

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-graduação em Microbiologia**

Carla Daiane Ferreira de Sousa

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA COMO DETERMINANTE PARA A MANUTENÇÃO  
DE HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO CHIKUNGUNYA VÍRUS**

Belo Horizonte

2023

Carla Daiane Ferreira de Sousa

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA COMO DETERMINANTE PARA A MANUTENÇÃO  
DE HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO CHIKUNGUNYA VÍRUS**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Danielle da Glória de Souza

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Vivian Vasconcelos Costa

Belo Horizonte

2023

043

Sousa, Carla Daiane Ferreira de.

Resposta inflamatória como determinante para a manutenção de hipemocicepção induzida pelo Chikungunya vírus [manuscrito] / Carla Daiane Ferreira de Sousa. – 2023.

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

Orientadora: Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Danielle da Glória de Souza. Coorientadora: Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Vivian Vasconcelos Costa.

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

1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Arbovirus. 4. Inflamação. 5. Dor. I. Souza, Danielle da Glória de. II. Costa, Vivian Vasconcelos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

### ATA DE DEFESA DE TESE

#### ATA DA DEFESA DE TESE DE CARLA DAIANE FERREIRA DE SOUSA

Nº REGISTRO: **2019703860**

Às 09:00 horas do dia 16 de fevereiro de 2023, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (Departamento de Microbiologia/ICB /UFMG), Gustavo Batista de Menezes (Universidade federal de Minas Gerais), Thiago Mattar Cunha Universidade de São Paulo - USP), Adriana Cristina Soares de Souza (Universidade Federal de São João Del Rei) e a Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza (Orientadora), para julgar o trabalho final "Resposta Inflamatória como Determinante para a Manutenção de Hipernocicepção Induzida por Chikungunya Vírus" da aluna Carla Daiane Ferreira de Sousa, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerado APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2023

#### Membros da Banca:

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Prof. Dr. Gustavo Batista de Menezes

Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha

Profa. Dra. Adriana Cristina Soares de Souza

#### De acordo:

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Orientadora)

Prof. Daniel de Assis Santos  
(Subcoordenador do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Mattar Cunha, Usuário Externo**, em 16/02/2023, às 15:24, 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 **Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Professora do Magistério Superior**, em 16/02/2023, às 15:28, 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 **Adriana Cristina Soares de Souza, Usuário Externo**, em 16/02/2023, às 15:30, 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 **Gustavo Batista de Menezes, Professor do Magistério Superior**, em 16/02/2023, às 15:33, 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 **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 17/02/2023, às 21:16, 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 **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 23/02/2023, às 10:17, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2036893** e o código CRC **4B0BB8E5**.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, da minha trajetória profissional. A todos os professores, colegas e orientadoras da UFSJ e UFMG. Guardo a todos com carinho no coração, muito obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente à Prof. Danielle por me acolher nessa família linda do LIMHO, agradeço por toda confiança e apoio. Obrigada por todas as oportunidades, puxões de orelha e todo o suporte durante esses seis anos de laboratório.

À Prof. Vivian, pelos aprendizados, convivência e todo o suporte que foi essencial para o desenvolvimento do trabalho. Obrigada ainda pelos conselhos e por todos esses anos de parceria.

A todos da família LIMHO e GPA, que sempre estão dispostos a ajudar, sempre prestativos e pacientes, agradeço pelas trocas, por todo aprendizado e oportunidades.

Aos colegas e professores do grupo IMUNOFAR, muito obrigada pela ajuda em diversos momentos e pelo convívio durante a realização deste trabalho. Às queridas Gil, Frank, Ilma e Rose por possibilitarem um ambiente de trabalho adequado e por sempre serem tão solícitas a nos ajudar.

Aos meus companheiros de bancada, Thai, Fran, Simone, Victor e recentemente Clarinha e Bruno, por serem meus parceiros, sempre tão prestativos e disponíveis. Obrigada pelos bons papos no fluxo e horas de trabalho, que se tornaram mais leves com vocês. Um agradecimento especial aos meus queridos Clarinha e Bruno, por toda a ajuda e parceria nessa fase final. Aos amigos que fiz ao longo dessa jornada, Brenda, Camila, Fran, Rafa, Thai e Taynara obrigada por todo companheirismo, carinho e apoio nos momentos difíceis.

À minha família, em especial, por todo suporte e por todas as oportunidades que me deram para chegar até aqui. Obrigada por sempre me incentivarem a buscar novos desafios.

E por fim gostaria de agradecer ao INCT, CAPES, CNPQ e FAPEMIG pelo suporte financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

