparência curvada de pacientes com intensas dores nas articulações em decorrência da infecção (Stelitano *et al.*, 2019).

1.1.1 Ciclos de transmissão e epidemiologia

O CHIKV é transmitido pela picada da fêmea de mosquitos do gênero *Aedes*. O ciclo de infecção é usualmente dividido em duas fases: uma fase extrínseca, na qual o vírus é transportado pelo vetor, e uma fase intrínseca, quando o vírus é incubado em um hospedeiro vertebrado. A transmissão do vírus ocorre por meio de dois ciclos: o ciclo silvestre ou enzoótico envolvendo mosquitos *Aedes furcifer* e *Aedes africanus* que habitam em regiões de florestas e infectam primatas não humanos (p. ex. babuínos da Guiné, macacos verdes africanos, macacos patas, mandril, entre outros), constituindo os reservatórios para o CHIKV. Ocasionalmente, vetores do ciclo silvestre podem infectar hospedeiros humanos e contribuir para o surgimento de pequenos surtos. No ciclo urbano de transmissão há o envolvimento das espécies de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que transmitem a doença para humanos. A ocorrência desse ciclo geralmente depende de fatores ambientais, da genética viral e do comportamento humano ao favorecer o ambiente propício para a presença de vetores competentes, quando medidas sanitárias não são adotadas no combate ao vetor. O ciclo urbano foi associado a várias epidemias de CHIKV que ocorreram em diferentes continentes, incluindo África, Ásia, Europa e América (Silva *et al.*, 2018; Stelitano *et al.*, 2019).

O CHIKV teve origem na África, sendo isolado e caracterizado pela primeira vez na região da Tanzânia entre o período de 1952 a 1953, a partir de amostra de soro de um paciente infectado e com sintomas semelhantes aos da dengue (Lumsden, 1955). Até o final do século XX, os relatos de infecções por CHIKV eram notificados principalmente nas regiões da África e da Ásia e no subcontinente indiano. No entanto, no cenário atual, devido a ampla ocorrência de vetores eficientes na transmissão do vírus, o aumento da globalização e a facilitação no transporte de pessoas entre regiões afetadas e não afetadas, a epidemia pelo CHIKV atingiu uma grande abrangência geográfica. Curiosamente, o vírus foi detectado em diferentes países em todos os continentes, exceto na Antártica, e todos os anos são notificados cerca de 3 a 5 milhões de casos de CHIKV no mundo (CDC, 2021; WHO, 2021).

Uma série de epidemias ocorreram nas décadas de 1960 e 1990 em países africanos, seguidas por grandes surtos ocorrendo de forma intermitente com um período interepidêmico variando de 7 a 20 anos. Surtos foram registrados na República Democrática do Congo, República Centro-Africana, Malauí, Uganda, Burundi, Angola, Guiné, África do Sul e Nigéria. Nos anos de 2009 e 2010, dois surtos foram notificados na Ilha da Reunião. Na Ásia, o CHIKV foi relatado pela primeira vez na Tailândia, em 1958, e os principais surtos que aumentaram as preocupações com o CHIKV ocorreram na Índia em 2005, onde afetou 1,4 milhões de pessoas. Na Europa, o primeiro caso autóctone de CHIKV foi relatado na Itália, em 2007 e o genótipo ECSA foi responsável pelo surgimento da doença no continente europeu. Posteriormente, a França relatou um número significativo de casos autóctones confirmados em laboratório no período de 2010, 2013 e 2014 (Wahid *et al.*, 2017).

A primeira transmissão autóctone de CHIKV nas Américas ocorreu no ano de 2013, na Ilha de São Martinho - mar do Caribe (Bortel *et al.*, 2014). Nos anos seguintes, milhões de casos foram relatados em países da América Latina, incluindo Brasil, Bolívia, Colômbia, Argentina, Cuba, Costa Rica, Equador e Peru (Yactayo *et al.*, 2016, WHO, 2021). Na América do Norte, a linhagem de CHIKV isolada durante o período de 2013 a 2014 pertencia ao genótipo asiático, e a possível fonte de infecção por CHIKV nos EUA foi relacionada aos turistas norte-americanos que viajam regularmente para o exterior nas suas férias. Até maio de 2014, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA havia relatado 55.992 casos de CHIKV

relacionados a viagens e adquiridos localmente em 14 ilhas da Guiana Francesa e do Caribe (Wahid *et al.*, 2017; CDC^b, 2021)

No Brasil, dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde (no boletim epidemiológico número 23) mostram que no país somente no período de janeiro a junho de 2021 foram notificados 41.673 casos prováveis de CHIKF, com taxa de incidência de 19,7 casos a cada 100 mil habitantes, sendo a região Nordeste seguida da região Sudeste as que apresentaram as maiores incidências para a doença. No entanto, essas notificações de registros de casos prováveis de CHIKF foram mais baixas em relação ao ano anterior, com queda de 18,5% dos casos, provavelmente devido a pandemia de Covid-19 que teve como consequência o receio da população em procurar atendimento médico nas unidades de saúde, bem como uma possível subnotificação ou atraso nas notificações das arboviroses (Brasil, 2021).

1.1.2 Genótipos

São descritos três genótipos distintos de CHIKV – o genótipo do oeste africano (WA), o genótipo asiático e o genótipo do leste-centro-sul africano (ECSA). No ano 2004, um surto de ECSA no Quênia deu origem ao genótipo do Oceano Índico (IOL) a partir de uma mutação na proteína E1 do envelope viral (E1-A226V, com a substituição do aminoácido alanina por valina na posição 226 da glicoproteína E1) conferindo maior adaptação a mosquitos *A. albopictus* serem infectados pelo CHIKV e se tornarem potenciais vetores da doença (Schuffenecker *et al.*, 2006; Tsetsarkin *et al.*, 2007). Posteriormente, no ano 2005, a linhagem IOL se espalhou para as ilhas do Oceano Índico, em seguida para a Ásia e Europa, causando grandes surtos da doença (Weaver e Forrester, 2015). A distribuição global dos genótipos de CHIKV pode ser observada na Figura 1.

Recentemente, um projeto de análise molecular evolutiva propôs um novo sistema de classificação para as linhagens de CHIKV, definido com base na avaliação de 1.055 genomas amostrados entre o período de fevereiro de 1953 e dezembro de 2019. Definindo, portanto, nove linhagens para o vírus, nomeadas de acordo com as regiões de origem. As nove linhagens são as seguintes: 1) AAL- (*African / Asian Lineages* - África e Ásia), 2) AUL- (*Asian Urban Lineage* - Asiática urbana), 3) AUL-Am – (*Asian Urban + American Lineage* - asiática / americana), 4) EAL – (*Eastern*

African Lineage - África Oriental), 5) WA- (*Western African Lineage - África Ocidental*), 6) MAL – (*Middle African Lineage - África Central*), 7) IOL – (*Indian Ocean Lineage - Oceano Índico*), 8) SAL – (*South American Lineage - América do Sul*) e 9) sECSA- (*Sister Taxa to ECSA – Taxa irmã para ECSA*) (Nextstrain, 2021). Durante o período de 2006 a 2010, a linhagem ECSA foi o genótipo majoritário na Tailândia, na Malásia e em Cingapura, enquanto durante os anos de 2007 a 2014, o genótipo asiático foi mais prevalente na Indonésia e nas Filipinas. Segundo análise filogenética e mutacional, no Brasil há uma maior prevalência das linhagens ECSA e asiática (Wahid *et al.*, 2017). Além disso, foram também relatados casos de coinfeção com essas duas linhagens na região Nordeste do país (Machado *et al.*, 2019). No entanto, o impacto da coexistência de genótipos distintos no prognóstico e na gravidade da doença ainda não são bem compreendidos.



Figura 1. Cenário global da distribuição dos genótipos de CHIKV pelos continentes. Oeste africano (WA), asiática, leste-centro-sul africana (ECSA), IOL (ECSA com mutação E1-A226V). Figura desenhada com auxílio do BioRender.com. Autoria própria, 2021.

1.1.3 Genoma viral e ciclo de replicação

O CHIKV é um vírus esférico, pequeno (~70 nm de diâmetro), envelopado, com um genoma formado por RNA de fita simples com polaridade positiva [(+) ssRNA] de ~11,8 quilo-bases. O genoma do RNA consiste em uma região não traduzida (NTR) em 5', duas ORFs (do inglês, *open reading frame* – fase de leitura aberta) e outra região não traduzida (NTR) na extremidade 3'. Duas poliproteínas são codificadas por duas principais ORFs no CHIKV. A estrutura de leitura 5' ORF codifica uma proteína precursora que após o processamento dá origem a quatro proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4), que juntas são importantes para formar o complexo de replicação viral. A segunda ORF, situada na região 3', codifica uma proteína precursora que dá origem a cinco proteínas estruturais após o processamento: capsídeo C, as glicoproteínas do envelope (E1, E2, E3) e a proteína 6 K. O vírus CHIKV é formado por um envelope lipídico, obtido da célula hospedeira, e um nucleocapsídeo icosaédrico que encapsula o RNA genômico. As glicoproteínas E1 e E2 são embutidas no envelope viral formando uma rede icosaédrica no capsídeo. Essas glicoproteínas desempenham um papel relevante na replicação viral. A glicoproteína E1 é importante para a fusão da membrana e a glicoproteína E2 permite que o vírus entre na célula por endocitose (Simizu *et al.*, 1984; Voss *et al.*, 2010).

Resumidamente, o ciclo de replicação do CHIKV ocorre da seguinte maneira: 1) o vírus adsorve na célula hospedeira através de receptor específico (p.ex., Mxra8, Song *et al.*, 2019). Nessa etapa, a proteína viral E2 tem papel chave na ligação ao receptor, 2) em seguida, o CHIKV entra na célula por endocitose mediada por receptor ou mediada por proteína clatrina, 3) No interior dos endossomos, o ambiente ácido promove alterações conformacionais na glicoproteína E1 do envelope viral, 4) ocorre fusão do envelope viral com a membrana do endossomo da célula hospedeira e, então, o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma celular e em seguida é desmontado para liberar o genoma de RNA viral, 5) O genoma viral, por sua vez, é então traduzido pela maquinaria da célula hospedeira para gerar as proteínas não estruturais (nsP1-4), importantes para a replicação viral e que sintetizam o RNA de fita negativa. 6) Nessa etapa, o RNA de fita negativa é usado como molde para a síntese de RNA genômico de fita positiva (49S) e de RNA subgenômico (26S). Esse último serve como RNAm para a síntese de um complexo proteico (C-pE2-6K-E1) que dá origem as proteínas estruturais. 7) O complexo proteico sofre clivagem, formando

o capsídeo viral e segue sendo transportado para o Golgi, onde ocorre o término do processamento e maturação, 8) Em seguida, o complexo proteico é transportado e integrado à membrana plasmática com subsequente clivagem de pE2 por uma protease, gerando os componentes E2 e E3. 9) Ao mesmo tempo, no citoplasma, ocorre a montagem do nucleocapsídeo viral em decorrência da interação do capsídeo com o RNA genômico. 10) Por fim, o nucleocapsídeo migra para a membrana plasmática, interage com as glicoproteínas E1 e E2 e sofre brotamento através da membrana celular, concluindo o ciclo de replicação viral (Figura 2) (Duijl-Richter *et al.*, 2015; Abdelnabi *et al.*, 2017).

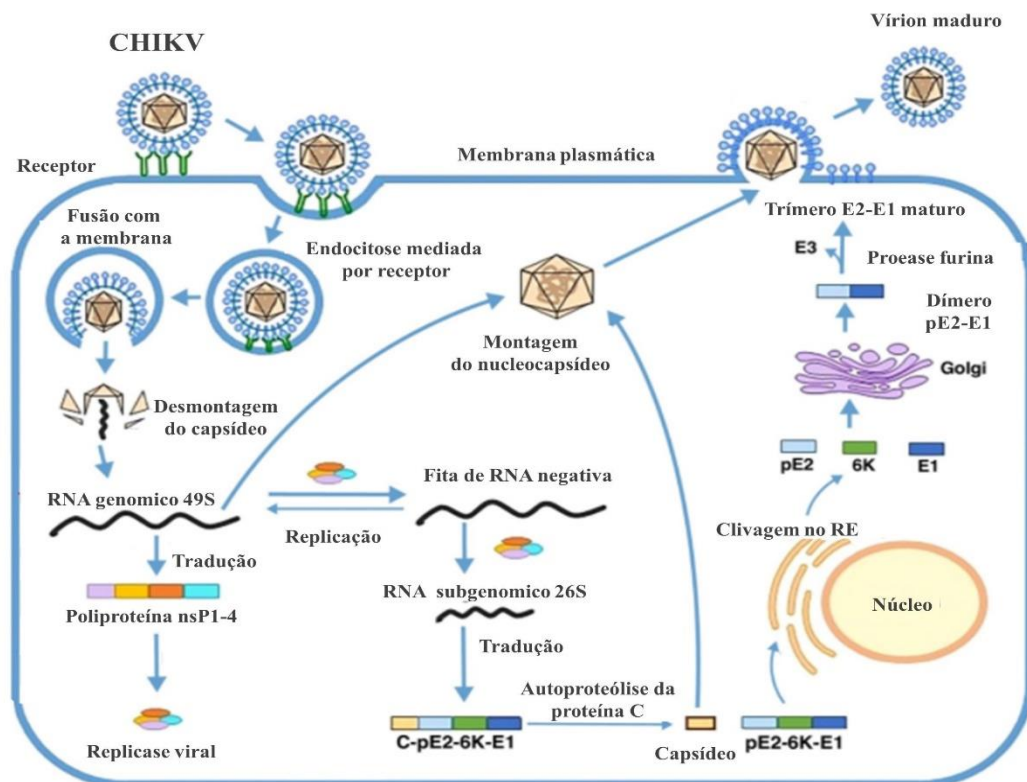


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação do CHIKV na célula hospedeira. O ciclo de replicação do CHIKV inicia-se com a ligação do vírus a célula hospedeira por meio da ligação da glicoproteína E2 viral aos receptores da superfície celular, como Mxra8. Após a endocitose, o endossomo ácido desencadeia a fusão da membrana com a glicoproteína E1, resultando na liberação do nucleocapsídeo viral no interior da célula hospedeira. O RNA genômico é traduzido em quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) que passam a formar uma replicase que sintetiza RNA de sentido negativo. As proteínas não estruturais podem formar esférulas onde a síntese de RNA de sentido positivo (49S) e subgenômico (26S) ocorre com base no modelo de sentido negativo. O RNA subgenômico é traduzido para formar a poliproteína C-E3-E2-E1-6K que é clivada e trafegada para o retículo endoplasmático e aparelho de Golgi onde a modificação pós-traducional resulta nas proteínas estruturais individuais finais do vírus. Após a montagem do capsídeo e maturação viral, as partículas virais sofrem brotamento através da membrana celular, adquirindo o envelope lipídico e completando o ciclo de replicação, que tem duração aproximada de 4 horas. Adaptado e modificado de Abdelnabi *et al.*, 2017.

1.1.4 Febre Chikungunya (CHIKF)

1.1.4.1 Sintomas

O CHIKV pode causar infecções sintomáticas e assintomáticas. Vários estudos em humanos e em modelos animais têm demonstrado que a infecção pelo vírus causa uma doença autolimitada, com resolução espontânea, mas que pode evoluir para a fase crônica. Na maioria dos casos, os indivíduos se recuperam com 1 a 2 semanas. No entanto, é importante destacar que 30 a 40% dos pacientes infectados podem evoluir para um quadro clínico de poliartralgia intensa por meses a anos (Gardner *et al.*, 2010; Stelitano *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2020).

As principais manifestações clínicas da CHIKF são: febre ($\geq 39^\circ \text{C}$), cefaléia, mialgia, cansaço e fadiga, dor retro-orbital, erupção cutânea, poliartralgia, principalmente nos dedos das mãos e dos pés, na articulação do tornozelo, nos joelhos e na coluna vertebral. O edema nas articulações e a tenossinovite também são manifestações comuns da doença, e geralmente as dores são tão intensas que as atividades laborais podem ser prejudicadas, interferindo diretamente na qualidade de vida do paciente. Outras manifestações clínicas menos frequentes podem ser atribuídas ao CHIKV incluindo náuseas e vômitos, conjuntivite e desordens neurológicas (p.ex., encefalite, neuropatia óptica e síndrome de Guillain-Barré), Cerny *et al.*, 2017. Casos graves e mortes em decorrência da infecção são muito raros e quase sempre estão relacionados a outros problemas de saúde pré-existentes (Brito *et al.*, 2016; Stelitano *et al.*, 2019).

1.1.4.2 Mecanismos imunológicos da CHIKF

Assim como em todas as infecções virais, a forma como o sistema imune do hospedeiro detecta e responde ao vírus determina o resultado da infecção. A imunopatologia induzida pelo CHIKV vem sendo relacionada como o principal fator causador do dano tecidual e da persistência da dor (Lum *et al.*, 2015). Elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, detectados em pacientes, em primatas não humanos ou em camundongos, implicam ainda mais para o papel das células imunes e de seus produtos na condução do dano tecidual / articular observado na doença (Ng *et al.*, 2009; Broeckel *et al.*, 2015).

A resposta imune frente à infecção pelo CHIKV inicia-se logo após a inoculação intradérmica pelo vetor *Aedes* ou por indução experimental, na qual o vírus começa a replicar e infectar células residentes como fibroblastos, macrófagos ou outros tipos celulares. As células da imunidade inata iniciam um programa de restauração da homeostase composto por diferentes etapas. Inicialmente, os fagócitos e as células especializadas na apresentação de antígenos (p.ex., macrófagos e células dendríticas) detectam o RNA viral por meio de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) expressos nessas células imunes. Dentre os PRRs relacionados ao reconhecimento do CHIKV estão os receptores do tipo *Toll-like* (TLR 3,7 ou 8) – localizados nos endossomos, os receptores do tipo RIG-I (do inglês, *retinoic acid-inducible gene* - gene I induzível pelo ácido retinoico) e os receptores MDA5 (do inglês, *melanoma differentiation-associated gene 5* - gene associado à diferenciação de melanoma 5) com localização citoplasmática, conforme demonstrado na Figura 3. A ligação do RNA viral a estes receptores promove a ativação de complexas vias de sinalização que ativam genes codificadores de proteínas e de fatores importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória (p.ex., IRF3, IRF7 e NFkB) (Priya *et al.*, 2013; Akhrymuk *et al.*, 2016; Carty *et al.*, 2021).

As vias de sinalização relacionadas ao reconhecimento do vírus culminam na expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (p.ex., IL-1 β , IL-6, TNF- α , CXCL1 e CXCL2), interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) e no estabelecimento de um estado antiviral intra e intercelular nas células vizinhas não infectadas (Schwartz e Albert, 2010; Rudd *et al.*, 2012). A infecção pelo CHIKV também está associada à ativação do inflamassoma NLRP3 em humanos e em camundongos, levando ao aumento na expressão de caspase-1 e IL-18 e contribuindo para a inflamação aguda (Chen *et al.* 2017).

Os mediadores inflamatórios produzidos em resposta ao vírus atuam sobre o endotélio vascular e induzem a expressão de moléculas de adesão (p.ex., E-selectina), levando ao aumento da permeabilidade vascular e estimulando o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o local de infecção, conduzindo a etapa na qual os neutrófilos recrutados liberam produtos tóxicos microbicidas e produzem citocinas e quimiocinas que induzem o extravasamento de monócitos inflamatórios e de mais neutrófilos para o sítio de infecção. Esses mecanismos auxiliam na ativação da imunidade adaptativa, na qual anticorpos

específicos produzidos por células B neutralizam o vírus, e os linfócitos T CD8⁺ ativados eliminam as células infectadas pelo CHIKV levando ao *clearance* viral (Kelvin *et al*, 2011; Haese *et al.*, 2016).