## RESUMO

O vírus Chikungunya (CHIKV), um arbovírus da família *Togaviridae*, é o agente etiológico da febre Chikungunya (FC), uma doença cuja principal característica em humanos é a dor persistente nas articulações. Os mecanismos e mediadores envolvidos na gênese e persistência da dor durante a doença causada pelo vírus ainda são pouco conhecidos. O objetivo do presente estudo foi explorar mecanismos potencialmente envolvidos na gênese e manutenção da dor persistente causada pela infecção pelo CHIKV utilizando um modelo murino que mimetiza muitos aspectos da doença em humanos. Após infecção, foi observado hipernocicepção articular que se estendeu por até 21 dias, associado a edema do coxim plantar nos tempos iniciais pós infecção. A imunofenotipagem do coxim plantar dos animais infectados revelou aumento de neutrófilos no primeiro dia pós-infecção que foi substituído por macrófagos no sétimo dia. Ainda, presença de RNA viral, mas não de vírus viável, foi observada no gânglio da raiz dorsal (DRG) no primeiro dia pós-infecção. No entanto, a injeção intratecal do CHIKV não foi capaz de potencializar a hipernocicepção, e o tratamento com o antiviral sofosbuvir, seja por via intratecal ou sistêmica, reduziu apenas parcialmente, e de maneira similar, a dor aguda (3dpi), mas não a dor tardia (7dpi em diante) induzida pela infecção. Aumentado número de leucócitos no DRG, incluindo monócitos inflamatórios, foi associado aos elevados níveis de citocinas inflamatórias incluindo CCL2, TNF e CXCL1, bem como da enzima COX-2, em tempos iniciais e tardios pós-infecção. A administração de celecoxibe, um inibidor de COX-2, foi capaz de diminuir a dor e o edema plantar, sem induzir por sua vez, alterações significativas nos títulos virais nos diversos tecidos avaliados. Animais CCR2<sup>-/-</sup> ou tratados com antagonista de CCR2, apresentaram diminuição na hipernocicepção indicando um papel importante no início e manutenção da dor. De forma geral este trabalho explora alguns mecanismos que poderiam estar associados a dor persistente observada na infecção pelo CHIKV, com dados que podem acrescentar a literatura existente de forma a contribuir para o entendimento da patogênese associada ao CHIKV e conseqüentemente propor novas oportunidades terapêuticas para o tratamento da dor nessa importante doença humana.

Palavras-Chave: *Chikungunya virus*; arbovirus; inflamação; dor.



## ABSTRACT

Chikungunya virus (CHIKV), an arbovirus of the *Togaviridae* family, is the etiologic agent of Chikungunya fever (CF). CF is a disease with persistent joint pain as its main characteristic in humans. The mechanisms and mediators involved in the genesis and persistence of pain during this disease are still poorly understood. The aim of the present study was to explore mechanisms potentially involved in the genesis and maintenance of persistent pain caused by CHIKV infection using a murine model that mimics many aspects of the disease in humans. Following infection, joint hypernociception was observed extending up to 21 days, and was associated with plantar pad edema in the early post-infection times. Immunophenotyping of the plantar pad of infected animals revealed an increase in neutrophils on the first day post-infection that was replaced by macrophages on the seventh day. Also, the presence of viral RNA, but not viable virus, was observed in the dorsal root ganglion (DRG) on the first day post-infection. However, intrathecal injection of CHIKV was not able to potentiate hypernociception, and treatment with the antiviral sofosbuvir, either intrathecally or systemically, only partially and similarly reduced acute pain (3dpi), but not late pain (7dpi onward) induced by infection. Increased numbers of leukocytes in the DRG, including inflammatory monocytes, were associated with elevated levels of inflammatory cytokines including CCL2, TNF, and CXCL1, as well as the enzyme COX-2, at early and late post-infection times. Administration of celecoxib, a COX-2 inhibitor, was able to decrease pain and plantar edema, without inducing, in turn, significant changes in viral titers in the various tissues evaluated. CCR2<sup>-/-</sup> or CCR2 antagonist treated animals showed a decrease in hypernociception indicating an important role in pain initiation and maintenance. Overall, this work explores some mechanisms that could be associated with persistent pain observed in CHIKV infection, with data that may add to the existing literature in order to contribute to the understanding of the pathogenesis associated with CHIKV and consequently propose new therapeutic opportunities for the treatment of pain in this important human disease.

Keywords: *Chikungunya virus*; arboviruses; inflammation; pain.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Países onde casos de chikungunya foram reportados, até outubro de 2020. ....	19
Figura 2: Representação esquemática da estrutura conformacional e genômica do CHIKV. ....	20
Figura 3: Ciclo de multiplicação do vírus Chikungunya. ....	22
Figura 4: Lesões articulares de paciente infectada com CHIKV.....	23
Figura 5: Disseminação do vírus Chikungunya no hospedeiro.....	25
Figura 6: Mediadores imunes que induzem sensibilização periférica via receptores nos neurônios nociceptores.....	30
Figura 7: Esquema representativo dos experimentos <i>in vivo</i> . ....	37
Figura 8: Esquema representativo dos experimentos <i>in vivo</i> – Tratamento com Sofosbuvir. ....	40
Figura 9: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no coxim plantar. ...	46
Figura 10: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no linfonodo poplíteo. 47	47
Figura 11: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no DRG - I. ....	47
Figura 12: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no DRG - II. ....	48
Figura 13: A infecção subcutânea pelo CHIKV em camundongos induz hipernocicepção mecânica e edema plantar. ....	50
Figura 14: Caracterização do perfil celular local (coxim plantar) após a infecção pelo CHIKV.....	51
Figura 15: Caracterização do perfil de leucócitos no linfonodo poplíteo drenante após a infecção pelo CHIKV.....	52
Figura 16: A infecção pelo CHIKV induz a um aumento de citocinas e quimiocinas local. ....	53
Figura 17: A infecção pelo CHIKV induz um aumento de CCL2 no plasma, sem alteração nos níveis das citocinas IL-1 $\beta$ ou TNF.....	54
Figura 18: Recuperação de RNA viral no DRG com 1 dia pós infecção. ....	56
Figura 19: A infecção por via intratecal pelo CHIKV induz hipernocicepção mecânica em menor magnitude se comparado à infecção subcutânea.....	57
Figura 20: Tratamento com antiviral por via sistêmica ou intratecal reverte parcialmente a hipernocicepção induzida pelo CHIKV no 3dpi.. ....	58
Figura 21: Perfil de Leucócitos no DRG de camundongos infectados pelo CHIKV. 60	60

Figura 22: Perfil de macrófagos no DRG após infecção por CHIKV. ....	61
Figura 23: Após infecção por CHIKV é observado aumento das citocinas inflamatórias CCL2, CXCL-1 e TNF além da enzima COX-2 e no DRG. ....	62
Figura 24: A hipernocicepção é parcialmente reduzida após o tratamento com um inibidor específico de COX-2.....	63
Figura 25: O tratamento intratecal com o celecoxibe diminui parcialmente a hipernocicepção induzida pelo CHIKV. ....	65
Figura 26: A deleção genética ou inibição farmacológica de CCR2 está associada a redução da hipernocicepção causada pelo CHIKV. ....	66
Figura 27: A deleção genética de CCR2 causa alteração nas concentrações de MPO, CXCL-1 e CCL5. ....	67
Figura 28: Na ausência de CCR2 é observado dano tecidual persistente no coxim plantar dos animais infectados pelo CHIKV. ....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências de primers utilizados.....	43
Tabela 2: O bloqueio farmacológico de COX-2 induz aumento de título viral no sangue sem alteração para os demais tecidos avaliados. ....	64
Tabela 3: A deleção genética de CCR2 induz aumento de vírus com 1 e 7 dias pós infecção. ....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. Aegypti</i>	<i>Aedes Aegypti</i>
<i>A. Albopictus</i>	<i>Aedes Albopictus</i>
C	Proteína do capsídeo
CCL	Quimiocina CC Ligante
CCR	Receptor de quimiocina de motivo C-C
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CF	<i>Chikungunya fever</i> – Febre Chikungunya
CHIKV	<i>Chikungunya virus</i>
CLEC4M	<i>C-type lectin domain family 4 member M</i>
CXCL	Quimiocina CXC Ligante
DAG	Diacylglicerol
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing-Non-integrin</i>
DENV	<i>Dengue virus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1-E3	Glicoproteínas estruturais 1, 2 e 3
ECSA	<i>East/Central/South African genotype</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic Acid</i> – Ácido etilenodiamino tetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPM	Erro Padrão da Média
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico

GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> - Fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos
GPCR	Receptores de membrana acoplados a proteína G
H&E	Hematoxilina & Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTAB	<i>Hexadecyltrimethylammonium Bromide</i> – Brometo de hexadeciltrimetilamônio
Ig	Imunoglobulinas
IP3	Inositol trifosfato
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IOL	<i>Indian Ocean Lineage</i>
LNP	Linfonodo poplíteo
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> – Fator de inibição de migração de macrófago
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetilglicosaminidase
NI	Não infectados
NK	<i>Natural Killer</i>
nsP1-nsP4	Proteínas não- estruturais 1, 2, 3 e 4
OD	Densidade ótica
OPD	<i>O-Phenylenediamine Dihydrochloride</i> – Orto-fenilenodiamina
OPG	Osteoprotegerina
p.i.	Pós-infecção
PI3K $\gamma$	Fosfatidilinositol-3-quinase gama
PKC	Proteína cinase C

PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PFU	Unidade formadora de placa
PLC $\beta$	Fosfolipase C $\beta$
PMN	Polimorfonuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RRV	<i>Ross River Virus</i>
SFB	<i>Serum Fetal Bovine</i> – Soro fetal bovino
TBEV	<i>Tick-borne Encephalitis Virus</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WNV	<i>West Nile Virus</i>
WT	<i>Wild Type</i> – Animais selvagens
ZIKV	<i>Zika virus</i>
6K	Proteína estrutural 6K

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1.1. Epidemiologia e transmissão do vírus chikungunya.....	18
1.2. Estrutura e organização da partícula viral.....	20
1.3. A doença causada pelo vírus chikungunya.....	22
1.4. Imunopatogênese associada a infecção pelo chikungunya vírus.....	24
1.5. Sistema nervoso periférico e interação neuroimune.....	27
1.6. Dor associada a infecção por vírus artritogênicos.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVO.....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.1.1. Objetivos específicos.....	36
4. METODOLOGIA.....	37
4.1. Estratégia experimental.....	37
4.2. Animais.....	38
4.3. Vírus.....	38
4.4. Cirurgia e injeção intratecal.....	38
4.5. Tratamentos.....	39
4.5.1. Sofosbuvir.....	39
4.5.2. Celecoxibe.....	40
4.5.3. Antagonista de CCR2.....	40
4.6. Propagação e concentração do vírus.....	41
4.7. Determinação da carga viral.....	41
4.1. Análise por RT-PCR.....	42
4.2. Medida da hipernocicepção articular inflamatória.....	43
4.3. Medida do edema plantar.....	44
4.4. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas.....	44
4.5. Avaliação do perfil de receptores e tipos celulares.....	45
4.6. Detecção indireta de neutrófilos (MPO).....	48
4.7. Análise histopatológica.....	49