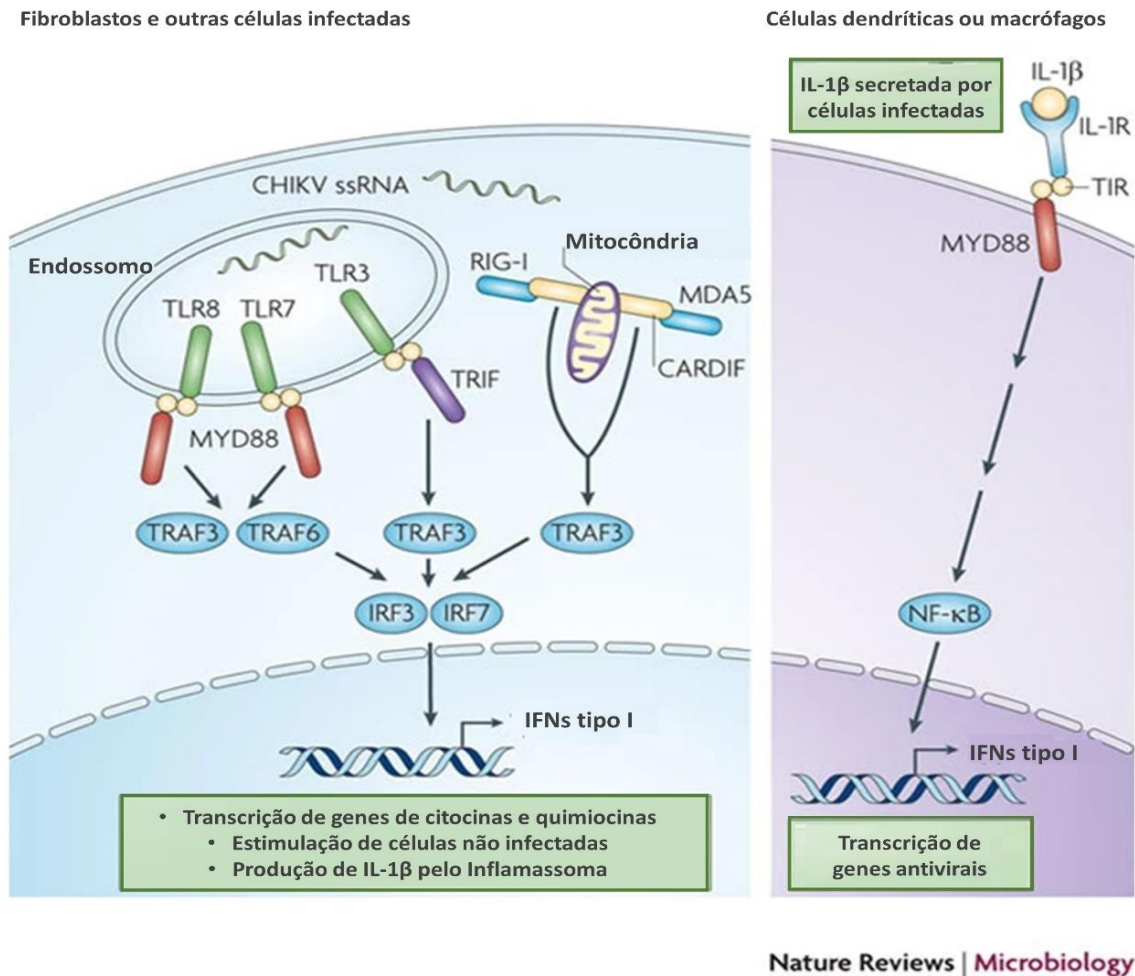


Figura 3. Reconhecimento do CHIKV por células do sistema imune. As células do sistema imune inato detectam o RNA viral usando diferentes PRRs, como os receptores TLR (3,7 ou 8), localizados nos endossomos, ou os receptores do tipo RIG-I ou MDA5, com localização no citoplasma celular. Após o reconhecimento do material genético viral, vias de sinalização são ativadas aumentando a expressão de fatores importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda contra o vírus (p.ex., IRF3, IRF7 e NF κ B). Mediadores inflamatórios incluindo interferons do tipo I, citocinas e quimiocinas são produzidos estabelecendo um "estado antiviral", no qual células imunes são recrutadas para o local de infecção, conseqüentemente a imunidade adaptativa é ativada para modular a resposta imunológica antiviral. TLR – receptores do tipo Toll; PRRs -receptores de reconhecimento de patógenos; RIG-I - gene I induzível pelo ácido retinóico; MDA5 - gene associado à diferenciação de melanoma 5. Adaptada de Schwartz e Albert, 2010.

Apesar da resposta imune iniciar poucas horas após a infecção, o CHIKV pode sobrepor essa resposta e alcançar a circulação sanguínea. Estudos com camundongos mostram que após a infecção o vírus pode ser detectado nos

linfonodos, no baço, no fígado, nas articulações e no plasma. Em indivíduos infectados com CHIKV a viremia pode atingir títulos de até 10^8 partículas / mL de sangue (Schwartz e Albert, 2010; Chow *et al.*, 2011; Morrison *et al.*, 2011; Haese *et al.*, 2016). Como citado acima, o braço da imunidade inata exerce importante papel na infecção por CHIKV; doença caracterizada principalmente pelo acúmulo de monócitos / macrófagos nos locais primários de replicação do vírus, que são normalmente a pele, os músculos e as articulações. No entanto, um influxo de neutrófilos, células dendríticas, células NK (do inglês, *natural killer* [assassinas naturais]) e linfócitos também foi observado em vários estudos realizados em camundongos infectados com CHIKV (Gardner *et al.*, 2010; Stoermer *et al.*, 2012; Hiroki *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2015; Teo *et al.*, 2017).

Os neutrófilos constituem a população mais abundante entre os leucócitos circulantes e são as primeiras células recrutadas do sangue para o local de infecção ou de lesão tecidual, seguido pela migração de monócitos, que localmente se diferenciam em macrófagos. Os neutrófilos expressam receptores CXCR1 e CXCR2, os quais se ligam as quimiocinas CXCL1 e CXCL8 (IL-8). O recrutamento de neutrófilos ocorre por meio de mecanismos dependentes de selectinas, integrinas e quimiocinas, incluindo CXCL1, CXCL2 / MIP-2 e CXCL8, como citado anteriormente, que são de fundamental importância em manter a migração celular para os tecidos. A resposta de neutrófilos é rápida no combate a infecção por meio da liberação de produtos tóxicos microbicidas como mieloperoxidase (MPO), serina proteases (p. ex., elastase e proteinase 3 - PR3), superóxido e NETs (do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps* - armadilhas extracelulares de neutrófilo), rapidamente induzida por extrusão de conteúdos nucleares. No entanto, a produção desses conteúdos de grânulos citoplasmáticos e de substâncias antimicrobianas que matam micro-organismos extracelulares, também danificam tecidos sadios (Yousefi *et al.*, 2019; Sawant *et al.*, 2021).

Os neutrófilos, juntamente com os macrófagos, são as células predominantes no sítio de inflamação após a infecção por CHIKV e por outros alfavírus artritogênicos como o Ross River (RRV). Os neutrófilos recrutados para o local de infecção produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e outros mediadores citotóxicos para diminuir a replicação viral (Agraz-Cibrian *et al.*, 2017; Muralidharan e Reid, 2021). No estudo realizado por Hiroki *et al.*, o papel das NETs foi investigado durante a infecção

por CHIKV. A estimulação *ex vivo* e a infecção de neutrófilos isolados de camundongos induziram a liberação de NETs de maneira dependente de TLR7 e da produção de ROS, neutralizando o CHIKV. A infecção *in vivo* de camundongos nocaute para o receptor de interferon (IFNAR^{-/-}) e tratados com um inibidor da produção de NETs aumentou a suscetibilidade desses animais a infecção aguda por CHIKV, confirmando um papel antiviral para as NETs. Além disso, dados clínicos também mostraram uma correlação entre o nível de NETs no sangue e as cargas virais sistêmicas em pacientes infectados com CHIKV (Hiroki *et al.*, 2019).

As células dendríticas (DCs, do inglês, *dendritic cells*) são imaturas ou residentes nos tecidos, que agem como sentinelas ligando a imunidade inata às respostas imunes adaptativas, pois capturam antígenos e os transportam aos órgãos linfoides para apresentação aos linfócitos T *naive*. As DCs possuem expressão de inúmeros receptores de reconhecimento de padrão (p.ex., receptores de lectina tipo C: DCIR) e quando expostas a um agente infeccioso ou a qualquer estímulo inflamatório nos tecidos periféricos, iniciam um processo de maturação em células altamente especializadas para apresentação de antígenos. Todas as DCs clássicas ou convencionais expressam MHC de classe II e CD11c, porém as subpopulações podem ser identificadas por marcadores adicionais. Por exemplo, a subpopulação de DCs, distinguida pela alta expressão da integrina CD11b (cDCs2) em camundongos, é mais potente na condução das respostas de células T CD4⁺, enquanto a outra subpopulação (cDCs1), identificada pela expressão de CD8 nos tecidos linfoides de camundongos ou da integrina CD11b⁻ nos tecidos periféricos, e o fator de transcrição IRF8, é especializada na apresentação de antígenos às células T CD8⁺ (Brown *et al.*, 2019). Quando ativadas, as DCs expressam na sua superfície as proteínas chamadas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são coestimuladores para a ativação dos linfócitos T, as quais se ligam ao receptor CD28 nas células T (Cabeza-Cabrerizo *et al.*, 2021).

Durante as infecções virais, os antígenos são capturados por DCs imaturas residentes nos tecidos. Posteriormente, essas células amadurecem em DCs migratórias e transportam os antígenos capturados até os linfonodos drenantes ou o baço para apresentação dos antígenos aos linfócitos T. Até o presente momento, poucos estudos relacionaram à interação das DCs com o CHIKV. Quanto a isso, foi demonstrado que as DCs expressando receptores DCIR desempenham importante papel na patogênese da infecção pelo CHIKV, regulando negativamente a resposta

inflamatória induzida pelo vírus. Nesse estudo citado, camundongos DCIR^{-/-} infectados desenvolveram um fenótipo de doença mais grave, com maior formação de edema, aumento da inflamação e da perda de peso, sugerindo um papel do receptor DCIR na limitação da resposta inflamatória induzida pelo vírus (Long *et al.*, 2013).

Uma das principais funções das DCs é realizar a apresentação antigênica para células T *naïve* na iniciação das respostas de célula T a antígenos proteicos, um processo denominando indução ou *priming*. Dentro dos tecidos linfoides secundários (p. ex. baço e linfonodos), os linfócitos T reconhecem os antígenos estranhos apresentados pelas DCs e, em seguida, são ativados, proliferam e se diferenciam produzindo milhares de células T efetoras e de memória. Posteriormente, os linfócitos efetores e de memória podem migrar para os sítios de infecção ou de inflamação nos tecidos não linfoides. A saída dos linfócitos T *naïve* dos linfonodos depende de um lipídeo quimioatraente denominado esfingosina 1-fosfato (S1P), o qual se liga ao receptor 1 de esfingosina 1-fosfato (S1PR1, do inglês, *sphingosine 1-phosphate receptor*). Após a ativação dos linfócitos T pelo antígeno, a expressão do S1PR1 na superfície celular é bloqueada por vários dias fazendo com que as células T permaneçam por mais tempo nos linfonodos. Essa supressão de S1PR1 é controlada, em parte, por IFN-I produzido em resposta à infecção (Cyster e Schwab, 2012). Além disso, os interferons aumentam a expressão de uma proteína denominada CD69 (um marcador de ativação de células T), a qual se liga ao receptor S1PR1 e diminui a expressão desse na superfície celular. Juntos, esses mecanismos fazem com que as células T ativadas pelo antígeno permaneçam no órgão linfóide e sofram expansão clonal e diferenciação em células T efetoras. Após vários dias, quando a diferenciação em células efetoras está completa, esses linfócitos T perdem o CD69 e passam a reexpressar o receptor S1PR1. Desse modo, essas células T podem detectar o gradiente de S1P e sair do linfonodo em direção aos tecidos não linfoides. Curiosamente, o tratamento de camundongos com um modulador negativo do receptor S1PR1, o Fingolimod®, com sucesso limitou a migração de células T CD4⁺ do linfonodo para as articulações e suprimiu de modo eficaz a patologia articular induzida pelo CHIKV (Teo *et al.*, 2017).

Com base nessas evidências, observa-se que o braço efetor do sistema imune adaptativo, mediado por linfócitos T, tem importante papel na infecção pelo CHIKV.

As células T, incluindo os linfócitos do tipo T CD4⁺ e CD8⁺ são amplamente relacionadas com a persistência do dano articular observado durante a doença causada pelo CHIKV (Morrison *et al.*, 2011; Teo *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015; Poh *et al.*, 2020). As células T CD4⁺ e CD8⁺ foram detectadas em biópsias sinoviais obtidas de pacientes durante a fase crônica da infecção pelo CHIKV (Hoarau *et al.*, 2010).

Além disso, o estudo de Teo *et al.* (2013) demonstrou que camundongos nocaute para células T CD4⁺ ou com depleção dessas células apresentaram menor edema de pata no 6º dpi e menor dano tecidual quando comparados com animais CD8^{-/-} ou com camundongos WT, sugerindo o papel patogênico dos linfócitos T CD4⁺ no curso da infecção pelo CHIKV (Teo *et al.*, 2013). De modo interessante, foi demonstrado que as células T reguladoras (Treg) podem contribuir para a proteção contra o dano articular inibindo a ativação excessiva de linfócitos T CD4⁺ e o seu subsequente acúmulo nas lesões musculoesqueléticas de camundongos infectados, sugerindo a importância das células Treg para prevenir o dano tecidual induzido pelo vírus (Lee *et al.*, 2015).

1.1.4.3 Fases da CHIKF

A doença causada pelo CHIKV pode evoluir em três fases bem definidas: a fase aguda, a fase subaguda e a fase crônica. Na fase aguda, os sintomas geralmente têm duração de até duas semanas, na fase subaguda observa-se a persistência do sintoma de dor por até três meses e, na fase crônica os sintomas podem ultrapassar os três meses e persistir por anos em alguns pacientes ocasionando artralgia incapacitante com possível evolução para artrite (Srivastava *et al.*, 2020). Os sintomas da CHIKF surgem depois do período de incubação do vírus (por volta de 4 a 7 dias). A fase aguda da doença geralmente é caracterizada por alta viremia (por até 7 dias pós-infecção). Nessa fase, inicia-se a produção de anticorpos neutralizantes (principalmente IgM anti-CHIKV) que auxilia na redução da gravidade da doença e no controle da viremia (Lum *et al.*, 2013). Surgem também as manifestações dos sintomas clínicos como citado acima, incluindo febre (≤ 15 dias de duração), cefaléia, mialgia e erupção cutânea. A dor poliarticular é um dos principais sintomas da doença e essa condição clínica é que, na maioria das vezes, diferencia a infecção pelo CHIKV de outros arbovírus como os vírus da dengue (DENV) e da Zika (Kam *et al.*, 2009; Edington *et al.*, 2019). Esses sinais e sintomas podem estar relacionados a

intensificação da resposta imune contra o vírus, ocasionando aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios e no acúmulo de células imunes como neutrófilos, células NK e monócitos, que localmente se diferenciam em macrófagos (Couderc e Lecuit; Lum *et al.*, 2015).

A fase subaguda da doença está relacionada com o *clearance* viral completo (com base na detecção negativa de RNA viral pela técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), além da remissão dos sinais observados durante a fase aguda da infecção. No entanto, a dor pode ainda ser persistente. Em humanos e camundongos, foi demonstrado que a resolução da doença causada pelo CHIKV está relacionada com aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β e maior acúmulo de células Treg e de macrófagos exibindo padrões de ativação semelhantes a M2, que contribuem para diminuir a resposta pró-inflamatória e promover o reparo tecidual e o retorno a homeostase (Stoermer *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2020). Os níveis aumentados de IL-10 no plasma de indivíduos recuperados da infecção pelo CHIKV em comparação com pacientes crônicos são indicativos do papel dessa citocina na resolução da doença (Kulkarni *et al.*, 2017).

Como citado anteriormente, a fase crônica ocorre após 3 meses da infecção com a persistência dos sintomas, sendo o principal fator patognômico da doença a poliartralgia incapacitante que pode evoluir para artrite e persistir por meses ou até anos em alguns pacientes (Larrieu *et al.*, 2010; Chow *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2018; Zaid *et al.*, 2018; Edington *et al.*, 2019). Em humanos e em modelos experimentais murinos, a fase crônica da doença também é correlacionada com alta produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (p.ex. IL-6 e CCL2) e intenso acúmulo de células T nas articulações sinoviais (Hoarau *et al.*, 2010, Gardner *et al.*, 2010; Chow *et al.*, 2011; Haese *et al.*, 2016). Nessa fase, pacientes com artrite crônica induzida pelo CHIKV podem ser diagnosticados com base na presença de artralgia inflamatória persistente com poliartrite simétrica afetando as pequenas e grandes articulações das mãos e dos pés, assim como a detecção positiva de anticorpos IgM / IgG anti-CHIKV (Kulkarni *et al.*, 2017).

Em alguns casos crônicos de infecção pelo CHIKV pode ocorrer perda óssea articular associada a um aumento significativo na proporção do ativador do receptor

de NF- κ B (RANKL) / osteoprotegerina (OPG). Nesse sentido, é importante destacar que o balanço entre RANKL e OPG é importante para manter a homeostase óssea, enquanto o aumento dos níveis de RANKL promove osteoclastogênese e reabsorção óssea. Em osteoblastos humanos infectados com CHIKV, os níveis aumentados de IL-6 induzem o aumento da expressão de RANKL e inibe os níveis de OPG resultando numa maior razão RANKL:OPG que favorece a formação de precursores de osteoclastos (Noret *et al.*, 2012). A razão RANKL / OPG foi aumentada nas articulações de camundongos ou no soro de pacientes, ambos infectados com CHIKV, sugerindo que a infecção induz perda óssea articular (Chen *et al.*, 2015) e que a IL-6 é fundamental para a persistência da artralgia induzida pelo CHIKV (Chow *et al.*, 2011). Curiosamente, a infecção *in vitro* de fibroblastos sinoviais humanos com o CHIKV promove a secreção de RANKL, CCL2, IL-6 e IL-8, e, os sobrenadantes dessas culturas de células podem estimular a osteoclastogênese (Phuklia *et al.*, 2013; Sukkaew *et al.*, 2018)

Embora tenha havido um grande progresso nos estudos relacionados a patogênese da infecção pelo CHIKV, ainda não são totalmente compreendidos os mecanismos pelos quais alguns pacientes são capazes de eliminar a infecção sem evoluírem para a fase crônica, enquanto outros sofrem com dores articulares intensas e debilitantes. Muitas hipóteses foram propostas na tentativa de se compreender esses mecanismos, como exemplo sugeriu-se a persistência de material genético viral ou de proteínas nos tecidos articulares e musculares, no qual um estudo encontrou RNA viral em biópsia sinovial obtida de um paciente mesmo após 18 meses da infecção pelo CHIKV (Hoarau *et al.*, 2010). No entanto, outras evidências apontam que a artrite induzida pelo CHIKV ocorre como resultado da ativação imunológica persistente, semelhante a patogênese da artrite reumatóide. Nesse sentido, foi observado em um estudo de coorte, realizado com 38 pacientes da Colômbia, que não havia RNA viral e nem proteínas virais detectáveis no líquido sinovial após 22 meses de infecção, embora esses pacientes ainda apresentassem poliartralgia incapacitante. Sugerindo, portanto, ativação imune persistente (Chang *et al.*, 2018; Suchowiecki *et al.*, 2021).

1.1.4.4 Prevenção, diagnóstico e intervenções terapêuticas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda várias medidas para a prevenção da infecção pelo CHIKV e por outros arbovírus como dengue, Zika e Mayaro. Dentre essas medidas, instrui-se a eliminação de reservatórios de água parada e indica-se o uso de tratamento químico que possa diminuir a proliferação de mosquitos vetores. Recomenda-se também a utilização de repelentes e de roupas que minimizem a exposição da pele (p.ex., calças e blusas de mangas compridas) para prevenir picadas do mosquito vetor. Faz-se necessária a instalação de telas de proteção em portas e janelas, assim como o uso de mosquiteiros nos dormitórios e a aplicação de inseticidas nos ambientes para diminuir os riscos de transmissão da doença (WHO, 2021).

Nas últimas décadas, estratégias foram colocadas em prática para diminuir a população de mosquitos capazes de transmitir infecções por arbovírus. Nesta abordagem, foi realizada a criação intencional e a liberação de mosquitos modificados geneticamente que ao se acasalarem com mosquitos selvagens induziam alteração genética, causando esterilidade na prole ou redução da competência vetorial. Seguindo essa estratégia de controle de vetores, o grupo de pesquisa de Aliota *et al.* infectou mosquitos *Aedes aegypti* com a bactéria intracelular *Wolbachia* (cepa wMel) e, como resultado foi observado uma diminuição significativa no potencial de replicação e de transmissão do CHIKV pelo vetor (Aliota *et al.*, 2016; Hucke *et al.*, 2021).

O diagnóstico da CHIKF é priorizado durante as epidemias por outros arbovírus de importância médica como os vírus da dengue e da Zika, mas os casos esporádicos da doença costumam ser negligenciados. A detecção do CHIKV pode ser realizada usando vários métodos diferentes incluindo RT-PCR e a dosagem de anticorpos das classes IgM ou IgG, detectados no sangue periférico por método de ELISA. Normalmente, o diagnóstico por RT-PCR é realizado durante a fase aguda da doença e início dos sintomas, sendo possível a detecção do RNA viral; enquanto os testes sorológicos são realizados a fim de saber se o hospedeiro desenvolveu resposta imune contra o vírus. No entanto, uma das maiores limitações desses últimos testes são as reações cruzadas que podem ocorrer com outros arbovírus, levando a resultados falsos positivos (Stelitano *et al.*, 2019).

Em termo de morbidade, a infecção pelo CHIKV gera um impacto substancial na saúde pública e na produtividade econômica, comprometendo a qualidade de vida do paciente. Essa situação é agravada pela falta de tratamentos específicos e / ou vacinas aprovadas contra essa doença. Portanto, medidas preventivas devem ser praticadas para mitigar o risco de transmissão da doença pelos mosquitos vetores, e a terapia de suporte é igualmente importante para diminuir a gravidade das manifestações clínicas.

O manejo clínico tem como estratégia aliviar os principais sintomas da CHIKF (p.ex., febre, cefaléia e poliartralgia). Desse modo, o tratamento de suporte é baseado principalmente no uso de analgésicos como a dipirona e o paracetamol (acetaminofeno) em casos de dores leves. Para o tratamento de dores mais intensas os analgésicos mencionados podem ser combinados com fármacos opioides, como a codeína ou o tramadol. Além disso, pacientes que apresentam dor moderada ou intensa durante a fase aguda da doença podem ser tratados com corticosteroides ou com fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), desde que a infecção por dengue seja descartada devido a possíveis complicações hemorrágicas. Em casos de diagnóstico de dor neuropática, indica-se a prescrição de amitriptilina ou gabapentina. Após 12 semanas de infecção, o tratamento de pacientes com dor crônica também pode ser realizado com metotrexato (Brito *et al.*, 2016; Suhrbier, 2019; Suchowiecki *et al.*, 2021).

Antivirais, terapias com anticorpos e vacinas estão sendo testadas quanto à eficácia contra alfavírus artritogênicos. As abordagens terapêuticas em estudo mostram que o receptor Mxra8 é um alvo potencial para o uso de anticorpos monoclonais, visto que esse receptor é utilizado pelo CHIKV e por outros alfavírus para entrada na célula hospedeira (Song *et al.*, 2019). O Bindarit, um inibidor da quimiocina CCL2 / MCP-1, demonstrou efeito importante contra as proteínas quimioatrativas de monócitos (p.ex., MCP-1, MCP-2 e MCP-3), resultando na diminuição do acúmulo de monócitos nas articulações e diminuindo a perda óssea em animais infectados com CHIKV (Chen *et al.*, 2015). Outra abordagem terapêutica bastante promissora é o Fingolimod®, uma droga que se liga ao receptor S1PR1 causando sua modulação negativa na superfície da célula. O Fingolimod® bloqueia a saída da célula T dos órgãos linfoides e, desse modo, age como um imunossupressor. Em estudo realizado com camundongos infectados com CHIKV foi demonstrado que

o Fingolimod® preveniu o escape de células T dos órgãos linfoides dos animais, reduzindo a inflamação e o dano articular (Teo *et al.*, 2017).

Além das pesquisas voltadas para o tratamento da CHIKF, como citado acima, muitos estudos em andamento buscam desenvolver vacinas que sejam eficazes contra o vírus. Recentemente, pesquisadores do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas em Maryland, EUA, publicaram dados de um estudo de fase 2 de uma vacina com partículas semelhantes ao CHIKV (CHIKV VLP) resultando em uma resposta imune duradoura por até 72 semanas após a vacinação (Chen *et al.*, 2020). Outra vacina candidata, que usou como vetor o vírus recombinante do sarampo para prevenir a infecção pelo CHIKV (MV-CHIK), induziu a produção de anticorpos neutralizantes em 93% dos indivíduos que receberam uma única imunização de alta dose. Curiosamente, foi demonstrado nesse estudo de fase 2 que as respostas de células T específicas contra o CHIKV foram induzidas após a vacinação (Ramsauer *et al.*, 2019).

Compreender os mecanismos envolvidos no controle da inflamação aguda induzida pelo CHIKV, principalmente investigar o papel de moléculas endógenas com potencial pró-resolutivo, pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para diminuir a gravidade da doença e impedir a sua progressão para a fase crônica.

1.2 RESOLUÇÃO DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é caracterizada como uma resposta protetora do sistema imunológico frente a agentes lesivos de natureza infecciosa, traumática, autoimune ou tumoral. Durante a reação inflamatória, ocorrem eventos vasculares e celulares com a ativação de vias de sinalização que culminam com a produção de mediadores pró-inflamatórios para amplificar a resposta imune em defesa do hospedeiro. Esses mediadores têm funções distintas e atuam induzindo o aumento da permeabilidade vascular e estimulando o recrutamento de leucócitos para os tecidos extravasculares (Chiurchiù *et al.*, 2018).

Até o início deste século, acreditava-se que a inflamação aguda se resolvia de forma passiva; com os mediadores pró-inflamatórios (p.ex., histamina, fatores do complemento, eicosanóides e citocinas) sendo naturalmente eliminados no decorrer

do tempo e, assim, culminando com a diminuição da permeabilidade vascular, redução da migração de células do sangue para os tecidos e, conseqüentemente, com inibição da formação do edema. No entanto, nas duas últimas décadas vários estudos vêm demonstrando que durante a resposta inflamatória aguda mediadores endógenos são liberados ou ativados para inibir os sinais cardinais específicos da inflamação aguda e promover a sua resolução (Neurath, 2019; Sugimoto *et al.*, 2019).

A resolução da inflamação é um processo ativo e contínuo que tem como finalidade o retorno da homeostase tecidual. Esse processo é caracterizado pela ativação de vias endógenas de sinalização e pela produção e liberação de moléculas incluindo mediadores lipídicos, autocoides e proteínas que possuem propriedades biológicas sobrepostas, mas não totalmente idênticas, regulando a inflamação e reduzindo a migração de células inflamatórias, diminuindo o edema, a produção de citocinas pró-inflamatórias e promovendo a apoptose e eferocitose de neutrófilos (Solito *et al.*, 2000; Scannell *et al.*, 2007; Vago *et al.*, 2012; Sugimoto *et al.*, 2016). A fase inicial da resolução da inflamação ocorre em paralelo com a inflamação aguda, ou seja, ao mesmo tempo em que há intensa produção de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas e aumento no acúmulo de leucócitos, ocorre também a produção e liberação de moléculas anti-inflamatórias endógenas e pró-resolutivas que inibem a migração adicional de PMN e previnem a manutenção ou exacerbação do edema (Sugimoto *et al.*, 2019).

A liberação de moléculas pró-resolutivas estimula o recrutamento não flogístico de monócitos, o que torna ainda mais eficiente o processo de remoção de neutrófilos apoptóticos (McArthur *et al.*, 2015; Perretti *et al.*, 2015). A eferocitose é, portanto, de grande importância na regulação da inflamação neutrofílica e a remoção eficiente de neutrófilos apoptóticos promove não apenas a resolução da inflamação, mas também contribui para a restauração da homeostase de órgãos e tecidos (Kourtzelis *et al.*, 2020). No entanto, alterações nos mecanismos resolutivos, seja por meio de alterações na expressão de moléculas e de mediadores químicos, pode levar a falhas na resolução da inflamação e, por fim, causar o estabelecimento de doenças crônicas com deposição de colágeno nos tecidos lesados e processo de cicatrização, o que muitas vezes pode ocasionar a perda da função do órgão (Serhan *et al.*, 2020). Desse modo, uma resolução eficiente é importante para o término da resposta inflamatória aguda, mas também para a restauração da integridade tecidual.

Os mediadores pró-resolutivos são classificados como lipídeos bioativos endógenos, conhecidos como mediadores pró-resolutivos especializados (SPMs), incluindo as lipoxinas, as resolvinas, as protectinas e as maresinas. Os SPMs desempenham papéis essenciais na resposta vascular e no tráfego de leucócitos, desde o início da resposta inflamatória até a sua resolução (Serhan, 2014). Além dos lipídeos bioativos, outra molécula com potencial efeito pró-resolutivo é a proteína Anexina A1, que tem sido alvo de estudo em muitos modelos pré-clínicos que buscam estratégias terapêuticas para o tratamento de uma infinidade de doenças inflamatórias (Perucci *et al.*, 2017).

Muitas moléculas pró-resolutivas desempenham os seus efeitos farmacológicos se ligando e ativando receptores FPR (Filep *et al.*, 2018). O receptor FPR2 (do inglês, *Formyl Peptide Receptor 2*) é um tipo de receptor acoplado a proteína G (GPCR) sendo referido muitas vezes pelo acrônimo ALX, pelo fato de ser reconhecido como o receptor da lipoxina A 4 (LXA 4) (Perretti *et al.*, 2002). Os mediadores pró-resolutivos resolvina D1 e Anexina A1 também atuam via receptor FPR2 (Perretti *et al.*, 2002). A ativação da sinalização de FPR2 é capaz de promover vários processos que caracterizam a resolução da inflamação, incluindo a inibição do extravasamento de neutrófilos do sangue para o tecido inflamado, a promoção do recrutamento não flogístico de monócitos, a indução de apoptose de neutrófilos, o aumento da eferocitose, a alteração no fenótipo dos macrófagos de um perfil pró-inflamatório (M1) para um perfil anti-inflamatório (M2) e, o estímulo ao reparo tecidual mediado por células estromais (Perretti *et al.*, 2017; Perretti e Godson, 2020).

1.2.1 Anexina A1

A Anexina A1 (AnxA1) foi descrita pela primeira vez por Flower e Blackwell em 1979 como um segundo mensageiro que afetava a produção das prostaglandinas (Flower e Blackwell, 1979). Posteriormente, a AnxA1 foi mencionada como uma proteína inibidora da atividade da fosfolipase A₂ (PLA₂) e envolvida nas ações anti-inflamatórias dos glicocorticoides (Flower, 1988). Essa proteína, inicialmente denominada como lipocortina 1, lipomodulina, macrocortina ou renocortina, apresenta peso molecular de 37 kDa na sua forma intacta e de 33 kDa na sua forma clivada.

A AnxA1 pertence a superfamília das anexinas que se ligam aos fosfolipídios de membrana na presença de íon cálcio (Ca^{2+}). Atualmente, essa superfamília é dividida em 5 grupos: vertebrados (grupo A), invertebrados (grupo B), fungos e organismos unicelulares (grupo C), plantas (grupo D) e protozoários (grupo E). O grupo A é formado por 12 membros (anexina A1-A11 e anexina A13) amplamente expressos em órgãos e tecidos humanos (Flower e Rothwell, 1994; Perretti e Flower, 1996; Gerke *et al.*, 2005). Quanto a estrutura proteica, a característica da família AnxA é que todas as proteínas ligadas à membrana compartilham um núcleo conservado conhecido como domínio carboxílico (C-terminal), que confere ligação aos fosfolipídios de uma maneira dependente de Ca^{2+} e consiste em quatro repetições semelhantes (I-IV), cada uma contendo aproximadamente 70-80 aminoácidos. A família AnxA compartilha também uma extremidade amino terminal (N-terminal) conhecida como cauda que pode variar em sequência e comprimento, conferindo funções específicas para cada tipo de proteína dentro do grupo, sendo também uma região sensível ao íon Ca^{2+} e a outros ligantes (Rosengarth *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2020).

A maior parte das funções da AnxA1 está relacionada à sua capacidade de interagir com as membranas celulares. Esta interação é reversível e regulada especialmente por modificações pós-traducionais como a fosforilação de resíduos de serina, tirosina, histidina, entre outros (D'Acunto *et al.*, 2014). Adicionalmente, no domínio N-terminal da AnxA1 podem ocorrer outros eventos bioquímicos incluindo glicosilação e clivagem proteolítica seletiva e, esse domínio é caracterizado como a principal região da proteína que exerce atividade anti-inflamatória (Han *et al.*, 2020).

Endogenamente, a AnxA1 é expressa em uma variedade de células imunes incluindo neutrófilos, monócitos / macrófagos, mastócitos e apresenta baixa expressão em subconjunto de linfócitos (p. ex., células T). Os PMN contêm grandes quantidades de AnxA1, que pode representar até 4% do total das proteínas citosólicas (Ernst *et al.*, 1990). Quanto ao seu mecanismo de secreção, foi demonstrado que após a ativação ou a adesão de PMN em monocamadas de células endoteliais ocorre a mobilização e a externalização da AnxA1 na membrana com subsequente liberação no meio extracelular (Morand *et al.*, 1995, Perretti *et al.*, 2000; Perretti e D'Acquisto, 2009). Os mecanismos moleculares responsáveis pela secreção da AnxA1 podem variar dependendo do estado de ativação celular e, após a secreção a proteína age

nas células-alvo de maneira autócrina ou parácrina. A ativação do transportador ABC (*ATP-binding cassette*) é a principal forma de secreção da AnxA1 em macrófagos, enquanto em neutrófilos a maior parte da AnxA1 intracelular está presente em grânulos de gelatinase, ocorrendo mobilização e fusão desses grânulos com a membrana plasmática da célula imune durante a secreção da proteína (Perretti *et al.*, 2000; Perretti e D'Acquisto, 2009).

A geração de camundongos nocaute para AnxA1 ($AnxA1^{-/-}$) possibilitou a realização de vários estudos para melhor caracterizar o papel dessa proteína em diferentes contextos experimentais de inflamação (Roviezzo *et al.*, 2002; Hannon *et al.*, 2003; Grewal *et al.*, 2021). Camundongos $AnxA1^{-/-}$ exibem uma resposta inflamatória prolongada e exacerbada a estímulos aplicados localmente (p.ex., no modelo experimental de edema de pata), maior dano articular no modelo de artrite induzida por antígeno e, esses animais nocaute para AnxA1 são mais susceptíveis a nocicepção (Perretti *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2004; Ayoub *et al.*, 2008). Além disso, neutrófilos $AnxA1^{-/-}$ apresentam transmigração endotelial aumentada e maior responsividade a estímulos inflamatórios, evidenciando a importância da AnxA1 endógena na resolução da inflamação (Chatterjee *et al.*, 2005).

1.2.2 Anexina A1 e a resposta inflamatória

A capacidade de inibir a atividade da PLA₂ destacou a AnxA1 como uma importante molécula anti-inflamatória, dada a sua relevância na inibição da cascata do ácido araquidônico e conseqüentemente, ao interferir na produção de mediadores pró-inflamatórios como as prostaglandinas e os leucotrienos (Blackwell *et al.*, 1980). Tal ação resulta na diminuição da transmigração dos leucócitos, além da inibição da atividade de moléculas de adesão nas interações leucócito-endotélio (p.ex., integrinas e selectinas), que é considerado um dos prováveis mecanismos da AnxA1 na regulação da migração celular (Solito *et al.*, 2000; Sugimoto *et al.*, 2016).

O papel da AnxA1 na inibição da transmigração de leucócitos (neutrófilos e monócitos) foi inicialmente descoberto por meio da administração de dexametasona a camundongos com peritonite induzida por zimosan. O tratamento com o corticosteroide diminuiu o acúmulo de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais, enquanto a administração de um anticorpo humano recombinante contra a AnxA1 reverteu esse efeito. Com esse estudo, sugeriu-se que o recrutamento de monócitos

e neutrófilos durante a inflamação aguda é regulado, pelo menos em parte, pela AnxA1 endógena (Getting *et al.*, 1997).

Como citado acima, a AnxA1 promove os seus efeitos farmacológicos (p.ex., efeito anti-inflamatório e antinociceptivo) ativando o receptor FPR2, que também é expresso em células imunes, em células endoteliais e epiteliais, entre outras. O receptor FPR2 / ALX transduz os efeitos da AnxA1 em uma variedade de sistemas *in vitro* e *in vivo* (Pei *et al.*, 2011; Yazid *et al.*, 2012; Filep *et al.*, 2018; Senchenkova *et al.*, 2019). Por exemplo, o recrutamento de monócitos não flogísticos da circulação sanguínea para os tecidos é um evento fundamental para a resolução e término da inflamação aguda, uma vez que ao chegarem no sítio de inflamação essas células se diferenciam localmente em macrófagos e promovem a eferocitose de neutrófilos apoptóticos (Sugimoto *et al.*, 2019, Serhan *et al.*, 2020). No estudo de McArthur *et al.*, foi demonstrado que monócitos humanos aumentam a quimiotaxia de uma maneira dependente de concentração quando são tratados com a AnxA1 recombinante humana (hrAnxA1). Paralelamente, os autores demonstraram que a administração de hrAnxA1 diretamente no peritônio de camundongos *Fpr2/3^{-/-}* ou WT induziu um intenso recrutamento de monócitos (*Gr1^{Low}/F4/80^{Low}*) para a cavidade peritoneal dos animais selvagens, mas não dos animais nocaute para o receptor da AnxA1. Com esse estudo, sugeriu-se que a AnxA1 apresenta propriedade quimioatrativa para monócitos murinos via FPR2 / ALX (McArthur *et al.*, 2015).

Tanto em contextos experimentais *in vitro* quanto *in vivo*, os efeitos pró-resolutivos da AnxA1 estão ligados principalmente a capacidade em promover a apoptose e a eferocitose de neutrófilos (Scannell *et al.*, 2007; Vago *et al.*, 2012), induzir a polarização de macrófagos do fenótipo M1 para o fenótipo M2 (Arur *et al.*, 2003; Locatelli *et al.*, 2014), além de promover o reparo e regeneração do dano tecidual (McArthur *et al.*, 2020). Esses efeitos na resolução da inflamação estão relacionados tanto a AnxA1 intacta (37 kDa) quanto aos peptídeos sintéticos gerados a partir da porção N-terminal dessa proteína (p.ex., Ac₂₋₂₆) (Cirino *et al.*, 1993). O peptídeo Ac₂₋₂₆ é gerado a partir da proteólise da AnxA1 de comprimento total, na qual o N-terminal é quebrado, e um fragmento de cadeia peptídica é formado pelos 26 aminoácidos do segmento N. Tanto a região N-terminal da AnxA1 quanto o peptídeo Ac₂₋₂₆ apresentam efeitos biológicos semelhantes (Dalli *et al.*, 2012). Os principais efeitos da AnxA1 na resolução da inflamação podem ser resumidos na Figura 4.

Embora a expressão da AnxA1 seja muito menor em células T do que em neutrófilos e macrófagos, essa proteína também está envolvida na imunidade adaptativa. No estudo de Gold *et al.*, a administração da hrAnxA1 ou do peptídeo mimético da AnxA1, Ac₂₋₂₆, suprimiu a proliferação de células T estimuladas por fatores mitógenos. Em outro estudo, foi observado que o peptídeo Ac₂₋₂₆ inibiu a proliferação e a produção de citocinas de células Th1 e Th2, interferindo nos mecanismos de ativação das células T dependentes da apresentação de antígenos (Gold *et al.*, 1996; Kamal *et al.*, 2001). Adicionalmente a esses eventos, foi demonstrado que a AnxA1 secretada por células apoptóticas modula negativamente a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺ através da inibição da ativação de células dendríticas, com consequente supressão das respostas efetoras de células T (Weyd *et al.*, 2013).

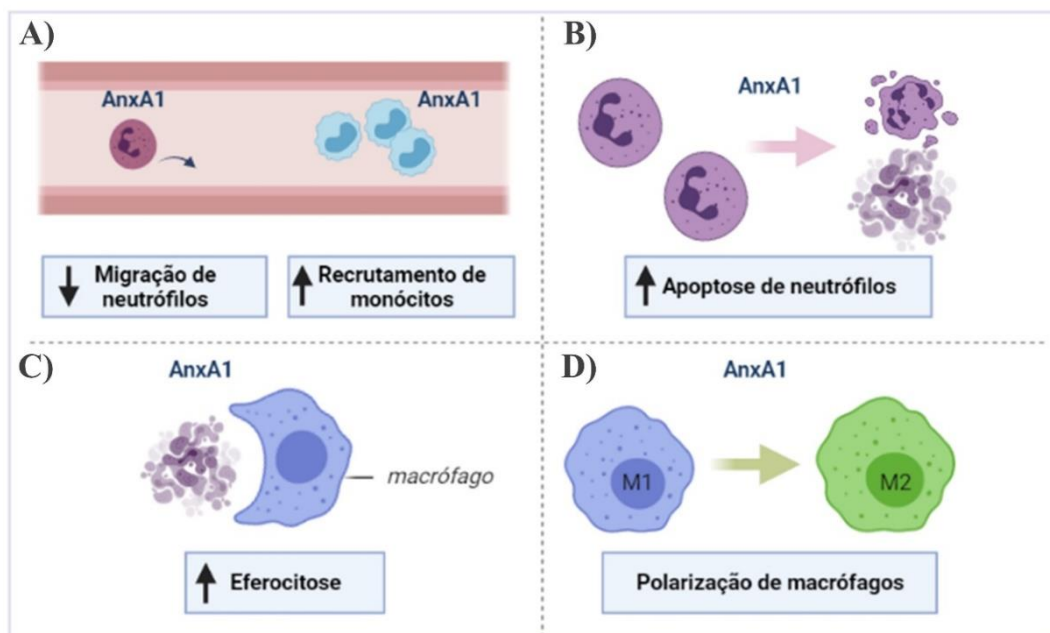


Figura 4. Representação esquemática dos efeitos da Anexina A1 na resolução da inflamação. Em diferentes contextos de doenças inflamatórias, a AnxA1 apresenta efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo. **A)** demonstra o efeito da AnxA1 na diminuição da migração de neutrófilos do sangue para os tecidos (Perretti *et al.*, 1993) e aumento do recrutamento de monócitos não flogísticos (McArthur *et al.*, 2015). **B)** AnxA1 induz a apoptose de neutrófilos com subsequente fagocitose por macrófagos, um processo denominado eferocitose, observado em **C)** (Arur *et al.*, 2003, Vago *et al.*, 2012). **D)** AnxA1 estimula a polarização de macrófagos do fenótipo M1 (pró-inflamatório) para o fenótipo M2 (anti-inflamatório) em vários contextos experimentais (Locatelli *et al.*, 2014; McArthur *et al.*, 2020). Figura desenhada com auxílio do BioRender.com. Autoria própria, 2021.

Vários estudos demonstraram que a AnxA1 e os seus peptídeos miméticos apresentam efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo em diferentes modelos de doenças inflamatórias. No estudo realizado por Galvão *et al.*, a administração de Ac₂₋₂₆ a camundongos durante uma resposta inflamatória induzida por cristais de urato monossódico (modelo experimental de gota) teve um importante efeito anti-inflamatório, conforme demonstrado pela diminuição do acúmulo de neutrófilos, menor produção de IL-1 β e de CXCL1 no tecido periarticular, redução na hipernocicepção e melhora no escore histopatológico articular. Esse efeito foi associado ao aumento de apoptose de neutrófilos e a diminuição nos intervalos de resolução (Galvão *et al.*, 2017). Em outro estudo, o tratamento com Ac₂₋₂₆ diminuiu a expressão de TNF- α e IL-6, aumentou o acúmulo de macrófagos M2 e regulou positivamente os níveis das citocinas IL-10 e TGF- β , promovendo a cicatrização de feridas em camundongos geneticamente diabéticos (Huang *et al.*, 2020). Adicionalmente, o peptídeo Ac₂₋₂₆ apresentou efeito antinociceptivo através da ativação de receptores FPR com consequente diminuição da produção de mediadores inflamatórios relacionados com o estabelecimento da dor inflamatória, por exemplo: prostaglandinas, citocinas TNF- α e IL-1 β , e as quimiocinas MCP-1 e MIP-1 α (Pieretti *et al.*, 2004; Ayoub *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2020).