4.8. Análise estatística .....	49
5. RESULTADOS .....	50
5.1. A infecção pelo CHIKV induz alteração de parâmetros clínicos e inflamatórios.....	50
5.1.1. A infecção pelo CHIKV induz hipernocicepção e edema de pata em camundongos C57BL/6.....	50
5.1.2. A infecção por CHIKV induz aumento de leucócitos na pata e linfonodo	51
5.1.3. A infecção por CHIKV induz aumento de citocinas na pata e sangue.	53
5.2. A presença de vírus no DRG não parece ser um fator determinante para a manutenção da hipernocicepção .....	55
5.3. A resposta imunoinflamatória no DRG é determinante para a gênese e manutenção da hipernocicepção após infecção pelo CHIKV.....	59
5.3.1. Após infecção pelo chikv é observado um aumento e persistência de leucócitos no DRG .....	59
5.3.2. A enzima COX-2 tem um importante impacto na gênese da hipernocicepção induzida por CHIKV.....	62
5.3.3. O receptor CCR2 tem um importante impacto na hipernocicepção induzida por CHIKV.....	65
6. DISCUSSÃO .....	70
REFERÊNCIAS.....	77

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. Epidemiologia e transmissão do vírus chikungunya

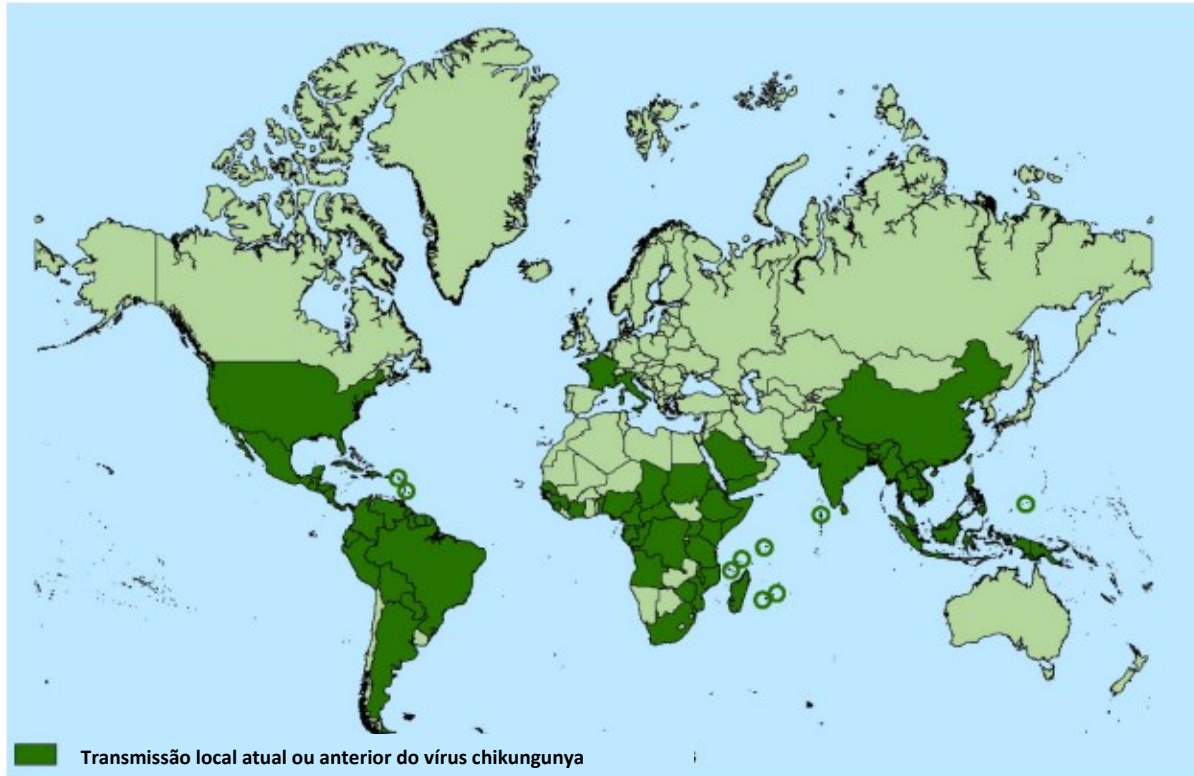
O primeiro relato do vírus Chikungunya (CHIKV) data de 1952, na Tanzânia, onde ocorreu um surto de uma doença com sintomas que incluíam febre alta e poliartralgia altamente debilitante. A população local nomeou a doença de “chikungunya”, palavra de origem do dialeto Africano Makonde, cujo significado é derivado da expressão “aquele que se curva” e se refere à postura inclinada de indivíduos acometidos pela doença (Burt et al., 2017). Este surto foi seguido por novas epidemias ainda no território africano, bem como em vários países no mundo. Em 2004, um surto no Kenya resultou em quase meio milhão de casos da doença e na disseminação do vírus para regiões próximas, como as ilhas de Comoros e La Reunion em 2005 (Renault et al., 2007). Um dos maiores relatos da doença ocorreu na Índia, em 2005, onde 1,4 milhões de pessoas foram infectadas (Burt et al., 2017). Em 2013, foram confirmados os primeiros casos da infecção pelo CHIKV nas Américas, na ilha de St. Martin, seguido por casos no Caribe e na América Latina no ano de 2015. Até 2020 o vírus foi reportado em 42 países, incluindo territórios no Caribe, América Central e América do Norte (Wahid et al., 2017) (Figura 1).