In vitro, a administração de hrAnxA1 a macrófagos derivados de PBMC humanos diminuiu a expressão de um marcador de fenótipo de macrófagos pró-inflamatórios M1 (identificado pela marcação de MHCII) e aumentou a expressão de CD206, característico de macrófagos com fenótipo pró-resolutivo M2. Essa mudança na polarização de macrófagos foi seguida por alteração transcricional com diminuição na expressão de RNAm de genes pró-inflamatórios (p.ex., TNF- α e Nos2) e aumento na expressão de IL-10. Esse estudo mostrou que o efeito da AnxA1 na polarização de macrófagos é dependente da ativação da enzima AMPK (McArthur *et al.*, 2020).

Recentemente, o estudo de Ni *et al.*, demonstrou que na meningite induzida por *Streptococcus suis*, a AnxA1 exerce importante efeito anti-inflamatório por meio da ativação de FPR2. Nesse trabalho citado, os camundongos Fpr2/3^{-/-} foram mais susceptíveis a infecção e exibiram níveis mais elevados de mediadores pró-inflamatórios incluindo CXCL2, IL-6 e IL-1 β em comparação com animais WT. Paralelamente, o tratamento de camundongos WT com a AnxA1 recombinante diminuiu a infiltração de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ e reduziu os níveis de MPO nos

cérebros dos animais infectados. *In vitro*, os autores mostraram que a AnxA1 potencialmente inibiu a expressão de IL-6 através da via FPR2 / p38 MAPK / COX-2 em macrófagos derivados de BMDM murino e infectados com *S. suis* (Ni *et al.*, 2021).

1.2.3 Anexina A1 nas infecções virais

O papel da AnxA1 tem sido bastante investigado em várias condições inflamatórias, porém o seu envolvimento no curso de infecções foi pouco abordado, especialmente em infecções virais (Vago *et al.*, 2021). Dentre os trabalhos recentemente publicados, o estudo de Schloer *et al* (2019) demonstrou que o tratamento com a hrAnxA1 expandiu o número de macrófagos alveolares, ativando o receptor FPR2 e resultando em um efeito protetor contra a infecção por influenza A (IAV) em camundongos. No entanto, outro estudo mostrou que camundongos deficientes para AnxA1 são protegidos da infecção por IAV. Essa proteção foi associada a maior taxa de sobrevivência em relação aos animais WT, com aumento no acúmulo de células inflamatórias e títulos virais mais baixos após a infecção, sugerindo que a presença da AnxA1 aumenta a replicação viral e facilita a infecção. Posteriormente, foi demonstrado que a inibição da via de sinalização de FPR2 leva a diminuição significativa da replicação do vírus influenza em células alveolares humanas (Arora *et al*, 2016; Rahman *et al.*, 2018). As discrepâncias desses estudos mostram que mais pesquisas são necessárias para uma melhor compreensão da participação da AnxA1 e de seu peptídeo N-terminal no contexto das infecções virais.

Embora ainda sejam incipientes os estudos que avaliam o papel da AnxA1 em doenças causadas por arbovírus, evidências mostram que no curso da infecção pelo vírus Zika, DENV ou por CHIKV ocorre regulação negativa dessa proteína. Recentemente, o estudo de Molás *et al* (2020) relatou que placentas de mulheres infectadas pelo vírus Zika apresentam expressão diminuída de AnxA1 quando comparadas a grupos controles. Além disso, um estudo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa mostrou que durante a infecção por DENV ocorre diminuição dos níveis plasmáticos da AnxA1 em indivíduos infectados. Esses achados foram reproduzidos em modelo murino experimental, no qual camundongos nocaute para a AnxA1 ou para o seu receptor (FPR2) apresentaram maior gravidade na doença induzida pelo DENV com aumento na permeabilidade vascular e intensa ativação de mastócitos quando comparados com animais selvagens (Costa *et al.*, *in press*, dados não publicados).

Curiosamente, indivíduos infectados com CHIKV demonstram diminuição de níveis séricos de AnxA1 em relação a indivíduos saudáveis (Puttamallesh *et al.*, 2013). Desse modo, é plausível levantar a hipótese de que a AnxA1 pode desempenhar um papel importante na patogênese da infecção por CHIKV.

2 JUSTIFICATIVA

Ao longo das últimas décadas, vários estudos estabeleceram que as respostas imunes elaboradas durante a fase aguda da infecção pelo CHIKV determinam o grau de progressão da doença ou a sua resolução (Hoarau *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2020). É importante destacar que falhas nos mecanismos resolutivos podem, eventualmente, desencadear no hospedeiro um microambiente com liberação contínua de mediadores pró-inflamatórios, o que pode exacerbar a inflamação e levar a fenótipos inflamatórios crônicos como observado em alguns pacientes com CHIKF (Nathan e Ding, 2010; Chiurchiù *et al.*, 2018, Edington *et al.*, 2019). Este estudo justifica-se pela relevância da AnxA1 no contexto da inflamação aguda ocasionada por agentes estéreis ou infecciosos como os arbovírus, podendo ser também uma molécula relevante para o controle da resposta inflamatória induzida pelo CHIKV.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o papel da via da Anexina A1 / FPR2 / ALX na patogênese da infecção pelo vírus Chikungunya em camundongos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Caracterizar o modelo experimental de infecção pelo vírus Chikungunya (CHIKV) em camundongos da linhagem BALB/c;
- ✓ Avaliar os níveis plasmáticos da AnxA1 durante a infecção pelo CHIKV em camundongos BALB/c ou C57BL/6;
- ✓ Determinar a relevância da AnxA1 sobre a produção de mediadores inflamatórios em camundongos AnxA1^{-/-} infectados com CHIKV;
- ✓ Verificar qual o impacto da deficiência de AnxA1 sobre os parâmetros de doença: hipernocicepção, edema de pata e contagem de leucócitos circulantes no sangue periférico de camundongos infectados com CHIKV;
- ✓ Analisar qual o efeito da deficiência de AnxA1 sobre o *clearance* viral e sobre as alterações histopatológicas observadas durante a infecção pelo CHIKV;
- ✓ Determinar quais são as populações de células imunes presentes no infiltrado inflamatório das lesões teciduais induzidas pelo CHIKV e qual a possível contribuição da AnxA1 para o perfil dessas células;
- ✓ Definir o papel do receptor da AnxA1 (FPR2) em camundongos Fpr2/3^{-/-} infectados com CHIKV;
- ✓ Verificar o efeito do tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆) sobre os parâmetros inflamatórios, hipernocicepção mecânica, edema de pata, alterações histopatológicas e sobre o acúmulo de células imunes na pata e no linfonodo poplíteo de camundongos infectados com CHIKV.

Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos livres de patógenos específicos (SPF): BALB/c AnNCrl ou C57BL/6 JUnib machos e fêmeas de 3 a 4 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UFMG e camundongos de 3 a 4 semanas deficientes para AnxA1 (*background* BALB/c) ou para FPR2 (Fpr 2/3^{-/-}, *background* C57BL/6), provenientes do Biotério de Imunofarmacologia do ICB – UFMG. Os camundongos FPR2^{-/-} também são deficientes para FPR3, devido à presença de um de seus exons entre o gene codificante para FPR3, o que impossibilita a deleção genética apenas em FPR2. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em estantes com filtros de entrada e saída de ar, condições de temperatura e luz controladas, com livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos descritos neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (Protocolo 135/2019).

4.2 VÍRUS

Para a realização dos experimentos foi utilizada uma amostra de CHIKV isolada no Brasil (genótipo ECSA – cepa BHI3762 / H804917), a partir de um paciente virêmico, e gentilmente cedida pelo Dr. Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP – FAMERP. O CHIKV foi propagado em células de mosquitos *Aedes albopictus* (clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0343. Essas células foram mantidas por 5 a 7 dias em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) umidificada e com temperatura a 37°C. Foi adicionado às culturas o meio de cultivo Leibovitz L-15 (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 1,5% HEPES, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 1% antibióticos e 2% Soro Fetal Bovino (SFB). Os sobrenadantes das culturas infectadas foram obtidos por centrifugação (600g / 10min). Em seguida, os sobrenadantes foram adicionados na coluna de concentração viral (Vivacell 100 centrifugal concentrator – Sartorius, Alemanha) e as partículas virais foram concentradas pelo auxílio de centrifugação (2000g / 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.

Para determinar a carga viral nos estoques virais foi empregada a técnica de titulação viral por ensaio de formação de placas de lise conforme previamente descrito por Baer e Kehn-Hall (2014), na qual foram utilizadas células permissivas da linhagem Vero ATCC-CCL-81 (fibroblastos de rim de macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) também provenientes do BCRJ sob número 0245. As células foram crescidas em meio RPMI 1X suplementado com 1,5% HEPES, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 1% antibióticos, e 10% SFB. Posteriormente, as células foram tripsinizadas, homogeneizadas e adicionadas em placas de 6 ou 12 poços a uma densidade de 1×10^6 células / poço e 5×10^5 células/poço, respectivamente. As placas foram incubadas em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por cerca de 24 horas. As células foram utilizadas quando os seus poços apresentavam uma monocamada com confluência de 85 a 90%. Subsequentemente, os estoques virais foram diluídos serialmente em meio RPMI (10^{-2} a 10^{-7}) e as diluições foram adicionadas às placas com volume de 400µL (para placa de 6 poços) ou de 300µL (para placa de 12 poços). O controle das células foi um poço não inoculado com o estoque viral, ao qual foi acrescentado apenas o meio RPMI com antibióticos, na ausência de SFB nos mesmos volumes. As placas foram armazenadas em estufa por 1 hora a 37°C (período de adsorção do CHIKV na célula hospedeira) e em seguida foram lavadas com meio RPMI para remover as partículas virais que não infectaram as células. Posteriormente, foi adicionado meio DMEM contendo 1.6% de carboximetilcelulose, antibióticos e 2% de SFB. As placas foram, então, incubadas a 37°C por 4 dias, período no qual os efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio invertido. Após este período, as placas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, foram coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em H₂O deionizada. O título viral, avaliado nessas células, foi expresso em unidades formadoras de placa (PFU).

4.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Modelo murino de infecção pelo vírus Chikungunya

Neste estudo, a infecção dos camundongos ocorreu pela via subcutânea (no lado ventral da pata traseira direita) com 10^6 PFU de CHIKV em 30 μ L de PBS 1X estéril (inóculo definido previamente por nosso laboratório - Moreira, 2018). Os camundongos não infectados (Mock) foram igualmente injetados com 30 μ L de PBS 1X estéril. Do dia zero ao dia 28, os animais foram avaliados para os parâmetros de hipernocicepção mecânica e edema de pata. Os camundongos foram anestesiados com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) para a coleta do sangue e dos órgãos, e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal. As eutanásias ocorreram nos diferentes dias pós-infecção (dpi): 1, 3, 7 ou 14 e as amostras de vários órgãos (incluindo: coxim plantar, tornozelo, joelho, linfonodo poplíteo, músculo quadríceps, baço, fígado ou plasma) foram armazenadas em nitrogênio líquido e posteriormente usadas para determinação de título viral por ensaio de formação de placas em células permissivas da linhagem Vero, conforme descrito no tópico 4.2. Para quantificar o título viral presente nas amostras de tecidos e no plasma dos animais, os órgãos foram pesados e macerados com auxílio de gral e pistilo de porcelana estéreis, em seguida as amostras foram diluídas serialmente em meio RPMI 0% estéril, seguindo a proporção de 10% peso / volume. As amostras de tecidos foram diluídas de 10^{-2} até 10^{-8} , e o plasma de 10^{-2} a 10^{-4} . Os linfonodos poplíteos foram macerados entre lâminas estéreis e homogeneizados em 500 μ L de meio RPMI com diluições seriadas de 10^{-2} até 10^{-8} . Os resultados para o título viral foram apresentados como PFU por mL de plasma ou PFU por mg de tecido. Paralelamente, as patas / coxim plantar dos camundongos foram processadas e analisadas para determinação da produção de mediadores inflamatórios e da expressão de marcadores de células imunes ou avaliação histopatológica. A Figura 5 representa o delineamento experimental realizado neste estudo.

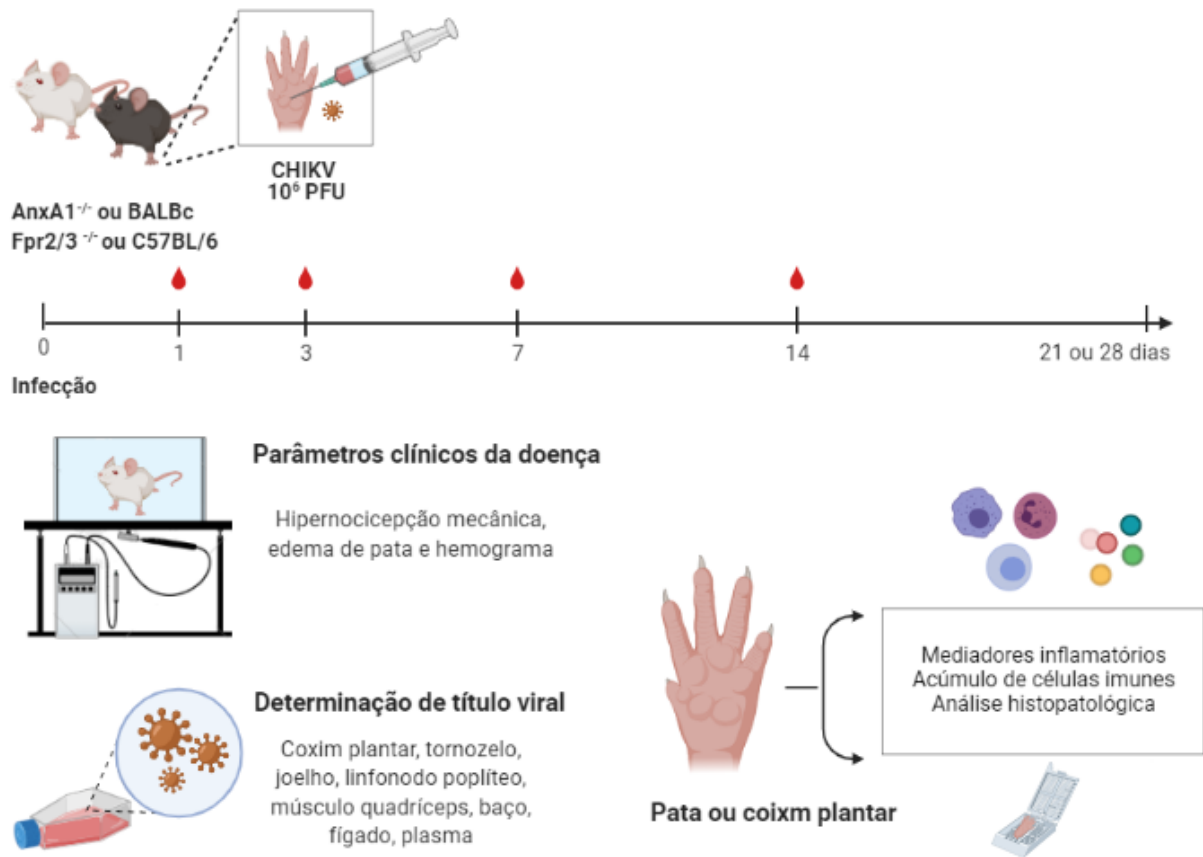
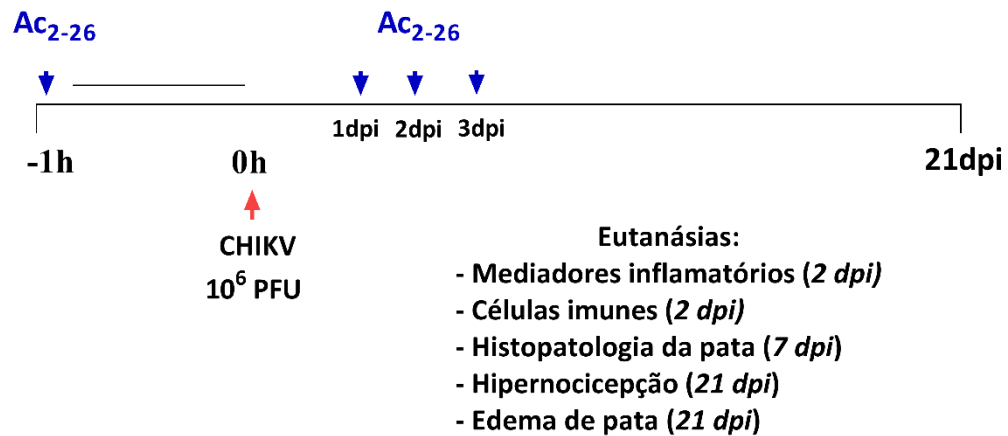


Figura 5. Delineamento experimental. Camundongos nocaute para AnxA1 ou para FPR2 ou os seus controles selvagens (BALB/c ou C57BL/6, respectivamente) de ambos os sexos, com idades entre 3 e 4 semanas foram infectados pela via intraplantar com inóculo de 30 μ L de CHIKV 10⁶ PFU. Os animais não infectados (Mock) receberam apenas injeção de 30 μ L de PBS 1X. A cinética de infecção foi avaliada por até 28 dias para os parâmetros de doença (hipernocicepção ou edema de pata) e as eutanásias dos animais ocorreram nos tempos de 1, 3, 7 ou 14 dpi. As amostras do plasma e de vários órgãos foram avaliadas para determinação de título viral, amostras de coxim plantar foram utilizadas para avaliar a produção de citocinas e quimiocinas (incluindo: CXCL1, IL-6, CCL2, IL-10 e TNF- α), além dos níveis de MPO. A pata foi utilizada para avaliação histológica e para quantificação de acúmulo de células imunes por citometria de fluxo. Figura desenhada com auxílio do BioRender.com. Autoria própria, 2021.

4.3.2 Tratamento profilático e terapêutico de camundongos BALB/c com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆) na infecção pelo CHIKV

Neste estudo, os camundongos foram tratados com o peptídeo Ac₂₋₂₆, que contém a porção N-terminal ativa da AnxA1 (NEP-*New England Peptide*, lote #PR7467) na dose de 150 µg / animal, com volume final de 100 µL / animal, via intraperitoneal (i.p), previamente definido por nosso laboratório (Galvão *et al.*, 2017). O peptídeo foi inicialmente eluído em DMSO 2% e, em seguida, em água de injeção estéril. Os camundongos BALBc / WT foram tratados com Ac₂₋₂₆ em dois esquemas terapêuticos: uma hora antes da infecção ou quando a infecção já estava estabelecida. No esquema profilático: os animais receberam Ac₂₋₂₆ 1 hora antes da infecção e a cada 24 horas pós-infecção, até o 3º dpi, totalizando quatro administrações para cada animal. Esses animais foram pareados com camundongos infectados com CHIKV 10⁶ PFU, mas não tratados com Ac₂₋₂₆ ou foram pareados com animais controles não infectados (Mock). Os animais do tratamento profilático foram mantidos vivos para a avaliação dos parâmetros de hipernocicepção mecânica e edema de pata. Outros grupos infectados (tratados ou não tratados com Ac₂₋₂₆) foram eutanasiados no 2º dpi para avaliação da produção de mediadores inflamatórios e do acúmulo de células imunes na pata, ou foram eutanasiados no 7º dpi para avaliação histológica da pata. Desse modo, os animais que foram eutanasiados no 2º dpi receberam apenas dois tratamentos com Ac₂₋₂₆. No esquema do tratamento terapêutico: os camundongos foram tratados com uma dose única de Ac₂₋₂₆ às 24 horas pós-infecção pelo CHIKV e, seis horas após o tratamento esses animais foram eutanasiados para a avaliação da produção de mediadores inflamatórios na articulação do tornozelo. A Figura 6 resume de forma didática os esquemas terapêuticos descritos neste estudo.

A) Tratamento profilático



B) Tratamento terapêutico

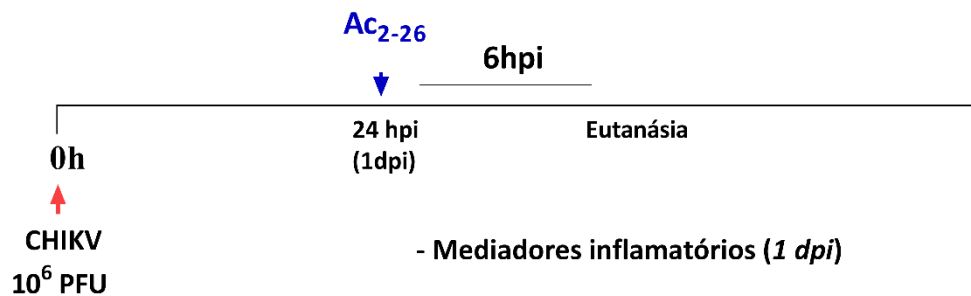


Figura 6. Esquemas terapêuticos com Ac₂₋₂₆ em camundongos infectados com CHIKV. Animais BALBc / WT de ambos os sexos, com idades entre 3 e 4 semanas foram tratados ou não com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆, 150 µg / animal, com volume final de 100 µL por animal, i.p) e infectados com injeção intraplantar de 30 µL de CHIKV 10⁶ PFU. Os animais não infectados (Mock) receberam apenas injeção intraplantar de 30 µL de PBS 1X e injeção intraperitoneal de 100 µL de Ac₂₋₂₆ ou de água de injeção. Os camundongos foram tratados com Ac₂₋₂₆ antes da indução da infecção (**A**) ou quando a infecção já estava estabelecida (**B**). Os animais foram avaliados para os parâmetros de hipernocicepção mecânica e edema de pata e as eutanásias foram realizadas para análises subsequentes da produção de mediadores inflamatórios e do acúmulo de células imunes na pata, conforme os *times points* demonstrados na imagem. Autoria própria, 2021.