No Brasil, o primeiro caso autóctone de infecção pelo CHIKV foi descrito em 2014 no Amapá. Desde então o CHIKV se expandiu pelo território nacional. Em 2015 foram confirmados 13.236 casos da doença, a maioria ocorrendo na região nordeste, incluindo estados como Pernambuco, Bahia, Alagoas, Ceará e Maranhão (Ministério da Saúde, 2015). Segundo o Ministério da Saúde, em 2016 foram registrados 271.824 casos prováveis de CHIKF no Brasil, sendo que 151.318 foram confirmados, e destes casos 196 resultaram em óbito. Em 2017 foram registrados mais de 185 mil casos prováveis e até dezembro de 2018 foram registrados 84.294 casos prováveis, sendo que mais de 76% foram confirmados (Ministério da Saúde, 2018). Ainda em 2019 foram notificados 132.205 casos prováveis (taxa de incidência de 62,9 casos por 100 mil habitantes) no país (Ministério da Saúde, 2019). Dados recentes, de janeiro a

dezembro de 2022, mostram um aumento de 30,8% em número de casos registrados, quando comparado ao ano de 2019, e um aumento de 78% quando comparado com o ano de 2021 (Ministério da Saúde, 2022).

**Figura 1: Países onde casos de chikungunya foram reportados, até outubro de 2020.**

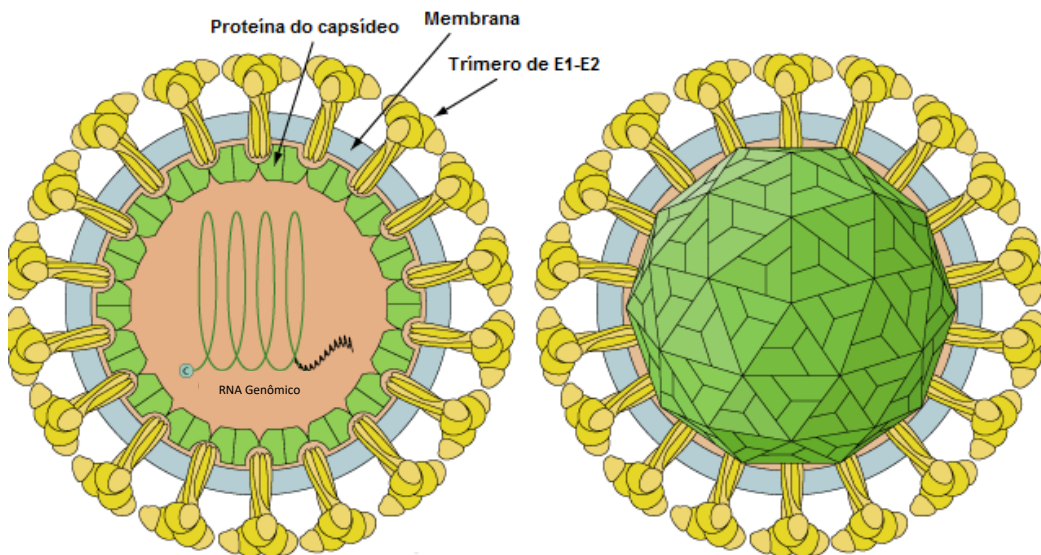
Fonte: Adaptado de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).



A transmissão do vírus chikungunya é causada pela picada da fêmea de um mosquito infectado, principalmente os mosquitos do gênero *Aedes* (Zeller et al., 2016), através de dois ciclos distintos, o silvático e urbano. Durante o ciclo enzoótico ou silvático, comum principalmente na África em áreas de florestas ou savanas, o vírus é transmitido por várias espécies do *Aedes* (*A. africanus*, *A. cordellieri*, *A. furcicdfer-taylori*, *A. luteocephalus*, entre outros) a primatas não humanos (macacos), os quais se apresentam como reservatório primário do vírus (Ng, 2017). Ao adentrar em ambientes selvagens, o homem pode ser infectado dando início ao ciclo urbano. A transmissão do vírus em ambientes urbanos envolve duas espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, o *A. aegypti* e o *A. albopictus*, que quando infectados podem transmitir o vírus ao homem (Zeller et al., 2016).

## 1.2. Estrutura e organização da partícula viral

O *Chikungunya virus* é um arbovirus do gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae* do reino *Riboviria*. O vírion, envelopado e com estrutura icosaédrica, apresenta cerca de 70nm de diâmetro e é composto por unidades repetidas de glicoproteínas transmembrana (E1 e E2), a proteína do capsídeo e uma bicamada lipídica. O genoma é de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com polaridade positiva, com aproximadamente 12 Kb e duas janelas abertas de leitura, que codificam duas poliproteínas, que quando clivadas dão origem a quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) (Burt et al., 2017; Hakim & Aman, 2022). A figura abaixo (Figura 2) mostra uma representação esquemática da estrutura da partícula viral.



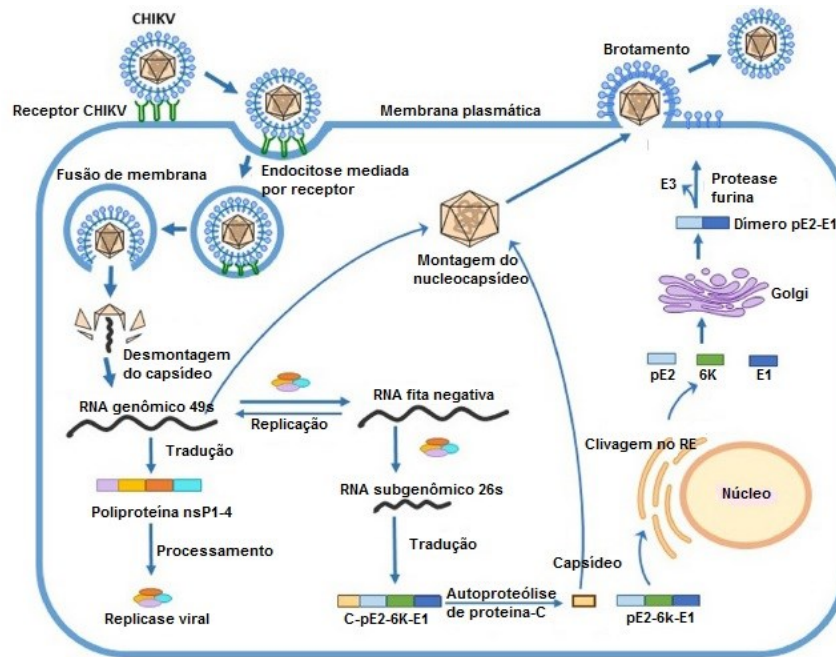
**Figura 2: Representação esquemática da estrutura conformacional e genômica do CHIKV.**