4.3.3 Teste de hipernocicepção mecânica

A hipernocicepção mecânica foi avaliada conforme previamente descrito por Costa *et al.*, 2012. Resumidamente, 1 hora antes das avaliações os camundongos foram colocados em uma sala silenciosa e acondicionados individualmente em caixas acrílicas com 4 compartimentos cada (12 x 10 x 17 cm). A hipernocicepção mecânica foi avaliada durante a cinética de infecção (0d, 1d, 3d, 7d, 14d, 21d ou 28d) através do teste de medida de pressão eletrônica modificado para camundongos (Von Frey

eletrônico - INSIGHT *Instruments*, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os resultados foram expressos como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tibio-társica, seguida da retirada da pata.

4.3.4 Avaliação do edema de pata

As medidas dos volumes das patas foram feitas com paquímetro digital e realizadas antes da injeção intraplantar de CHIKV (para obtenção dos níveis basais de cada animal) e então, a avaliação foi feita nos tempos de 1, 3, 7, 14, 21 ou 28 dias pós-infecção. Para controle do experimento, foram utilizados camundongos que receberam injeção contendo apenas PBS 1x (grupo Mock). As medidas foram realizadas sempre duas vezes pelo mesmo avaliador e os resultados para o edema de pata foram calculados como o Δ da diferença entre a medida basal (dia 0) e a medida pós-infecção. Os valores foram expressos em mm.

4.3.5 Quantificação dos níveis plasmáticos de Anexina A1 (AnxA1)

Os níveis de AnxA1 foram mensurados em amostras de plasma obtidas de camundongos BALB/c ou C57BL/6 ao longo da cinética de infecção com 10^6 PFU CHIKV. Foi utilizado o kit específico da LSBio (LifeSpan BioSciences, Inc), seguindo as recomendações do fabricante. As placas foram lidas a 450 nm no espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) e os resultados expressos como ng por mL de plasma.

4.3.6 Determinação do acúmulo de neutrófilos no coxim plantar

O acúmulo de neutrófilos no coxim plantar dos camundongos foi avaliado a partir do ensaio da enzima mieloperoxidase (MPO), uma medida indireta da presença de neutrófilos teciduais. Para isso, aproximadamente 50 mg de tecido do coxim plantar de cada animal foi homogeneizado em uma solução tamponada (0,1M NaCl; 0,02M NaPO₄; 0,015M NaEDTA, pH 4,7) seguindo a proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução. Após a maceração com homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - - Fisher Scientific International, EUA) as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos a 4° C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e para promover a lise osmótica, adicionou-se 500 μ L de NaCl 0,2% gelado seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. As amostras foram homogeneizadas mais uma vez e, em seguida, centrifugadas. O

precipitado foi ressuspenso em tampão Na₃PO₄ 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Posteriormente, as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e logo depois foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4° C. Para quantificar os níveis de MPO, foram coletados 25 µL de sobrenadante de cada amostra e adicionados em placas de 96 poços. Subsequentemente, adicionou-se sobre cada amostra 25 µL de uma solução de 1,6 mM de TMB (3,3,5,5 - tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich, EUA) dissolvido em dimetilsulfóxido absoluto. As placas foram incubadas por 5 minutos em estufa a 37 ° C e, logo em seguida adicionou 100 µL / poço de H₂O₂ a 0,002%, diluído em tampão fosfato (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio. As placas foram novamente incubadas por 5 minutos a 37 ° C e a reação foi interrompida pela adição de 100 µL / poço de H₂SO₄ 1 M. As leituras das amostras foram realizadas a 490nm no espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) e os resultados expressos como densidade óptica (OD).

4.3.7 Quantificação dos níveis de quimiocinas e citocinas no coxim plantar

As amostras de patas ou coxins plantares dos animais infectados ou não pelo CHIKV foram homogeneizadas em tampão para extração de citocinas contendo PBS e inibidor de proteases (0,1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil [PMSF]; 0,1mM de cloreto de benzetônio; 10mM de EDTA e aprotinina A) diluídos em Tween 20 a 0,05%, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução. As amostras foram maceradas com o homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - – Fisher Scientific International, EUA), em seguida foram centrifugadas a 10.000rpm por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi coletado e os níveis das quimiocinas CCL2 / MCP-1, CXCL1 / KC, CXCL2 / MIP-2 (diluição 1:3) e das citocinas IL-6, IL-1β, IL-10 e TNFα (diluição 1:2) foram mensurados. Inicialmente, os anticorpos de captura para cada uma das citocinas descritas foram eluídos em PBS 1x (pH 7,4) e, em seguida foram pipetados 50 µL / poço desses anticorpos em placas de 96 poços para que ocorresse a sensibilização. As placas foram protegidas da luz e armazenadas em temperatura de 4° C até o dia seguinte. As placas foram, então, lavadas por 4 vezes com PBS 1x / Tween 20 a 0,05% e, em seguida foram bloqueadas durante 1 hora em temperatura ambiente com solução contendo PBS 1X / BSA 1% para promover o bloqueio de sítios livres. Posteriormente, as placas foram lavadas por 4 vezes e logo depois os

anticorpos de cada curva padrão foram diluídos em PBS 1x / BSA 0,1%, conforme recomendações do fabricante, e pipetados nas placas de 96 poços. Quando necessário, as amostras foram diluídas em PBS 1x / BSA 0,1% e, em seguida, inoculadas nas placas. As amostras ficaram armazenadas a 4° C *overnight* em contato com os anticorpos de captura, e no dia seguinte as placas foram lavadas por 4 vezes. Logo após, os anticorpos de detecção conjugados com biotina e específicos para cada uma das citocinas descritas foram eluídos em PBS 1X / BSA 0,1% e pipetados 50 µL / poço. Então, as placas ficaram incubadas sob agitação leve em temperatura ambiente por no mínimo 2 horas com posterior lavagem. A reação foi detectada pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem – 1:200) e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride – Sigma-Aldrich, EUA) eluído em tampão fosfato citrato de sódio 0,4 M (pH 5,3). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50 µL de H₂SO₄ 1 M. As placas foram lidas a 490 nm em um espectrofotômetro Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) e os resultados foram expressos como pg de citocina por 100mg de tecido, calculados com base na equação da reta de regressão linear, da curva padrão obtida com as citocinas recombinantes de camundongos. O limite de detecção do ensaio foi de 8 a 12 pg de citocina / mL.

4.3.8 Análise histopatológica da pata

Conforme os tempos estabelecidos na cinética de infecção, os camundongos AnxA1^{-/-} ou Fpr 2/3^{-/-} e os seus respectivos controles selvagens foram eutanasiados e a pata traseira direita de cada animal foi dissecada, fixada em solução de formol 10% v/v (pH 7,4), descalcificada por 30 dias em solução de EDTA 14%, processada, incluída em parafina, seccionada e corada com hematoxilina eosina (HE) como descrito por Moreira, 2018. As alterações morfológicas do tecido, especialmente as relacionadas a aspectos inflamatórios, como a presença de infiltrado inflamatório e perda da arquitetura muscular decorrente da infecção, foram caracterizadas por um pesquisador experiente que não teve acesso prévio à identificação dos grupos experimentais. Para analisar as alterações teciduais, um sistema de escore de pontuação histopatológica foi adaptado de Queiroz-Júnior *et al.*, 2011, no qual as pontuações foram somadas para obter um escore total (variando de 0 a 7), conforme demonstrado na Tabela 1. Posteriormente, as lâminas foram fotografadas utilizando-se microscópio Motic (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) adaptado a uma câmera

digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão) para a obtenção das imagens representativas. As imagens foram feitas em aumento menor de 100x ou no aumento maior de 400x, com escalas que variaram de 200µm a 50µm nos respectivos aumentos.

Tabela 1 – Escores histopatológicos atribuídos para a avaliação do tecido da pata de camundongos infectados ou não com CHIKV.

Classificação da pontuação	Escore de infiltrado inflamatório	Escore de perda da arquitetura muscular	Pontuação cumulativa (escore total)
Ausente	0	0	0
Leve	1	1	1 e 2
Moderado	2	2	3 e 4
Intenso	3	3	5 e 6
Muito intenso	4		7

Fonte: escores adaptados de Queiroz-Júnior *et al.*, 2011.

4.3.9 Avaliação de populações de células imunes por citometria de fluxo

Os camundongos AnxA1^{-/-} ou WT foram infectados ou não pela via intraplantar com inóculo de 10⁶ PFU de CHIKV e, no 2º dia ou no 7º dia pós-infecção esses animais foram eutanasiados e a pata ou o linfonodo poplíteo foram coletados e incubados por 1 hora a 37º C com 1mg / mL de colagenase VIII (Sigma-Aldrich) para digestão enzimática e análise posterior do perfil de células imunes por citometria de fluxo. As células foram isoladas com auxílio de um filtro *Cell Strainer* 70µm, em seguida foram centrifugadas a 2.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de DMEM 0%. As células foram contadas em câmara de *Newbauer* e plaqueadas (10⁵ células / poço) em placas de 96 poços. Para a preparação de células imunes provenientes das patas de camundongos, inicialmente as placas foram incubadas por 15 minutos com 100µl / poço de solução Live/ Dead (1:200). Posteriormente, as placas foram lavadas com 100µl de PBS/1%BSA por poço; centrifugadas (1.200rpm, 10 minutos, 4º C) e bloqueadas com Fc-block 10µl / poço. Subsequentemente, foram adicionados os anticorpos de interesse para as

marcações específicas. As células coletadas no 2º dpi foram marcadas com anticorpos do mix 1 para identificação de macrófagos e neutrófilos na pata ou com anticorpos do mix 2 para marcação de células T no linfonodo poplíteo. As células das patas dos animais com 7 dias pós-infecção foram marcadas com anticorpos do mix 3 para identificação de macrófagos e de células dendríticas ou com anticorpos do mix 4 para caracterização de células T, conforme demonstrado na Tabela 2 abaixo. As placas foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos ao abrigo da luz a 4° C e, em seguida essas placas foram lavadas com PBS/1%BSA e centrifugadas (1.200rpm, 10 minutos, 4° C). As amostras foram fixadas por 30 minutos com 100µl / poço de paraformaldeído 2% / PBS 1x (pH 7,4). Finalmente, as placas foram centrifugadas e, em seguida, adicionou-se 200µl / poço de PBS/1%BSA para leitura posterior no citômetro de fluxo. Para avaliar o perfil de ativação de células T no linfonodo poplíteo dos animais foi utilizado a metodologia de *fluorescence-minus-one* (FMO) (controle de fluorescência menos um) no qual foi adicionado a um tubo as células coradas com todos os fluorocromos utilizados no experimento (p. ex. CD3–PE-Cy7; CD4 – AF488 e CD8 – BV421), exceto um, neste caso, CD69-APC. Os controles FMO são utilizados para determinar o ponto de corte entre a fluorescência de fundo e as populações de células positivas. Todos os anticorpos usados foram adquiridos da BD Biosciences e preparados seguindo recomendações do fabricante. As populações de células foram avaliadas por citometria de fluxo (FACScanto II, BD Biosciences, USA). Foram analisados 50.000 eventos e os dados adquiridos foram avaliados no programa FlowJo v10.7.1 (Tree Star Company). As estratégias de *gates* selecionadas para a avaliação dos dados estão demonstradas nos Resultados deste estudo.

Tabela 2 –Painel de mixes de anticorpos utilizados para marcação fluorescente de células imunes de camundongos AnxA1^{-/-} ou WT para posterior avaliação por citometria de fluxo.

Mixes para marcação de macrófagos, neutrófilos e células T no 2º dpi	Mix 3 para marcação de macrófagos e células dendríticas no 7º dpi	Mix 4 para marcação de células T no 7º dpi
Mix 1 (Pata): CD45 – FITC CD11b – BV421 F4/80 – PE-Cy7 CD11c - PE Ly6G – APC Live / Dead -v510	Mix 3 (Pata): CD45 – FITC CD11b – v510 F4/80 – PEcy7 CD11c –v450 CD80 – PE MHC II –APC cy7 CD206 - APC	Mix 4 (Pata): CD3 – AF 488 CD4 – PEcy7 CD8 – PerCP CD69 – APC cy7
Mix 2 (Linfonodo poplíteo): CD3 – PE-Cy7 CD4 – AF488 CD8 – BV421 CD69 – APC Ki67 – PE CD19 – v510		

Fonte: elaboração própria, 2021.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism versão 8 para Windows. O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para determinar a normalidade dos dados. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para as amostras com distribuição normal, seguida dos pós-testes de Tukey ou Sidak. No caso de distribuição não normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn ou o teste de Mann-Whitney. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Discussão

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos o papel da AnxA1 durante a infecção pelo CHIKV e avaliamos o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo de um peptídeo mimético dessa proteína (Ac₂₋₂₆) administrado de forma exógena a camundongos. De modo geral, os resultados encontrados neste trabalho podem ser resumidos da seguinte maneira: **1)** a infecção pelo CHIKV induziu leucopenia e uma resposta inflamatória aguda caracterizada por aumento nos níveis de MPO, CXCL1, IL-1 β e IL-6 a partir de 6 horas pós-infecção. Essa resposta inflamatória foi acompanhada por hipernocicepção mecânica prolongada, formação de edema plantar e maior acúmulo de subpopulação de células dendríticas convencionais cDCs2 na pata de camundongos WT no 7^o dpi; **2)** Animais deficientes para AnxA1 apresentaram níveis elevados de MPO e produção aumentada de CXCL1 e IL-6 no coxim plantar em comparação com camundongos WT infectados; **3)** Na ausência de AnxA1 ocorreu aumento no *clearance* viral de CHIKV em vários órgãos de animais e agravamento da lesão tecidual na pata; **4)** A deficiência de AnxA1 interferiu no acúmulo de células imunes no local de infecção com aumento na porcentagem de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ (no 2^o dpi) e maior proporção de células dendríticas cDCs1 e de linfócitos T CD8⁺ na pata de animais AnxA1^{-/-} (no 7^o dpi); **5)** Camundongos nocaute para o receptor da AnxA1 (Fpr2/3^{-/-}) apresentaram um fenótipo semelhante aos animais nocaute para AnxA1, com maior acúmulo de neutrófilos, identificados por níveis elevados de MPO no coxim plantar, além de *clearance* viral aumentado em vários órgãos, maior persistência de hipernocicepção mecânica e lesão tecidual mais grave em relação aos animais WT; **6)** O tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ apresentou efeito anti-inflamatório reduzindo os níveis de MPO, CXCL1 e IL-6 no coxim plantar dos animais WT, diminuiu o edema de pata e demonstrou efeito antinociceptivo reduzindo a hipernocicepção mecânica induzida pelo CHIKV. Por fim, **7)** O tratamento com Ac₂₋₂₆ diminuiu o acúmulo de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ na pata e reduziu o número de linfócitos T CD4⁺ no linfonodo poplíteo de camundongos infectados com CHIKV no 2^o dia pós-infecção.

Aqui, demonstramos que a infecção com 10⁶ PFU de CHIKV, em camundongos imunocompetentes, aumentou os níveis de MPO, CXCL1, IL-6 e IL-1 β no local de inoculação do vírus e que esses mediadores inflamatórios atingiram o pico a partir de

6 hpi e ainda estavam elevados durante o período de viremia nos animais WT. Um estudo realizado com pacientes com febre chikungunya identificou IL-1 β e IL-6 séricas como biomarcadores da gravidade da doença induzida por CHIKV (Ng *et al.*, 2009). É importante destacar que o pico de produção de mediadores pró-inflamatórios nos animais infectados (Figura 7 A-E) claramente precedeu o início da formação do edema de pata (Figura 9 B), sugerindo que quando os pacientes apresentam artrite / artralgia, a viremia e a resposta inflamatória associada podem estar diminuídas (Ng *et al.*, 2009). Dessa forma, os nossos resultados estão de acordo com outros estudos que utilizaram o modelo murino de infecção por CHIKV, resultando em uma doença autolimitada semelhante à CHIKF humana com intensa produção de mediadores inflamatórios, viremia, dano tecidual, formação de edema e dor prolongada (Gardner *et al.*, 2010; Stoermer *et al.*, 2012).

A persistência da dor é o principal sinal patognômico que diferencia a infecção por CHIKV de outras arboviroses (Larrieu *et al.*, 2010). No entanto, até o presente momento não estão totalmente compreendidos os mecanismos responsáveis pela manutenção da dor durante a doença, porém algumas hipóteses foram propostas incluindo a presença de RNA do CHIKV ou de proteínas virais nos tecidos articulares e musculares ou a permanência de macrófagos infectados nesses tecidos, bem como a constante ativação imunológica semelhante ao que ocorre na artrite reumatóide, que leva à dor crônica nas articulações (Paixão *et al.*, 2018; Suchowiecki *et al.*, 2021). No nosso estudo, os camundongos infectados com CHIKV apresentaram hipernocicepção prolongada por até 17 dias (Figura 9 A). Neste sentido, o trabalho de Chow *et al.* (2011) demonstrou que durante a fase crônica da doença por CHIKV (por volta de 3 meses após o início da infecção) os níveis plasmáticos de IL-6 eram elevados em pacientes com artralgia persistente, sugerindo que a produção da citocina IL-6 pode estar relacionada com a persistência da hipernocicepção e com o desenvolvimento da artrite na infecção pelo CHIKV. Adicionalmente, foi demonstrado que a IL-6 produzida por osteoblastos humanos infectados com CHIKV induz osteoclastogênese e perda óssea (Noret *et al.*, 2012).

A IL-6 tem diversos efeitos no sistema nervoso, incluindo o aumento da nocicepção (De Jongh *et al.* 2003), e níveis elevados de RNAm de IL-6 foram vistos em neurônios sensoriais axotomizados e na medula espinhal após lesão do nervo espinhal em ratos (Murphy *et al.* 1995; Arruda *et al.* 1998). Recentemente foi

demonstrado, pela técnica de *patch-clamp*, que a IL-6 causa a tradução de fatores de sinalização que regulam canais de cálcio do tipo T, resultando em aumento da excitabilidade de nociceptores no gânglio da raiz dorsal (DRG) de camundongos (Jeevakumar *et al.*, 2020). É importante destacar que no nosso modelo experimental em camundongos BALB/c os níveis de IL-6 no local de inoculação do vírus são aumentados a partir de 6 hpi e se mantêm elevados por até 48 hpi, enquanto o início da hipernocicepção ocorre a partir de 12 hpi nos animais infectados, quando os níveis de IL-6 ainda estão elevados. Estudos em andamento no nosso laboratório estão investigando a hipótese de que mediadores inflamatórios produzidos durante a fase aguda da infecção pelo CHIKV (p.ex., TNF- α e prostaglandinas) possam sensibilizar nociceptores no DRG de camundongos e, assim, contribuir para a persistência da hipernocicepção observada nos animais.

De modo geral, tanto em humanos quanto em modelos experimentais murinos ou de primatas não humanos a infecção pelo CHIKV tem uma fase aguda curta, caracterizada por alta viremia que coincide com a elevada produção de mediadores inflamatórios e com o início dos sinais clínicos observados na doença, incluindo a hipernocicepção e a formação do edema (Gardner *et al.*, 2010; Chow *et al.* 2011; Broeckel *et al.*, 2015). A resolução da doença causada pelo CHIKV está diretamente relacionada com o *clearance* viral completo e com a diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios e a ativação de vias anti-inflamatórias. No entanto, em alguns indivíduos ocorre o estabelecimento da fase crônica da doença que pode durar de alguns meses a vários anos com manifestações de artrite e poliartralgia intensa, provavelmente devido ao comprometimento nos mecanismos de resolução da inflamação (Srivastava *et al.*, 2020; Imad *et al.*, 2021).

A resolução da inflamação é um processo ativo mediado por células e moléculas endógenas que são liberadas durante a resposta inflamatória (Neurath, 2019; Sugimoto *et al.*, 2019). A AnxA1 é uma proteína pró-resolutiva que desempenha papel diversificado na imunidade inata e adaptativa, principalmente voltada para a regulação das células inflamatórias e para a resolução da inflamação e retorno da homeostase tecidual, conforme estabelecido em vários modelos experimentais de doenças inflamatórias (Vago *et al.*, 2012; Galvão *et al.*, 2017; Bruschi *et al.*, 2018). Um ponto relevante a ser mencionado é que indivíduos infectados com CHIKV apresentam diminuição nos níveis séricos de AnxA1 em relação a indivíduos

saudáveis (Puttamallesh *et al.*, 2013), sugerindo que a AnxA1 pode apresentar um papel importante durante a infecção pelo CHIKV.

Neste estudo, para determinar o papel da AnxA1 na patogênese da infecção pelo CHIKV utilizamos camundongos nocaute para essa proteína (AnxA1^{-/-}). Esses animais foram igualmente infectados com 10⁶ PFU de CHIKV e avaliados de forma pareada com camundongos WT. Nossos resultados mostraram que no primeiro dia pós-infecção, os níveis de MPO, CXCL1 e IL-6 foram mais elevados no coxim plantar dos animais AnxA1^{-/-} quando comparados com os camundongos WT, sugerindo que a AnxA1 desempenha um papel importante na regulação da resposta inflamatória aguda durante a infecção pelo CHIKV. A avaliação dos sinais clínicos da doença incluindo a formação do edema e o surgimento de dor induzida pelo vírus, mostrou que na ausência da AnxA1 não ocorreu aumento na formação do edema de pata e nem na hipernocicepção mecânica nos camundongos AnxA1^{-/-} em relação aos animais WT infectados.