Estrutura icosaédrica do vírion, a qual é composta por três proteínas estruturais, sendo elas as proteínas do envelope (E1 e E2) e a proteína do capsídeo (C). As proteínas E1 e E2 formam tríades de glicoproteínas, em forma de espigas, ancoradas a membrana que cobrem a superfície viral.

Fonte: Adaptado de Swiss Institute of Bioinformatics, viralZone, 2017.

O ciclo de multiplicação do CHIKV (Figura 3) tem início após sua inoculação intradérmica pela picada da fêmea do mosquito vetor e sua adsorção na célula alvo

pelo processo de endocitose mediada por receptor. Os receptores envolvidos na internalização do vírus incluem: O CD209 ou DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), o CLEC4M (C-type lectin domain family 4 member M), a laminina e algumas integrinas (Hakim & Aman, 2022; Hoornweg et al., 2016) além da molécula de adesão celular Mxra8 que foi descrita recentemente como um mediador de entrada para vários alfavírus artritogênicos (Zhang et al., 2018). Após a endocitose, a proteína do envelope viral sofre modificações conformacionais, devido ao ambiente ácido do endossoma, permitindo a liberação do genoma viral no citoplasma da célula. Em sequência, dois precursores de proteínas não estruturais (nsPs) são traduzidos a partir do RNA mensageiro (mRNA) viral e a clivagem destes precursores resulta nas proteínas não estruturais (nsP1-nsP4). As funções destas proteínas incluem: (1) nsP1 participa na síntese da fita negativa do RNA viral; (2) nsP2 exibe atividades de RNA helicase, RNA trifosfatase e proteinase e está envolvida no desligamento da transcrição na célula hospedeira; (3) nsP3 faz parte da unidade replicase e (4) nsP4 é a RNA polimerase viral. Juntas estas proteínas formam o complexo de multiplicação viral, que sintetiza um intermediário de RNA de cadeia negativa. Este RNA de cadeia negativa serve como modelo para a síntese de RNA subgenômicos (26S) e genômicos (49S). O RNA subgenômico desempenha um importante papel na expressão do precursor da poliproteína C-pE2-6K-E1. Após formação da poliproteína, ocorre a liberação do capsídeo (C) e as glicoproteínas pE2 e E1 são formadas e exportadas para a membrana plasmática, onde a pE2 é clivada em E2 e E3, estas proteínas estão envolvidas na ligação ao receptor e dobramento adequado de pE2, respectivamente. A montagem do vírion acontece pela ligação do nucleocapsídeo viral ao RNA viral e associação às glicoproteínas de envelope associadas à membrana (Hakim & Aman, 2022). Novas partículas virais então, deixam a célula através do processo de brotamento pela membrana celular onde os vírions adquirem o envelope de bicamada lipídica contendo as glicoproteínas E1 e E2 (Solignat et al., 2009).



**Figura 3: Ciclo de multiplicação do vírus Chikungunya.**

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

Fonte: Adaptado de Abdelnabi et al., 2015.

### 1.3. A doença causada pelo vírus chikungunya

A doença causada pelo CHIKV em humanos, Febre Chikungunya (FC), é uma doença febril exantemática aguda com sinais e sintomas similares aos relatados para outras arboviroses de importância médica, a exemplo da dengue, zika e a febre amarela. Os principais sintomas observados envolvem febre alta de início agudo, dores articulares e musculares, cefaleia, náusea, fadiga e exantema generalizado, sendo que a principal manifestação clínica que a difere das outras arboviroses são dores fortes e persistentes nas articulações, as quais estão associadas a uma elevada taxa de morbidade tendo como consequência a redução da produtividade e da qualidade de vida dos indivíduos acometidos (Hakim & Aman, 2022). A infecção por

CHIKV é sintomática na maioria das pessoas infectadas, sendo que as taxas de assintomáticos podem ir de 3 a 30%, variando entre os diferentes surtos epidêmicos descritos, podendo produzir um espectro variável de manifestações clínicas, incluindo formas mais leves e condições graves e incapacitantes (Cunha & Trinta, 2017). O período de incubação pode variar de 1 a 12 dias com média de 2 a 7 dias e fases aguda, subaguda e crônica, podem ser observadas na doença associada ao vírus.

A fase aguda tem início logo após o período de incubação e tem duração de até quatorze dias (Burt et al., 2017). Febre alta ( $>39^{\circ}\text{C}$ ), calafrios, cefaleia, náusea, vômito, fadiga, erupções cutâneas eritematosas e maculopapulares, dor nas costas, mialgia e poliartralgia simétrica com inchaço e dor nas pequenas articulações das mãos e pés, conforme demonstrado na figura 4, são sintomas que podem ser apresentados na fase aguda (Figura 4), sendo que a intensidade e duração da doença estão associadas à carga viral e presença de linfocitopenia. Durante a viremia, a quantidade de vírus pode chegar a  $10^9$  cópias do genoma viral por mL de sangue e o fim da viremia normalmente ocorre de 5 a 7 dias após o início dos sintomas. Após o início da febre, podem ocorrer mialgias e artralguas intensas. Esses sintomas podem ser graves e incapacitantes, causando morbidade. A poliartralgia, que tem sido descrita em mais de 90% dos pacientes com chikungunya na fase aguda, é um sintoma chave para o diagnóstico diferencial com um valor preditivo positivo superior a 80% (Ministério da saúde, 2017).



**Figura 4: Lesões articulares de paciente infectada com CHIKV.**

Lesões articulares com edema de paciente com chikungunya, evolução da mesma paciente nos dias A) 1 e B) 5 pós infecção.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2021.



Após a fase aguda, cerca de 30% das pessoas evoluem com dores articulares persistentes com duração de até três meses, fase subaguda (Burt et al., 2017). Após o terceiro mês, se não ocorre remissão dos sintomas, é considerado uma fase crônica, sendo que esta pode prolongar-se por alguns meses a vários anos (Burt et al., 2017).

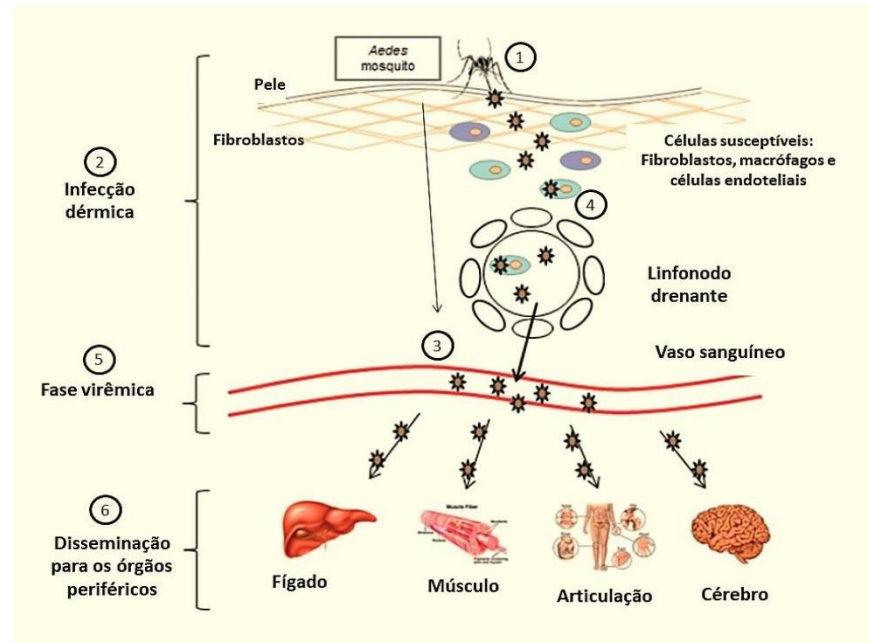
Sintomas considerados atípicos podem ocorrer em cerca de 0,3% dos casos, envolvendo sintomas associados a complicações dos sistemas cardiovascular, renal, respiratório, gastrointestinal, hepático e adrenal, além de complicações associadas ao sistema nervoso central. Um estudo epidemiológico na Ilha da La Reunion durante os anos de 2005 a 2006 mostrou que dentro dos casos atípicos, cerca de 24,1% dos adultos apresentaram neurologia anormal, com uma estimativa de que aproximadamente 0,1% das infecções por CHIKV desenvolveram doença neurológica. Foi observado que as complicações graves do CHIKV geralmente surgem em pacientes com comorbidades e pessoas acima de 65 anos. Atualmente não há tratamento antiviral eficaz e, portanto, o tratamento de CHIK é de suporte e sintomático sendo utilizado principalmente para controle da febre e dor (Vairo et al., 2019).

#### 1.4. Imunopatogênese associada a infecção pelo chikungunya vírus

Após a inoculação, o vírus realiza um ciclo de multiplicação inicial no interior dos fibroblastos dérmicos e então se dissemina pela corrente sanguínea, atingindo diversos tecidos, como o fígado, músculos, articulações, baço e cérebro (Figura 5) (Cunha & Trinta, 2017; Rohatgi et al., 2014). Diversos tipos celulares apresentam susceptibilidade à infecção pelo CHIKV incluindo: fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e células progenitoras do músculo esquelético ou células satélites, assim como neurônios e células da glia. Fibroblastos e macrófagos da pele foram identificados como sendo células alvo primárias da infecção pelo CHIKV durante a fase de inoculação intradérmica (Sourisseau et al., 2007). A fase de inoculação intradérmica é seguida pela fase de multiplicação linfática, nesta fase ocorrem migração de células infectadas para os gânglios linfáticos drenantes e disseminação na corrente sanguínea (fase de viremia), com posterior disseminação para órgãos de



infecção secundária, envolvendo tipos celulares como os hepatócitos, as células musculares esqueléticas e as células articulares (Hussain et al., 2016; Schwameis et al., 2016).



**Figura 5: Disseminação do vírus Chikungunya no hospedeiro.**

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

Fonte: Adaptado de Caglioti et al., 2013.