Em seguida, avaliamos o título viral de CHIKV em diferentes órgãos dos animais. Curiosamente, a deficiência de AnxA1 teve um impacto significativo nas cargas virais recuperadas, aumentando o *clearance* viral no coxim plantar, no músculo quadríceps, no baço e no fígado dos animais AnxA1^{-/-} em comparação com os camundongos WT. Até o presente momento, poucos estudos investigaram o papel da AnxA1 no curso de infecções virais. Na infecção por IAV, por exemplo, foi demonstrado que camundongos AnxA1^{-/-} são protegidos da doença, apresentando títulos virais mais baixos quando comparados com seus controles WT, e que a presença de AnxA1 aumenta a replicação viral e auxilia na ligação do vírus a célula hospedeira (Arora *et al.*, 2016). Resultados semelhantes foram encontrados por Rahman e colaboradores sugerindo que o antagonismo da via AnxA1 / FPR2 inibiu a replicação de diferentes cepas do vírus influenza, incluindo H1N1 e H3N2, em células epiteliais pulmonares (Rahman *et al.*, 2018). Embora o eixo AnxA1 / FPR2 tenha sido relacionado com a replicação e propagação do vírus influenza, como descrito acima, foi demonstrado também que o tratamento de camundongos com a hrAnxA1 diminuiu as cargas virais e os danos pulmonares, com consequente aumento das taxas de sobrevivência de camundongos infectados com IAV (Schloer *et al.*, 2019).

No contexto de infecções causadas por arbovírus, até o presente momento sabe-se que a AnxA1 é um mediador importante para regular a resposta inflamatória

placentária de mães infectadas pelo Zika vírus (Molás *et al.*, 2020). Além disso, um estudo em andamento no nosso laboratório tem mostrado que a AnxA1 exerce papel importante no curso da infecção pelo DENV. Os níveis plasmáticos da AnxA1 foram reduzidos em pacientes infectados com DENV1, especialmente em casos de dengue grave. Somado a isso, camundongos nocaute para AnxA1 ou para FPR2 apresentaram maior gravidade no fenótipo da doença induzida pelo DENV, com aumento na permeabilidade vascular e maior ativação de mastócitos em relação aos animais WT, enquanto o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆) atenuou as manifestações da doença nos animais (Costa *et al.*, *in press*, dados não publicados).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, nos quais animais AnxA1^{-/-} apresentaram um aumento no *clearance* viral de CHIKV em vários órgãos e sabendo que neutrófilos deficientes para AnxA1 são mais responsivos a estímulos inflamatórios (Chatterjee *et al.*, 2005), sugerimos como uma provável hipótese para a eliminação do vírus o aumento no acúmulo de neutrófilos no sítio de infecção desses animais, seguido por produção e liberação de NETs que possuem a capacidade de capturar e neutralizar o CHIKV e, desse modo, conter a infecção (Hiroki *et al.*, 2019). Além disso, outras células imunes inatas, como as células NK ou as células dendríticas, agindo diretamente ou por meio da liberação de citocinas antivirais, podem ter controlado parcialmente a replicação do CHIKV nos animais deficientes para AnxA1; contribuindo para o aumento do *clearance* viral. No entanto, mais estudos são necessários para identificar esses mecanismos.

A avaliação das alterações histopatológicas no tecido da pata dos camundongos sugeriu que a deficiência de AnxA1 pode ter alterado o acúmulo de células imunes no local de infecção durante a fase aguda da doença. De modo geral, observou-se que camundongos AnxA1^{-/-} apresentaram infiltrados inflamatórios mais intensos quando comparado com os animais WT e esses infiltrados celulares eram predominantemente caracterizados pela presença de PMN e foram maiores a partir do 1º dpi, com pico no 7º dpi, em relação aos animais WT. Ademais, notou-se uma diminuição da lesão tecidual no 14º dpi e uma maior produção de IL-10 no coxim plantar de ambos os grupos de animais avaliados (Figura 12 D), sugerindo que nessa fase observa-se a resolução da inflamação e que, de fato, a AnxA1 parece apresentar um papel bastante relevante no controle da migração de células imunes para o sítio

de infecção. Aqui, sugerimos que o aumento do dano tecidual, observado nas patas de camundongos *AnxA1^{-/-}*, pode ter sido mediado por resposta imune inata nas etapas iniciais da infecção e não diretamente pelo vírus; uma vez que, no 7º dpi não foram detectados vírus nem nos órgãos e nem no plasma dos animais infectados. Porém, no 1º dpi os níveis de MPO eram mais elevados no coxim plantar dos animais *AnxA1^{-/-}* chamando atenção para o papel de neutrófilos, visto que essas células contribuem significativamente para o dano tecidual em processos de doença aguda (Sadik *et al.*, 2011).

Macrófagos e neutrófilos são as células predominantes nas lesões musculoesqueléticas de camundongos após a infecção por alfavírus artritogênicos como o CHIKV e o RRV (Stoermer *et al.*, 2012). Como citado acima, no nosso estudo, quantificamos níveis mais elevados de CXCL1 no coxim plantar dos camundongos *AnxA1^{-/-}* fornecendo uma base mecanicista para o aumento de infiltrado neutrofílico na pata após a infecção pelo CHIKV. Esse resultado foi confirmado por citometria de fluxo, no qual animais nocaute para *AnxA1* apresentaram maior porcentagem de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ na pata quando comparados aos camundongos WT no 2º dpi. Posteriormente, decidimos verificar o acúmulo de outros tipos de células da imunidade inata e adaptativa durante o pico do edema de pata induzido pelo vírus para analisar se a deficiência de *AnxA1* também alteraria a composição dessas células imunes no local de infecção e, desse modo, contribuiria para o dano tecidual observado. Para isso, as patas dos camundongos *AnxA1^{-/-}* ou WT, com 7 dias de infecção pelo CHIKV, foram processadas e analisadas por citometria de fluxo.

A análise por citometria revelou que na ausência de *AnxA1* não ocorreu alteração no acúmulo tecidual de macrófagos ou de macrófagos com perfil M2 na pata de camundongos infectados com CHIKV no 7º dpi. Além disso, a porcentagem de DCs convencionais também não foi alterada frente a infecção pelo vírus, porém uma mudança significativa foi observada na proporção das subpopulações dessas células (cDCs1 / cDCs2). Curiosamente, uma maior porcentagem do acúmulo de células cDCs1 foram identificadas nas patas de camundongos *AnxA1^{-/-}* quando comparados com animais WT. Sabe-se que as cDCs desempenham um papel central no sistema imunológico, processando e apresentando antígenos para ativar os linfócitos T, e que as cDCs1 são especializadas em fazer o *priming* dos linfócitos T CD8⁺ enquanto as

cDCs2 são mais efetivas na apresentação de antígenos para os linfócitos T CD4⁺ (Brown *et al.*, 2019).

Foi demonstrado anteriormente que a hrAnxA1, administrada de modo exógeno, e os seus peptídeos miméticos exibem atividade antiproliferativa em células T estimuladas por mitógenos ou antígenos, sugerindo que a AnxA1 pode interferir especificamente no processo de apresentação de antígenos (Gold *et al.*, 1996; Kamal *et al.*, 2001). Além disso, a AnxA1 liberada na superfície de células apoptóticas tem potencial para inibir a ativação das DCs e suprimir a resposta imune mediada por linfócitos T CD8⁺, prevenindo a expansão dessas células T específicas contra antígenos (Weyd *et al.*, 2013). Quanto a isso, com base nos resultados encontrados no nosso estudo, sugerimos que a ausência de AnxA1 não prejudicou o acúmulo e o perfil de ativação de DCs (conforme indicado pela expressão do marcador de ativação celular CD80) na pata de animais infectados pelo CHIKV, mas aumentou a proporção da subpopulação de células cDCs1 que são essenciais para a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD8⁺.

O aumento da subpopulação de cDCs1 na pata de camundongos nocaute para a AnxA1 e infectados com CHIKV 7 dpi sugere um aumento de DCs para ativar os linfócitos T CD8⁺. Isso é suportado pelo fato de que houve uma maior proporção de linfócitos T CD8⁺ no local de infecção (Figura 22 B), indicando que ocorreu ativação e proliferação dessas células T nos órgãos linfoides secundários de animais deficientes para a AnxA1. Entretanto, pelas peculiaridades da cinética do marcador de ativação usado neste estudo (CD69), não foi possível demonstrar diferenças no perfil de ativação de linfócitos T CD8⁺ de animais AnxA1^{-/-} quando comparados com WT infectados. Quanto a isso, é importante destacar que as células T aumentam sua expressão de CD69 em algumas horas pós reconhecimento do antígeno. Subsequentemente, CD69 se liga ao receptor S1PR1, reduzindo a expressão deste e facilitando a retenção dos linfócitos T nos órgãos linfoides por tempo suficiente para que recebam os sinais que iniciam sua proliferação e diferenciação em células efetoras e de memória. Nesse momento, a expressão de CD69 diminui e, as células T ativadas voltam a reexpressar altos níveis de S1PR1. Como consequência, as células efetoras e de memória podem sair dos órgãos linfoides e migrar para o local de infecção ou de inflamação (Cyster e Schwab, 2012). No nosso estudo, demonstramos que ocorreu expressão aumentada de CD69 nas células T CD4⁺ e

CD8⁺ recuperadas dos linfonodos poplíteos de camundongos AnxA1^{-/-} ou WT infectados com CHIKV 2 dpi quando comparados com os seus controles não infectados (Figura 19). Desse modo, sugerimos que no 7^o dpi os linfócitos T ativados recuperados do local de infecção (pata) expressavam baixos níveis do marcador CD69, o que dificultou possíveis comparações.

A AnxA1 desempenha seus efeitos farmacológicos via receptor FPR2 (Filep *et al.*, 2018; Senchenkova *et al.*, 2019). Aqui, demonstramos que a ausência de FPR2 durante a infecção por CHIKV, resultou em um fenótipo de inflamação aguda e *clearence* viral semelhante ao observado nos camundongos nocaute para AnxA1. No entanto, esses animais Fpr2/3^{-/-} apresentaram uma resposta inflamatória mais exacerbada do que os camundongos AnxA1, considerando a produção de MPO mais prolongada ao longo da cinética de infecção quando comparados com os seus controles não infectados (Mock Fpr2/3^{-/-}, Figura 23 A). Resultados equivalentes foram encontrados por Machado *et al.* na infecção por *Streptococcus pneumoniae*, sugerindo que a resposta inflamatória mais intensa observada na ausência de FPR2 pode ser devido ao fato de que esse receptor também é necessário para o efeito farmacológico de outras moléculas pró-resolutivas, incluindo a lipoxina A4 e a resolvina D1, e a falta de sinalização dessas moléculas ocasionaria falhas na resolução da inflamação (Perretti *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2020). Esse resultado chama atenção para a importância de um programa endógeno de resolução como um todo e, quão crucial é para o hospedeiro que ele seja fortemente engajado.

No nosso estudo, a deficiência de FPR2 prolongou a hipernocicepção induzida pelo CHIKV e agravou o dano tecidual na pata dos camundongos infectados. Como já demonstrado por outros estudos, o receptor FPR2 é necessário para a sinalização adequada da AnxA1 nos seus efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo em diferentes modelos experimentais (Pei *et al.*, 2011; Yazid *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2021). De fato, os nossos resultados sugerem que o eixo de sinalização da AnxA1 / FPR2 é relevante para controlar o acúmulo de células imunes, o *clearence* viral e a produção de mediadores inflamatórios durante a infecção pelo CHIKV.

Diante dos resultados obtidos com os animais nocaute para a AnxA1 ou para FPR2, a parte final do nosso estudo se concentrou na análise do efeito farmacológico do Ac₂₋₂₆ (um peptídeo mimético da AnxA1) no curso da infecção pelo CHIKV. Assim, foi avaliado o efeito desse peptídeo sobre os parâmetros de hipernocicepção

mecânica, edema de pata, produção de mediadores inflamatórios no coxim plantar e escore histopatológico da pata.

É descrito na literatura que camundongos *AnxA1*^{-/-} são mais sensíveis a hipernocicepção induzida por estímulos inflamatórios (Ayoub *et al.*, 2008). Embora no nosso estudo os animais *AnxA1*^{-/-} não tenham apresentado hipernocicepção exacerbada em relação aos animais WT, o tratamento com o peptídeo Ac₂₋₂₆ diminuiu de forma significativa a nocicepção induzida pelo CHIKV (Figura 29 A). Além disso, o efeito antinociceptivo foi observado a partir do 3º dia pós-infecção e se manteve constante até o 21º dia, quando ocorreu o término da avaliação desse parâmetro nos animais.

Sabe-se que os peptídeos miméticos da *Anxa1*, incluindo Ac₂₋₁₂ e Ac₂₋₂₆, quando administrados de modo exógeno podem inibir periféricamente e centralmente a transmissão nociceptiva associada a processos inflamatórios através de um mecanismo que envolve receptores FPR (Pieretti *et al.*, 2004). É descrito também que o tratamento com Ac₂₋₂₆ produz analgesia em camundongos WT ou *AnxA1*^{-/-} por um mecanismo que envolve a diminuição da síntese de PGE₂ na medula espinhal através da modulação da atividade da PLA₂ citosólica ou da COX (Ayoub *et al.*, 2008). Recentemente, um estudo demonstrou que o Ac₂₋₂₆ tem efeito antinociceptivo inibindo a ativação de astrócitos (*in vitro*) e diminuindo a produção de TNF- α , IL-1 β , MCP-1 e MIP-1 α na medula espinhal de ratos 6 horas após a injeção de adjuvante completo de Freund, um modelo experimental clássico de dor inflamatória (Luo *et al.*, 2020). Esse conjunto de evidências demonstram o efeito antinociceptivo do Ac₂₋₂₆ em diferentes modelos de hipernocicepção induzida por estímulos inflamatórios e nos fornece base para sugerirmos um possível mecanismo semelhante frente a nocicepção causada pelo CHIKV, como demonstrado no nosso estudo.

O efeito anti-inflamatório e pró-resolutivo do Ac₂₋₂₆ foi demonstrado em vários estudos anteriores abrangendo desde modelos de edema de pata, de pleurisia, de gota até modelos de lesão tecidual mediada por neutrófilos (Cirino *et al.*, 1993; La *et al.*, 2001; Vago *et al.*, 2012; Galvão *et al.*, 2017). Para verificar se além do efeito antinociceptivo o Ac₂₋₂₆ também apresentaria efeito anti-inflamatório durante a infecção pelo CHIKV, os camundongos foram avaliados quanto ao tamanho do edema de pata e a produção de mediadores inflamatórios no coxim plantar. Nossos resultados demonstraram que no 7º dpi (pico de formação do edema de pata induzido

pelo CHIKV) o Ac₂₋₂₆ diminuiu significativamente o inchaço nas patas dos animais tratados em comparação com o grupo não tratado. Adicionalmente, o tratamento profilático com Ac₂₋₂₆ diminuiu os níveis de MPO, de CXCL1 e de IL-6 no coxim plantar dos camundongos no 2º dia pós-infecção.

A análise por citometria de fluxo demonstrou que o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 reduziu o acúmulo de neutrófilos CD11b⁺Ly6G⁺ na pata e diminuiu a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ no linfonodo poplíteo de camundongos infectados com CHIKV 2 dpi. Quanto a esse último resultado, sugere-se que o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 pode ter diminuído a proliferação de células T CD4⁺ no órgão linfoide secundário, uma vez que o efeito antiproliferativo do Ac₂₋₂₆ foi relatado anteriormente em células T estimuladas por antígenos (Kamal *et al.*, 2001). Além disso, é possível também que o peptídeo tenha aumentado a migração de células T CD4⁺, diminuindo a sua retenção no linfonodo ou tenha estimulado a apoptose dessas células imunes. No entanto, para confirmar estes possíveis mecanismos são necessários mais estudos, uma vez que o papel da AnxA1 ou o efeito do seu peptídeo mimético em células da imunidade adaptativa ainda é bastante controverso (D'Acquisto *et al.*, 2007; 2008). Coletivamente, os nossos resultados fornecem evidências para o papel protetor do eixo de sinalização da AnxA1 - FPR2 / ALX durante a infecção pelo CHIKV.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Portanto, os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a deficiência de AnxA1 ou de FPR2 promoveu uma resposta inflamatória aguda mais exacerbada frente a infecção pelo CHIKV, contribuindo em parte para o *clearance* viral e para o dano tecidual. De modo interessante, o tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆) diminuiu o acúmulo de neutrófilos Ly6G⁺ na pata e a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ no linfonodo poplíteo e, reduziu a produção de MPO, de CXCL1 e de IL-6 no coxim plantar dos camundongos, além de diminuir os principais sinais clínicos da doença: hipernocicepção (dor) e edema. Com base nessas evidências, sugerimos que o papel da via da AnxA1 / FPR2 / ALX na infecção pelo CHIKV está relacionado com o controle do acúmulo de células imunes e com a regulação dos níveis de CXCL1 e de IL-6 durante a resposta inflamatória induzida pelo vírus. Além disso, os nossos resultados mostram que a AnxA1 também está envolvida na regulação da resposta imune adaptativa por meio de seu impacto na proporção de células dendríticas cDCs1 e, conseqüentemente no número de linfócitos T CD8⁺ no local de infecção. Desse modo, este estudo propõe o direcionamento da via da AnxA1 / FPR2 / ALX como uma possível estratégia terapêutica para controlar a inflamação aguda induzida pelo CHIKV. Os principais resultados encontrados neste estudo estão resumidos na Figura 34.

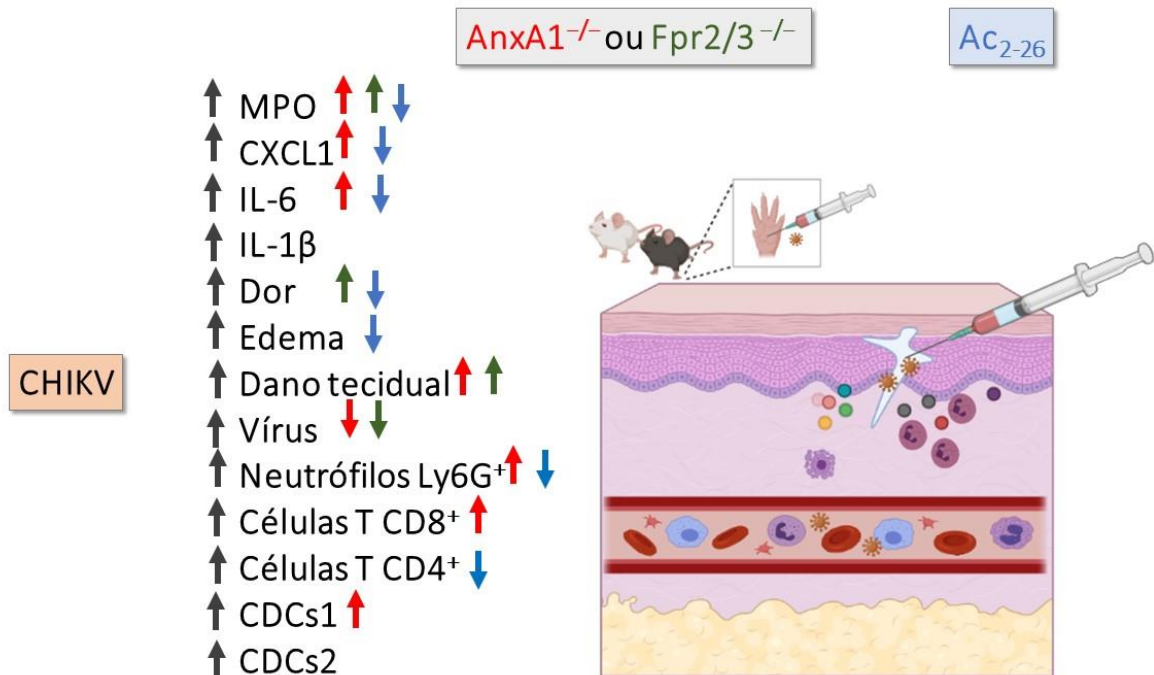


Figura 34. Papel protetor da via da AnxA1 – FPR2/ALX na infecção pelo CHIKV e o efeito do tratamento com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆) em camundongos. A imagem demonstra o fenótipo de camundongos selvagens (WT) ou nocautes infectados com CHIKV. Os principais resultados encontrados após a infecção pelo vírus podem ser identificados pelas setas pretas, incluindo aumento na produção de mediadores inflamatórios na pata (MPO, CXCL1, IL-6 e IL-1β), aumento do título viral em vários órgãos, maior acúmulo de células imunes como neutrófilos, linfócitos T CD4 e T CD8 e células dendríticas das subpopulações CDCs1 e CDCs2 na pata. Juntos, esses mediadores pró-inflamatórios e as células imunes contribuíram para o aumento da dor, da formação do edema e do dano tecidual no local de infecção. Paralelamente, demonstra-se que esse fenótipo de doença é exacerbado em camundongos nocaute para a proteína AnxA1 (setas vermelhas) ou para o seu receptor FPR2 (setas verdes), sugerindo a importância da via da AnxA1 - FPR2/ALX para o controle da inflamação aguda durante a infecção pelo CHIKV. Por outro lado, observa-se que o tratamento de camundongos com o peptídeo Ac₂₋₂₆ (setas azuis) diminui a produção de mediadores inflamatórios (MPO, CXCL1 e IL-6) no local de infecção e reduz o acúmulo de neutrófilos (na pata) e de linfócitos T CD4 (no linfonodo poplíteo) contribuindo para a diminuição da dor e da formação do edema induzido pelo CHIKV. Autoria própria, 2021.

REFERÊNCIAS

- ABDELNABI, R., NEYTS, J., DELANG, L. Chikungunya virus infections: time to act, time to treat. **Current Opinion in Virology**. v.24, p. 25-30. 2017.
- AGRAZ-CIBRIAN, J.M.; GIRALDO, D.M.; MARY, F.M.; URCUQUI-INCHIMA, S. Understanding the molecular mechanisms of NETs and their role in antiviral innate immunity. **Virus Res**. v. 228, p.124–133. 2017.
- AKHRYMUK, I., FROLOV, I., FROLOVA, E.I. Both RIG-I and MDA5 detect alphavirus replication in concentration-dependent mode. **Virology**. v.487, p. 230-241. 2016.
- ALIOTA, M.T., WALKER, E.C., YEPES, A.U., VELEZ, I.D., CHRISTENSEN, B.M., OSORIO, J.E. The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of chikungunya virus in *Aedes aegypti*. **PLoS Negl Trop Dis**. v.10, n.4, p.e0004677.2016.
- ARORA, S., LIM, W., BIST, P., PERUMALSAMY, R. Influenza A virus enhances its propagation through the modulation of Annexin-A1 dependent endosomal trafficking and apoptosis. *Cell*. **Death Differ**. v. 23, p. 1243–1256. 2016.
- ARRUDA JL, COLBURN RW, RICKMAN AJ, RUTKOWSKI MD, DELEO JA. Increase of interleukin-6 mRNA in the spinal Cord following peripheral nerve injury in the rat: potential role of IL-6 in neuropathic pain. **Brain Res Mol Brain Res**. v.62, p.228–235, 1998.
- ARUR, S., UCHE, U.E, REZAUL, K., FONG, M., SCRANTON, V., COWAN, A.E, et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell**. v.4, p.587–98. 2003.
- AYOUB, S.S., YAZID, S., FLOWER, R.J. Increased susceptibility of annexin-A1 null mice to nociceptive pain is indicative of a spinal antinociceptive action of annexin-A1. **Br. J. Pharmacol.**, v.154, p.1135-1142. 2008.
- 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.
- BLACKWELL, G. J. et al. Macro cortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoids. **Nature**, v.287, p.147–149. 1980.
- BORTEL, W.V., F DORLEANS, F., ROSINE, J. et al. W. Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. **Euro Surveill**, v.19, n.13, p. 20759. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico 23. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito *Aedes* (dengue, Chikungunya e zika), semanas epidemiológicas 1 a 23, 2021.** v. 52. nº 23. Disponível em < https://www.gov.br/saude/ptbr/media/pdf/2021/junho/21/boletim_epidemiologico_svs_23.pdf>, acesso em 27 de junho de 2021.

BRITO, C.A.A., SOHSTEN, A.K.A.V., LEITÃO, C.C.S. et al. Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.49, n.6, p.668-679. 2016.

BROECKEL, R., HAESE, N., MESSAOUDI, I., STREBLOW, D.N. Nonhuman Primate Models of Chikungunya Virus Infection and Disease (CHIKV NHP Model). **Pathogens.** v.4, p. 662-681. 2015.

BROWN, C.C., GUDJONSON, H., PRITYKIN, Y. et al. Transcriptional Basis of Mouse and Human Dendritic Cell Heterogeneity. **Journals & Books.** v.179, n.4, 31, p.846-863.e24. 2019.

BRUSCHI, M., PETRETTO, A., VAGLIO, A. et al. Annexin A1 and Autoimmunity: From Basic Science to Clinical Applications. **Int J Mol Sci.** v.19, n.5, p.1348. 2018.

CABEZA-CABRERIZO, M., CARDOSO, A., MINUTTI, C.M., COSTA, M.P., SOUSA, C.R. Dendritic Cells Revisited. **Annual Review of Immunology.**v.39, p.131-166. 2021.

CARTY, M., GUY, C., BOWIE, A.G. Detection of Viral Infections by Innate Immunity. **Biochemical Pharmacology.** v.183, p.114316. 2021.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Chikungunya virus - geographic distribution.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>, acesso em 13 de junho de 2021.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Chikungunya virus in the United States Disponível online em: <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states.html>, acesso em 02 de julho de 2021.

CERNY, T., SCHWARZ, M., SCHWARZ, U., LEMANT, J., GÉRARDIN, P., KELLER, E. The range of neurological complications in chikungunya fever. **Neurocrit Care** v.27, n.3, p.447–457. 2017.

CHANG, A.Y., ENCINALES, L., PORRAS, A., et al. Frequency of chronic joint pain following Chikungunya virus infection: a colombian cohort study. **Arthritis Rheum.** v.70, p.578–84. 2018.

CHATTERJEE, B.E., YONA, S., ROSIGNOLI, G. et al. Annexin 1-deficient neutrophils exhibit enhanced transmigration in vivo and increased responsiveness in vitro. **J Leukoc Biol.** v.78, n.3, p.639-46. 2005.

CHEN, G.L., COATES, E.E., PLUMMER, S.H., CARTER, C.A, BERKOWITZ, N., CONAN-CIBOTTI, M., et al. Effect of a Chikungunya virus-like particle vaccine on safety and tolerability outcomes. **JAMA.** v.323, p.1369. 2020.

CHEN, W., FOO, S.S., TAYLOR, A., LULLA, A., MERITS, A., HUESTON, L., et al. Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein synthesis, protects against bone loss induced by chikungunya virus infection. **J Virol.** v.89, p.581–93. 2015.

CHEN, W., FOO, S.S., ZAID, A. et al. Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. **Nat Microbiol.** v.10, p.1435-1445. 2017.

CHIURCHIÙ, V., LEUTI A., MACCARRONE, M. Bioactive lipids and chronic inflammation: managing the fire within. **Front. Immunol.** v.9. 2018.

CHOW, A., HER, Z., ONG, E.K, et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **J. Infect. Dis.** v.203, p.149-57.2011.

CIRINO, G., CICALA, C., SORRENTINO, L., CILIBERTO, C., ARPAIA, G., PERRETTI, M., FLOWER, R.J. Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. **Br J Pharmacol.** v.108, p. 573-574. 1993.

COSTA, V.V., FAGUNDES, C.T., VALADÃO, D.F., CISALPINO, D. et al. A model of DENV-3 infection that recapitulates severe disease and highlights the importance of IFN- γ in host resistance to infection. *Plos. Neglect. Trop. D.* v. 6, p. e1663, 2012.

COSTA, V.V., SUGIMOTO, M.A., HUBNER, J. ET al. Targeting the Annexin A1-FPR2/ALX pathway for host-directed therapy in dengue disease. *In press.*

COUDERC, T., LECUIT, M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. **Antivir. Res.** v.121, p.120–131. 2015.

CYSTER, J.G., SCHWAB, S.R. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. **Annu Rev Immunol.** v.30, p.69-94.2012.

D'ACQUISTO, F., MERGHANI, A., LECONA, E. et al. Annexin-1 modulates T-cell activation and differentiation. **Blood.** v.109, n.3, p.1095–1102. 2007.

D'ACQUISTO, F., PERRETTI, M., FLOWER, R.J. Annexin-A1: a pivotal regulator of the innate and adaptive immune systems. **British Journal of Pharmacology**, v.155, p.152–169. 2008.

D'ACUNTO, C.W., GBELCOVA, H., FESTA, M., RUMML, T. The complex understanding of Annexin A1 phosphorylation. **Cellular Signalling**. v.26, n.1, p.173-178. 2014.

DALLI, J., MONTERO-MELENDZ, T., MCARTHUR, S, et al. Annexin A1 N-terminal derived Peptide Ac₂₋₂₆ exerts chemokinetic effects on human neutrophils. **J. Front Pharmacol**. v.3, p.4410-4418. 2012.

DE JONGH RF, VISSERS KC, MEERT TF, BOOIJ LH, DE DEYNE CS, HEYLEN RJ. The role of interleukin-6 in nociception and pain. **Anesth Analg**. v.96, p.1096–1103.2003.

DUIJL-RICHTER, M.K.S, HOORNWEG, T.E., RODENHUIS-ZYBERT, I.A., SMIT, J.M. Early Events in Chikungunya Virus Infection — From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. **Viruses**. v.7, n.7, p.3647–3674. 2015.

EDINGTON, F., VARJÃO, D., MELO, P. Incidence of articular pain and arthritis after chikungunya fever in the Americas: A systematic review of the literature and meta-analysis. **Revue du Rhumatisme**, v.86, n.6, p. 563-572. 2019.

ERNST, J.D., HOYE, E., BLACKWOOD, R.A, JAYE. D. Purification and characterization of an abundant cytosolic protein from human neutrophils that promotes Ca²⁺-dependent aggregation of isolated specific granules. **J Clin Invest**. v.85, p.1065–1071.1990.

FILEP, J.G., SHEKERIB, M., KEBIR, D.E. Targeting formyl peptide receptors to facilitate the resolution of inflammation. **Eur. J. Pharmacol**. v.833, p.339–348. 2018.

FLOWER, R. J., ROTHWELL, N. J. Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. **Trends Pharmacol. Sci**. v.15, p.71– 76. 1994.

FLOWER, R.J. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. **Br J Pharmacol**. v.94, p.987-1015.1988.

FLOWER, R.J., BLACKWELL, G.J. Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. **Nature**. v.278, p.456-459. 1979.

GALVÃO I., VAGO J.P., BARROSO L.C., TAVARES L.P., et al. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout. **Eur J Immunol**. v. 47, n.3, p.585-596. 2017.

GARDNER, J.; ANRAKU, I.; LE. TT.; LARCHER, T.; MAJOR, L.; ROQUES, P.; SCHRODER, W.A.; HIGGS, S.; SUHRBIER, A. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. **J Virol**. v.84, p.8021–8032.2010.

GERKE, V., CREUTZ, C.E; MOSS, S.E. Annexins: linking Ca²⁺ signaling to membrana dynamics. **Nature Rev. Mol. Cell Biol**. v.6, 449–461. 2005.

GETTING, S.J.; FLOWER, R.J.; PERRETTI, M. Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. **Br. J. Pharmacol.** v.120, p.1075–1082. 1997.

GOLD R., R. B. PEPINSKY, U. K. ZETTL, K. V. TOYKA, H. P. HARTUNG. Lipocortin-1 (annexin-1) suppresses activation of autoimmune T cell lines in the Lewis rat. **J. Neuroimmunol.** v.69, p.157–164. 1996.

GREWAL, T., RENTERO, C., CARLOS ENRICH et al. Annexin Animal Models — From Fundamental Principles to Translational Research. **Int. J. Mol. Sci.**v.22, p.343. 2021.

HAESE, N.H., BROECKEL, R.M., HAWMAN, D.W. et al. Animal Models of Chikungunya Virus Infection and Disease. **J. Infect. Dis.** v.214, n.5, p.S482–S487. 2016.

HAN, P.F., CHE, X.D., LI, H.Z. et al. Annexin A1 involved in the regulation of inflammation and cell signaling pathways. **Chin. J. Traumat.** v. 23, n.2, p.96-101. 2020.

HANNON, R., CROXTALL, J. D., GETTING, S. J., ROVIEZZO, F., YONA, S., PAUL-CLARK, M. J., et al. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. **FASEB J.** v.17, p.253–255. 2003.

HIROKI, C.H., TOLLER-KAWAHISA, J.E., FUMAGALLI, M.J., COLON, D.F., FIGUEIREDO, L.T.M., FONSECA, B. A. L. D., FRANCA, R.F. O., CUNHA, F.Q. Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection. **Front Immunol.** v.10, p.3108. 2019.

HOARAU, J-J.; BANDJEE, M-C.; TROTOT, P.; DAS, T.; LI-PAT-YUEN, G.; DASSA, B et al. Persistent chronic inflammation and infection by chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **J Immunol.** v.184, p.5914–27. 2010.

HUANG, J.J., XIA, C.J., YING WEI, Y. et al. Annexin A1-derived peptide Ac₂₋₂₆ facilitates wound healing in diabetic mice. **Wound. Rep Reg.** v.28, p.772-779.2020.

HUCKE, F.I.L., BESTEHORN-WILLMANN, M., BUGERT, J. Prophylactic strategies to control chikungunya virus infection. **Virus Genes.** v.57, p.133–150, 2021.

IMAD, H.A., MATSEE, W., KLUDKLEEB, S. et al. Post–Chikungunya Virus Infection Musculoskeletal Disorders: Syndromic Sequelae after an Outbreak. **Trop. Med. Infect. Dis.** v.6, n.2, p.52. 2021.

JEEVAKUMAR, V., AL SARDAR, A.K., MOHAMED, F. et al. IL-6 induced upregulation of T-type Ca²⁺ currents and sensitization of DRG nociceptors is attenuated by MNK inhibition. **J Neurophysiol**, v.124, p.274–283. 2020.

KAM, Y.W., ONG, E.K.S., RÉNIA, L., TONG, J.C., NG, L.F.P. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. **Microbes and Infection**. v.11, p.1186-1196. 2009.

KAMAL A. M., S. F. SMITH, M. DE SILVA WIJAYASINGHE, E. SOLITO, C. J. CORRIGAN. An Annexin 1 (ANXA1)-derived peptide inhibits prototype antigen-driven human T cell Th1 and Th2 responses in vitro. *Clin. Exp. Allergy*. v.31, p.1116–1125. 2001.

KELVIN, A.A., BANNER, D., SILVI, G. et al. Inflammatory cytokine expression is associated with Chikungunya virus resolution and symptom severity. **PLoS. Negl. Trop. Dis**. v.5, p.1279. 2011.

KOURTZELIS, I., HAJISHENGALLIS, G., CHAVAKIS, T. Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. **Front. Immunol**.v.11, p.1-8,2020.

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, p.2475–2481. 2017.

LA, M., D'AMICO, M., BANDIERA, S., DI FILIPPO, C. OLIANI, S.M., GAVINS, F.N.E., FLOWER, R.J., PERRETTI, M. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: analysis of their mechanism of action. **Fed Am Soc Exp Biol J**. v.115, p. 2247-2256. 2001.

LARRIEU, S.; POUDEROUX, N.; PISTONE, T.; FILLEUL, L.; RECEVEUR, M.-C.; SISSOKO, D.; EZZEDINE, K.; MALVY, D. Factors associated with persistence of arthralgia among chikungunya virus-infected travellers: Report of 42 French cases. **J. Clin. Virol**. v.47, p.85–88. 2010.

LEE, W.W.L.; TEO, T.H.; HER, Z. et al. Expanding Regulatory T Cells Alleviates Chikungunya Virus-Induced Pathology in Mice. **J Virol**. v.89, n.15, p.7893–7904.2015.

LOCATELLI, I., SUTTI, S., JINDAL, A. et al. Endogenous annexin A1 is a novel protective determinant in nonalcoholic steatohepatitis in mice. **Hepatology**.v.60, p.531–544. 2014.

LONG, K.M., WHITMOREA, A.C., MARTIN T. FERRIS, M.T. et al. Dendritic Cell Immunoreceptor Regulates Chikungunya Virus Pathogenesis in Mice.**ASM Journals. Journal of Virology**. v. 87, n.10, p. 5697-5706. 2013.

LUM, F.M., NG, L.F. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antivir. Res.** v.120, p.165-174. 2015.

LUM, F.M., TEO, T.H., LEE, W.W.L., KAM, Y.W., RENIA, L., NG, L.F.P. An Essential Role of Antibodies in the Control of Chikungunya Virus Infection. **The Journal of Immunology.** 2013; v.190, n.12, p.6295–302. 2013.

LUMSDEN, W.H. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. II. General description and epidemiology. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.49, p. 33-57, 1955.

LUO, Z., WANG, H., FANG, S. et al. Annexin-1 Mimetic Peptide Ac₂₋₂₆ Suppresses Inflammatory Mediators in LPS-Induced Astrocytes and Ameliorates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Inflammatory Pain. **Cell Mol Neurobiol.** v.40, n.4, p.569-585. 2020.

MACHADO, L.C., MORAIS-SOBRAL, M.C., CAMPOS, T.L. et al. Genome sequencing reveals coinfection by multiple chikungunya virus genotypes in a recent outbreak in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases.** p.15., 2019.

MACHADO, M.G., TAVARES, L.P., SOUZA, G.V.S. et al. The Annexin A1/FPR2 pathway controls the inflammatory response and bacterial dissemination in experimental pneumococcal pneumonia. **The FASEB Journal.** v.34, p.2749–2764. 2020.

MCARTHUR, S., GOBBETTI, T., KUSTERS, D.H.M., REUTELINGSPERGER, C.P., FLOWER, R.J., PERRETTI, M. Definition of a Novel Pathway Centered on Lysophosphatidic Acid To Recruit Monocytes during the Resolution Phase of Tissue Inflammation. **J. Immunol.** v.195, n.3, p.1139–1151.2015.

MCARTHUR, S., JUBAN, G., GOBBETTI, T., et al. Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. **Journal of Clinical Investigation**, v.130, n.3, p.1156– 1167.2020,

MOLÁS, R.B.; RIBEIRO, M.R; RAMALHO DOS SANTOS, M.J et al. The involvement of annexin A1 in human placental response to maternal Zika virus infection. **Antiviral Res.** v.179, p.104809.2020.

MORAND E. F., P. HUTCHINSON, A. HARGREAVES, N. J. et al. Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v.76, p.195–202. 1995.

MOREIRA, T.P. **Implementação de um modelo murino de infecção pelo Chikungunya virus para o estudo da patogênese e identificação de potenciais alvos terapêuticos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) -

Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. p.106. 2018.

MORRISON T.E., OKO L., MONTGOMERY S.A., WHITMORE A.C., LOTSTEIN A.R., GUNN B.M., ELMORE S.A., HEISE M.T. A Mouse Model of Chikungunya Virus–Induced Musculoskeletal Inflammatory Disease. **Am. J. Pathol.** v.178, p.32–40. 2011.

MURALIDHARAN, A., REID, P. Complex Roles of Neutrophils during Arboviral Infections. **Cells.** v.10, n.6, p.1324. 2021.

MURPHY PG, GRONDIN J, ALTARES M, RICHARDSON PM. Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci.*v.15, p.5130–5138. 1995.

NATHAN, C., DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell.** v.140, p.871–82. 2010.

NEURATH, M.F. Resolution of inflammation: from basic concepts to clinical application. **Seminars in Immunopathology.** v.41, p.627–631. 2019.

NEXTSTRAIN. Molecular epidemiology of Chikungunya virus. Disponível online em: <https://nextstrain.org/community/ViennaRNA/CHIKV?>, acesso em 2 de julho de 2021.

NG, LF, A. CHOW, YJ SUN, DJ KWEK, et al. IL-1beta, IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PLoS One**, v. 4, p.e4261. 2009.

NI, C., GAO, S., ZHENG, Y. et al. Annexin A1 Attenuates Neutrophil Migration and IL-6 Expression through Fpr2 in a Mouse Model of *Streptococcus suis* -Induced Meningitis. **ASM J. Infection and Immunity.** v.89, n.3, p. e00680-20. 2021.

NORET, M., HERRERO, L., NESTOR RULLI, N. et al. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts. **J. Infect. Dis.** v.206, n.3, p.455-7: 457-9. 2012.

PAIXÃO, E.S., RODRIGUES, L.C., DA CONCEIÇÃO, COSTA, N.M., et al. Chikungunya chronic disease: a systematic review and meta-analysis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.112, p.301–316. 2018.

PEI, L., ZHANG, J., ZHAO, F., SU, T., WEI, H., TIAN, J., LI, M., SHI, J. Annexin 1 exerts anti-nociceptive effects after peripheral inflammatory pain through formyl-peptide-receptor-like 1 in rat dorsal root ganglion. **Br J Anaesth.** v.107, n.6, p.948-58. 2011.

PERRETTI, M. et al. Annexin I is stored within gelatinase granules of human neutrophils and mobilised on the cell surface upon adhesion but not phagocytosis. **Cell Biol. Int.** v.24, p.163–174, 2000.

PERRETTI, M., AHLUWALIA, A., HARRIS, J. G., et al. Lipocortin-1 fragments inhibit neutrophil accumulation and neutrophil-dependent edema in the mouse: a qualitative comparison with an anti-CD11b monoclonal antibody. **J. Immunol.** v.151, p.4306–4314. 1993.

PERRETTI, M., CHIANG, N., LA, M, et al. Endogenous lipid- and peptide-derived anti-inflammatory pathways generated with glucocorticoid and aspirin treatment activate the lipoxin A4 receptor. **Nat Med.** v.8, p.1296-1302. 2002.

PERRETTI, M., COOPER, D., DALLI, J., NORLING, L. V. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.13, n.2, p.87– 99. 2017.

PERRETTI, M., D'ACQUISTO, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.** v.9, p.62-70. 2009.

PERRETTI, M., GODSON, C. Formyl peptide receptor type 2 agonists to kick-start resolution pharmacology. **Br J Pharmacol.** v.177, n.20, p. 4595-4600. 2020.

PERRETTI, M., LEROY, X., BLAND, E.J., MONTERO-MELENDZ, T. Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation. **Trends Pharmacol Sci.** v.36, p.737–755. 2015.

PERRETTI, M.; FLOWER, R.J. Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: Modulation by glucocorticoids and inflammation. **Br. J. Pharmacol.** v.118, p.605–610. 1996.

PERUCCI, L.O., SUGIMOTO, M.A., GOMES, K.B., DUSSE, L.M., TEIXEIRA, M.M., SOUSA, L.P. Annexin A1 and specialized proresolving lipid mediators: promoting resolution as a therapeutic strategy in human inflammatory diseases. **Expert Opinion on Therapeutic Targets.** v.21., n.9, p.18. 2017.

PHUKLIA, W. et al. Osteoclastogenesis induced by CHIKV- infected fibroblast- like synoviocytes: a possible interplay between synoviocytes and monocytes/ macrophages in CHIKV- induced arthralgia/arthritis. **Virus Res.** v.177, p.179–188 2013.

PIERETTI, S., GIANNUARIO, A.D., FELICE, M.D., PERRETTI, M., CIRINO, G. Stimulus-dependent specificity for annexin 1 inhibition of the inflammatory nociceptive response: the involvement of the receptor for formylated peptides. **Pain.** v.109, p.52-63. 2004.

POH, C.M.; CHAN, Y.H.; NG, L.F.P. Role of T Cells in Chikungunya Virus Infection and Utilizing Their Potential in Anti-Viral Immunity. **Front Immunol.** v. 11, p.287. 2020.

- PRIYA, R., DHANWANI, R., PATRO, I.K., RAO, P.V.L., PARIDA, M.M. Differential regulation of TLR mediated innate immune response of mouse neuronal cells following infection with novel ECSA genotype of Chikungunya virus with and without E1:A226V mutation. **Infect Genet Evol.** v.20, p.396-406. 2013.
- PUTTAMALLESH, V.N., SREENIVASAMURTHY, S.K., SINGH, P.K., et al. Proteomic profiling of serum samples from chikungunya infected patients provides insights into host response. *Clin. Proteomics.* v.10, p.14. 2013.
- QUEIROZ-JUNIOR, C.M., MADEIRA, M.F.M., FERNANDA MATOS COELHO, F.M. et al. Experimental arthritis triggers periodontal disease in mice: involvement of TNF- α and the oral Microbiota. **J Immunol.** v.187, n.7, p.3821-30. 2011.
- RAHMAN, F., CHEBBO, M., COURTIN, N., FOTSO, A.F., ALESSI, M.C., BÉATRICE RITEAU, B. The Annexin A1 Receptor FPR2 Regulates the Endosomal Export of Influenza Virus. **Int J Mol Sci.** v. 19, n.5, p.1400. 2018.
- RAMSAUER, K., REISINGER, E., FIRBAS, C., et al. Phase 2 clinical results: Chikungunya vaccine based on measles vector (MV-CHIK) induces humoral and cellular responses in the presence of pre-existing anti measles immunity. **Int J Infect Dis.** v.79, p.118. 2019.
- ROSENGARTH, A., GERKE, V., LUECKE, H. X-ray Structure of Full-length Annexin 1 and Implications for Membrane Aggregation. **J. Mol. Biol.** v.306, p.489-498. 2001.
- ROVIEZZO, F., GETTING, S. J., PAUL-CLARK, M.J. et al. The annexin-1 knockout mouse: what it tells us about the inflammatory response. **J Physiol Pharmacol.** v.53, p.541-53. 2002.
- 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 –9898. 2012.
- SADIK, C.D., KIM, N.D., LUSTER, A.D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends in Immunology.** v.32, n.10, p. 452-460. 2011.
- SAWANT, K.V., SEPURU, K.M., LOWRY, E. et al. Neutrophil recruitment by chemokines Cxcl1/KC and Cxcl2/MIP2: Role of Cxcr2 activation and glycosaminoglycan interactions. **J Leukoc Biol.** v.109, n.4, p.777-791. 2021.
- SCANNELL, M., FLANAGAN, M. B., DE STEFANI, A., et al. Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. **J. Immunol.** v.178, p.4595– 4605. 2007.
- SCHLOER, S., HÜBEL, N., MASEMANN, D., et al. The annexin A1/FPR2 signaling axis expands alveolar macrophages, limits viral replication, and attenuates

pathogenesis in the murine influenza A virus infection model. *FASEB. J.* v.33, p.12188–12199. 2019.

SCHUFFENECKER, I. ITEMAN, I., MICHAULT, A. et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. ***PLoS Med.*** v.3, p. e263. 2006.

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

SENCHEKOV, E.Y., ANSARI, J., BECKER, F. et al. Novel Role for the AnxA1-Fpr2/ALX Signaling Axis as a Key Regulator of Platelet Function to Promote Resolution of Inflammation. ***Circulation.*** v.140, n.4, p.319-335. 2019.

SERHAN, C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. ***Nature,*** v.510, p. 92-101. 2014.

SERHAN, C.N., GUPTA, S.K., PERRETTI, M. et al. The Atlas of Inflammation Resolution (AIR). ***Molecular Aspects of Medicine.*** v.74, p.100894. 2020.

SILVA, J. V. JR., LUDWIG-BEGALL, L. F., DE OLIVEIRA-FILHO, E. F., OLIVEIRA, R. A., DURÃES-CARVALHO, R., LOPES, T. R., et al. A scoping review of Chikungunya virus infection: epidemiology, clinical characteristics, viral co-circulation complications, and control. *Acta. Trop.* v.188, p.213–224, 2018.

SIMIZU, B., YAMAMOTO, K., HASHIMOTO, K., OGATA, T. Structural proteins of Chikungunya virus. ***J. Virol.*** v.51, p.254–258. 1984.

SOLITO, E., ROMERO, I.A, MARULLO, S., RUSSO-MARIE, F., WEKSLER, B.B. Annexin 1 binds to U937 monocytic cells and inhibits their adhesion to microvascular endothelium: involvement of the alpha 4 beta 1 integrin. ***J Immunol.***v.165, n.3, p.1573-81. 2000.

SONG H, ZHAO Z, CHAI Y, et al. Molecular basis of arthritogenic alphavirus receptor MXRA8 binding to Chikungunya virus envelope protein. ***Cell.*** v.177, p.1714–1724.e12. 2019.

SRIVASTAVA, P., KUMAR, A., HASAN, A. et al. Disease Resolution in Chikungunya—What Decides the Outcome? ***Front. Immunol.*** v.11:695.2020.

STELITANO, D., CHIANESE, A., ASTORRI, R., SERRETIELLO, E. et al. Chikungunya virus: Update on molecular biology, epidemiology and current strategies. ***Translational Medicine Reports.*** v3, n.1, 2019.

STOERMER, K.A.; BURRACK, A., OKO, L; MONTGOMERY, S.A.; BORST, L.B.; GILL, R.G.; MORRISON, T.E. Genetic Ablation of Arginase 1 in Macrophages and

Neutrophils Enhances Clearance of an Arthritogenic Alphavirus. **J Immunol.** v. 189, n.8, p.4047–4059. 2012.

SUCHOWIECKI, K., REID, P., SIMON, G.L., FIRESTEIN, G.S., CHANG, A. Persistent Joint Pain Following Arthropod Virus Infections. **Curr Rheumatol Rep.** v.23, n. 26, p.1-12, 2021.

SUGIMOTO, M.A., VAGO, J.P., PERRETTI, M., TEIXEIRA, M.M. Mediators of the Resolution of the Inflammatory Response. **Trends. Immunol.** v. 40, n.3, p.212-227. 2019.

SUGIMOTO, M.A., VAGO, J.P., TEIXEIRA, M.M., SOUSA, L.P. Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance **J. Immunol. Res.** v.2016, p.13. 2016.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nat. Rev. Rheumatol.** v.15, p.597-611. 2019.

SUKKAEW, A. et al. Heterogeneity of clinical isolates of chikungunya virus and its impact on the responses of primary human fibroblast- like synoviocytes. **J. Gen. Virol.** v.99, p.525–535. 2018.

TEO, T.; CHAN, Y-H.; LEE, W.W.; LUM, F.; AMRUN, S.; HER, Z, et al. Fingolimod treatment abrogates chikungunya virus-induced arthralgia. **Sci Transl Med.** v.9, p.333. 2017.

TEO, T.H.; LUM, F.M.; CLASER, C.; LULLA, V.; LULLA, A.; MERITS, A.; RÉNIA, L.; NG, L.F.P. A pathogenic role for CD4+ T cells during chikungunya virus infection in mice. **J Immunol.** v.190, p.259–269. 2013.

TSETSARKIN, K.A., VANLANDINGHAM, D.L., MCGEE, C.E., S. HIGGS S. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. **PLoS Pathog.** v.3, p. e201. 2007.

VAGO, J.P., NOGUEIRA, C.R.C., TAVARES, L.P. et al. Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. **J Leukoc Biol.** v.92, n.2, p.249-58. 2012.

VAGO, J.P., TAVARES, L.P., RICCARDIC, C., MAURO M. TEIXEIRA, M.M., SOUSA, L.P. Exploiting the pro-resolving actions of glucocorticoid-induced proteins Annexin A1 and GILZ in infectious diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy,** v.133, p.111033. 2021.

VOSS, J.E. et al. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. **Nature.** v.468, n.7324, p.709–712. 2010.

WAHID, B., ALIA, 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., FORRESTER, N.L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**.v.120, p.32-39.2015.

WEYD, H., ABELER-DÖRNER, L., LINKE, B. et al. Annexin A1 on the Surface of Early Apoptotic Cells Suppresses CD8+ T Cell Immunity. **Plos One**. v.8, n.4, p.e62449. 2013.

WHO. World Health and Organization, 2021. **Chikungunya**. Disponível online em;<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>>, acesso em 30 de junho de 2021.

YACTAYO, S., STAPLES, J. E., MILLOT, V., CIBRELUS, L., RAMON-PARDO, P. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. **J. Infect. Dis**. v.214, p.S441–S445. 2016.

YANG, Y.H., MORAND, E.F., GETTING, S.J. ET al. Modulation of inflammation and response to dexamethasone by Annexin 1 in antigen-induced arthritis. **Arthritis & rheumatism**. v.50, p. 976–984 2004.

YAZID, S., NORLING, L.V., FLOWER, R.J. Anti-inflammatory drugs, eicosanoids and the annexin A1/FPR2 anti-inflammatory system. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**. v.98, n.3–4, p. 94-100. 2012.

YOUSEFI, S., STOJKOV, D., GERMIC, N., et al. Untangling “NETosis” from NETs. **Eur J Immunol**. v.49, n.2, p.221-227. 2019.

ZAID, A.; GÉRARDIN, P.; TAYLOR, A.; MOSTAFAVI, H.; MALVY, D.; MAHALINGAM, S. Chikungunya arthritis: implications of acute and chronic inflammation mechanisms on disease management. **Arthritis Rheumatol**. v.70, p.484–495. 2018.

Anexos

ANEXOS

ANEXO 1 – Estatística descritiva

Tabela 3. Níveis de mediadores inflamatórios produzidos no coxim plantar de camundongos WT infectados ou não com 10⁶ PFU de CHIKV.

Genótipo	MEDIADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA				
	MPO (D.O)	CXCL1 / KC (pg/100mg)	CXCL2 / MIP-2 (pg/100mg)	IL-6 (pg/100mg)	IL-1 β (pg/100mg)
Mock WT	0,183 \pm 0,04	838,7 \pm 103,8	1527 \pm 98,91	304,0 \pm 60,03	149,1 \pm 29,32
6 hpi	*0,8258 \pm 0,133	*1390 \pm 49,64	2158 \pm 228,1	*742,7 \pm 84,91	*472,0 \pm 67,46
WT 12 hpi	*0,672 \pm 0,105	*1235 \pm 54,78	1949 \pm 284,9	*679,7 \pm 55,46	344,4 \pm 44,92
24 hpi	*0,720 \pm 0,080	*1170 \pm 83,06	2324 \pm 309,4	*828,6 \pm 114,1	237,6 \pm 54,33
48 hpi	0,2595 \pm 0,024	*1273 \pm 44,41	2501 \pm 75,96	*877,9 \pm 47,56	267,9 \pm 15,49

Os camundongos WT foram infectados ou não com CHIKV e a pata de cada animal foi coletada em diferentes *times points* (6, 12, 24 ou 48 hpi) para análises dos níveis de mediadores inflamatórios MPO, CXCL1 / KC, CXCL2 / MIP-2, IL-6 ou IL-1 β . A análise estatística foi feita utilizando ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. O grupo WT infectado foi considerado estatisticamente significativo do grupo não infectado (Mock) quando * p<0.05. Os dados demonstram o erro padrão da média (\pm EPM). Fonte: elaboração própria, 2021.

Tabela 4. Níveis de mediadores inflamatórios produzidos no coxim plantar de camundongos AnxA1^{-/-} ou WT infectados ou não com 10⁶ PFU de CHIKV.

Genótipo	MEDIADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA					
	MPO (D.O)	CXCL1 / KC (pg/100mg)	IL-6 (pg/100mg)	IL-10 (pg/100mg)	TNF- α (pg/100mg)	CCL2 / MCP-1 (pg/100mg)
Mock WT	*0,06 \pm 0,02 (n=4)	*220,0 \pm 55,88 50,19 (n=4)	\pm 55,61 \pm 8,994 (n=4)	\pm 55,61 \pm 14,44 (n=4)	\pm 43,65 \pm 17,05 (n=4)	\pm 84,84 \pm 20,06 (n=4)
Mock AnxA1^{-/-}	*0,011 \pm 0,003 (n=4)	*148,9 \pm 28,12 (n=4)	\pm 18,42 \pm 1,585 (n=4)	\pm 13,49 \pm 1,495 (n=4)	\pm 11,84 \pm 2,509 (n=4)	\pm 62,99 \pm 20,35 (n=4)
WT						
1 dpi	# 0,265 \pm 0,067 (n=6)	#2439 \pm 138,2 (n=6)	\pm 240,4 \pm 31,02 (n=6)	\pm 28,02 \pm 9,019 (n=6)	\pm 45,50 \pm 11,74 (n=6)	\pm *294,8 \pm 29,10 (n=6)
3 dpi	0,252 \pm 0,031 (n=5)	1593 \pm 134,1 (n=5)	\pm 94,02 \pm 10,60 (n=5)	\pm 47,73 \pm 5,942 (n=5)	\pm 54,97 \pm 12,57 (n=5)	\pm *270,5 \pm 27,75 (n=5)
7 dpi	0,063 \pm 0,027 (n=4)	1217 \pm 344,1 (n=4)	\pm 49,04 \pm 17,00 (n=4)	\pm *88,12 \pm 7,399 (n=4)	\pm 49,33 \pm 5,009 (n=4)	\pm *314,7 \pm 39,48 (n=4)
14 dpi	0,201 \pm 0,088 (n=5)	781,7 \pm 56,93 (n=5)	\pm 134,8 \pm 10,41 (n=5)	\pm *215,7 \pm 9,206 (n=5)	\pm *377,6 \pm 34,95 (n=5)	\pm *274,9 \pm 40,67 (n=5)
AnxA1^{-/-}						
1 dpi	#0,881 \pm 0,315 (n=4)	#3081 \pm 267,2 (n=4)	\pm 345,9 \pm 46,47 (n=4)	\pm 78,35 \pm 15,09 (n=4)	\pm 102,9 \pm 15,44 (n=4)	\pm *249,0 \pm 10,75 (n=4)
3 dpi	0,096 \pm 0,020 (n=4)	1060 \pm 60,57 (n=4)	\pm 81,45 \pm 13,48 (n=4)	\pm 77,36 \pm 24,09 (n=4)	\pm 57,23 \pm 24,10 (n=4)	\pm *252,1 \pm 13,53 (n=4)
7 dpi	0,249 \pm 0,040 (n=5)	728,2 \pm 84,66 (n=5)	\pm 30,42 \pm 4,076 (n=5)	\pm *146,1 \pm 13,78 (n=5)	\pm 49,48 \pm 7,063 (n=5)	\pm *254,2 \pm 7,598 (n=5)
14 dpi	0,213 \pm 0,046 (n=7)	877,5 \pm 94,59 (n=7)	\pm 107,0 \pm 7,567 (n=7)	\pm *234,7 \pm 18,49 (n=7)	\pm *294,0 \pm 44,90 (n=7)	\pm *287,0 \pm 28,75 (n=7)

Os camundongos WT foram infectados ou não com CHIKV e o coxim plantar de cada animal foi coletado em diferentes *times points* (1, 3, 7 ou 14 dpi) para análises dos níveis de mediadores inflamatórios MPO, CXCL1 / KC, IL-6, IL-10, TNF- α ou CCL2 / MCP-1. A análise estatística foi feita utilizando ANOVA two way seguido do pós-teste de Sidak. O grupo infectado foi considerado estatisticamente significativo do grupo não infectado (Mock) quando * p<0.05 e os grupos de animais infectados AnxA1^{-/-} ou WT apresentaram diferenças quando # p<0.05. Os dados demonstram o erro padrão da média (\pm EPM). Fonte: elaboração própria, 2021.

Tabela 5. Níveis de mediadores inflamatórios produzidos no coxim plantar de camundongos WT infectados ou não com 10⁶ PFU de CHIKV e tratados ou não com o peptídeo mimético da AnxA1 (Ac₂₋₂₆).

Genótipo	MEDIADORES INFLAMATÓRIOS		
	MPO (D.O)	CXCL1 / KC (pg/100mg)	IL-6 (pg/100mg)
Mock WT (água de injeção)	*0,057 ± 0,014 (n=4)	*217,8 ± 27,64 (n=4)	*140,6 ± 19,21 (n=4)
Mock (Ac ₂₋₂₆)	0,062 ± 0,013 (n=4)	*217,8 ± 14,38 (n=4)	*142,6 ± 8,05 (n=4)
WT + CHIKV 2dpi + (água de injeção)	0,436 ± 0,103 (n=5)	698,3 ± 28 (n=4)	351,6 ± 15,75 (n=4)
Ac ₂₋₂₆ + CHIKV 2dpi	#0,174 ± 0,050 (n=5)	#537,0 ± 42,78 (n=5)	#254,5 ± 13,19 (n=5)

Os animais BALBc / WT foram infectados com 10⁶ PFU de CHIKV, via intraplantar. Um grupo foi tratado com Ac₂₋₂₆ (150µg / animal, via i.p) 1 hora antes da infecção e 24 horas pós-infecção, completando apenas dois tratamentos com o peptídeo. Outro grupo foi tratado apenas com 100µL de água de injeção, via i.p. Os animais foram eutanasiados 48 horas pós-infecção e o coxim plantar de cada animal foi coletado para quantificação dos níveis de **A) MPO**, **B) CXCL1** e **C) IL-6**. A análise estatística foi feita usando ANOVA one way seguido do pós-teste de Tukey. Os grupos infectados foram considerados estatisticamente significativos dos grupos não infectados (Mock) quando * p<0.05 e os grupos de animais infectados tratados ou não com o peptídeo mimético da AnxA1 apresentaram diferenças quando # p<0.05. Os dados demonstram o erro padrão da média (± EPM). Fonte: elaboração própria, 2021.

Tabela 6. Título viral recuperado nos órgãos ou plasma de camundongos AnxA1^{-/-} ou WT infectados com CHIKV.

Amostra	Dias pós-infecção por CHIKV (10 ⁶ PFU)									
	1 dpi		3 dpi		7 dpi		14 dpi			
	WT	AnxA1 ^{-/-}	WT	AnxA1 ^{-/-}	WT	AnxA1 ^{-/-}	WT	AnxA1 ^{-/-}		
Coxim	8,525 ± 0,079	#7,973 ± 0,123	7,148 ± 0,088	#6,680 ± 0,096	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	
plantar					0,000	0,000	0,000	0,000		
Tornozelo	7,515 ± 0,529	7,538 ± 0,553	5,444 ± 0,229	5,021 ± 0,217	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	
Joelho	4,464 ± 0,093	4,452 ± 0,110	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	
Linfonodo poplíteo	4,535 ± 0,208	4,109 ± 0,127	2,352 ± 0,122	2,658 ± 0,137	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	
Quadríceps	3,358 ± 0,071	#2,534 ± 0,244	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	
Baço	5,615 ± 0,067	#5,114 ± 0,153	2,494 ± 0,201	#2,000 ± 0,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	
Fígado	5,189 ± 0,238	#4,717 ± 0,176	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	
Plasma	4,581 ± 0,095	4,585 ± 0,122	2,000 ± 0,000	2,000 ± 0,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	± 2,000	±	

Os camundongos AnxA1^{-/-} ou WT foram infectados com 10⁶ PFU de CHIKV e os órgãos e plasma de cada animal foi coletado em diferentes *times points* (1, 3, 7 ou 14 dpi) para determinação do título viral de CHIKV a partir de ensaio de formação de placas em células da linhagem Vero. Os resultados são apresentados como PFU por mL de plasma ou PFU por mg de tecido. O limite de detecção do teste é de 2 PFU, que é equivalente a não detecção de carga viral. A análise estatística foi feita usando ANOVA one way seguido do pós-teste de Tukey. O grupo AnxA1^{-/-} foi considerado estatisticamente significativo do grupo WT quando # p<0.05. Os dados demonstram o erro padrão da média (± EPM). Fonte: elaboração própria, 2021.

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE
ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA / UFMG



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

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

Protocolo CEUA: 135/2019

Título do projeto: PAPEL DO RECEPTOR DE FORMIL PEPTÍDEO 2 (FPR2) E DA MOLÉCULA PRÓ-RESOLUTIVA (ANEXINA A1) NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELOS ALFAVARÍRUS CHIKUNGUNYA E MAYARO EM CAMUNDONGOS

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Vivian Vasconcelos Costa

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: **Decisão Final – Aprovado**

Aprovado na reunião do dia 19/08/2019. Validade: 19/08/2019 à 18/08/2024

Belo Horizonte, 19/08/2019.

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@prpq.ufmg.br