A viremia que ocorre na fase aguda da doença é acompanhada pelos níveis elevados de diversos mediadores inflamatórios no soro dos pacientes a exemplo das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e o Fator de Necrose Tumoral (TNF). Essas citocinas pirogênicas contribuem para a febre presente na fase aguda da doença (Hoarau et al., 2010). Apesar de estes mediadores estarem presente em grande parte das pessoas sintomáticas, estudos demonstraram que diferentes coortes de pacientes exibem padrões de mediadores inflamatórios distintos, sugerindo que os níveis basais desses mediadores diferem entre as populações. Utilizando diferentes coortes de pacientes uma metanálise comparativa demonstrou que as citocinas pró- inflamatórias, incluindo IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ; citocinas anti-inflamatórias tais como o IL-1RA, a IL-4 e a IL-10; as quimiocinas CXCL10, CCL2,

CXCL9, CCL3, CCL4; os fatores de crescimento fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e o Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (FGF) seriam uma possível assinatura da infecção pelo CHIKV (Ng, 2017; Teng et al., 2015). Outras alterações que podem ser detectadas incluem elevação das enzimas hepáticas ALT e AST (Ministério da Saúde, 2017).

A diminuição de carga viral durante a fase aguda é acompanhada pela diminuição da resposta inflamatória por meio de mecanismos reguladores. No entanto, níveis aumentados de diversos mediadores inflamatórios, a exemplo de IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, CCL2 e MMP-2, ainda podem ser detectados até 18 meses após a infecção na articulação de pacientes que desenvolveram sintomatologia persistente, o que sugere uma associação entre uma ativação sustentada da resposta imune e o estabelecimento de manifestações clínicas persistentes (Dupuis-Maguiraga et al., 2012). Chow e colaboradores (Chow et al., 2011) estudaram o perfil de mediadores inflamatórios durante diferentes fases da doença (aguda, de recuperação e crônica) e mostraram que durante a fase de recuperação no início, ocorre produção de citocinas e quimiocinas, como por exemplo IL-4, CCL11, CXCL9, CCL3, HGF, bFGF e G-CSF. Enquanto para a fase de recuperação tardia foi observado principalmente a secreção do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e da quimiocina CCL5. Pacientes que se recuperaram completamente da infecção pelo CHIKV apresentaram níveis elevados de CCL11 (quimiocina que pode bloquear a atividade de CCL2) e HGF (responsável por suprimir a produção de CCL2) durante a fase de recuperação. Uma vez que os pacientes recuperados apresentam baixos níveis de CCL2 durante a fase de recuperação, sugere-se que a inibição da atividade dos macrófagos está associada à remissão da doença. Essa hipótese foi reforçada por um estudo que demonstrou que a inibição do influxo de macrófagos nas articulações de camundongos infectados pelo CHIKV protegeu os animais do desenvolvimento da doença grave (Chen et al., 2015). Estes dados foram corroborados por pesquisas clínicas que demonstraram que pacientes com sintomas persistentes continham baixos níveis de CCL11 e HGF, enquanto apresentavam altos níveis de GM-CSF (associado à ativação de macrófagos) na fase de recuperação (Dupuis-Maguiraga et al., 2012).

Os macrófagos, no contexto da FC podem desempenhar um papel dual no desenvolvimento da doença. São células essenciais para o controle da carga viral e

resolução da inflamação em tempos tardios, porém tem sido associadas ao desenvolvimento da fase crônica da doença. O receptor de quimiocinas CC tipo 2 (CCR2) e seus ligantes, as quimiocinas CCL2 e CCL7 estão intimamente associados ao recrutamento e função de monócitos. O receptor CCR2 é majoritariamente expresso em monócitos e macrófagos enquanto quimiocinas como CCL2 podem ser liberadas por uma grande variedade de células, em resposta a estímulos. A quimiocina CCL2, assim como seu receptor (CCR2), está expressa em quantidades elevadas em casos de artrite causada por Chikungunya e alguns trabalhos indicam que podem estar relacionados ao desenvolvimento da forma crônica da doença. Em modelos onde foi feita a inibição da CCL2 utilizando o fármaco Bindarit em camundongos infectados com o Alphavirus Ross River (RRV) ou CHIKV, houve melhora significativa do quadro da doença, com diminuição de danos nos tecidos e menor recrutamento de células inflamatórias no sítio da lesão (Chen et al., 2015; Rulli et al., 2011). No entanto, em estudos para caracterizar o papel do CCR2 na artrite induzida por CHIKV, a ausência do receptor CCR2 causou uma artrite mais grave, prolongada e erosiva em camundongos CCR2<sup>-/-</sup>, com substituição do infiltrado de monócitos/macrófagos, observado em camundongos selvagens (WT), por infiltrado de neutrófilos. Estes dados foram associados a baixos níveis de IL-10 em animais CCR2<sup>-/-</sup>, sugerindo baixa atividade de macrófagos M2 (Poo, Rudd, et al., 2014), indicando que o receptor pode estar relacionado ao desenvolvimento de artrite, mas também desempenha papel importante na resolução da inflamação.

#### 1.5. Sistema nervoso periférico e interação neuroimune

A dor é definida como um dos quatro sinais cardinais da inflamação. Evolutivamente, a dor aguda desempenha um papel importante uma vez que permite a preservação do tecido frente a um estímulo nocivo (Pinho-Ribeiro et al., 2017). O estímulo nervoso que resulta em uma sensação dolorosa, tem início quando nociceptores, neurônios somatossensitivos, são estimulados. Os nociceptores são encontrados na pele, córnea, ossos, músculos, articulações, trato geniturinário e tecidos viscerais profundos e sua ativação ocorre através da detecção de estímulos por sensores, que podem incluir canais iônicos ou receptores acoplados a proteína G.

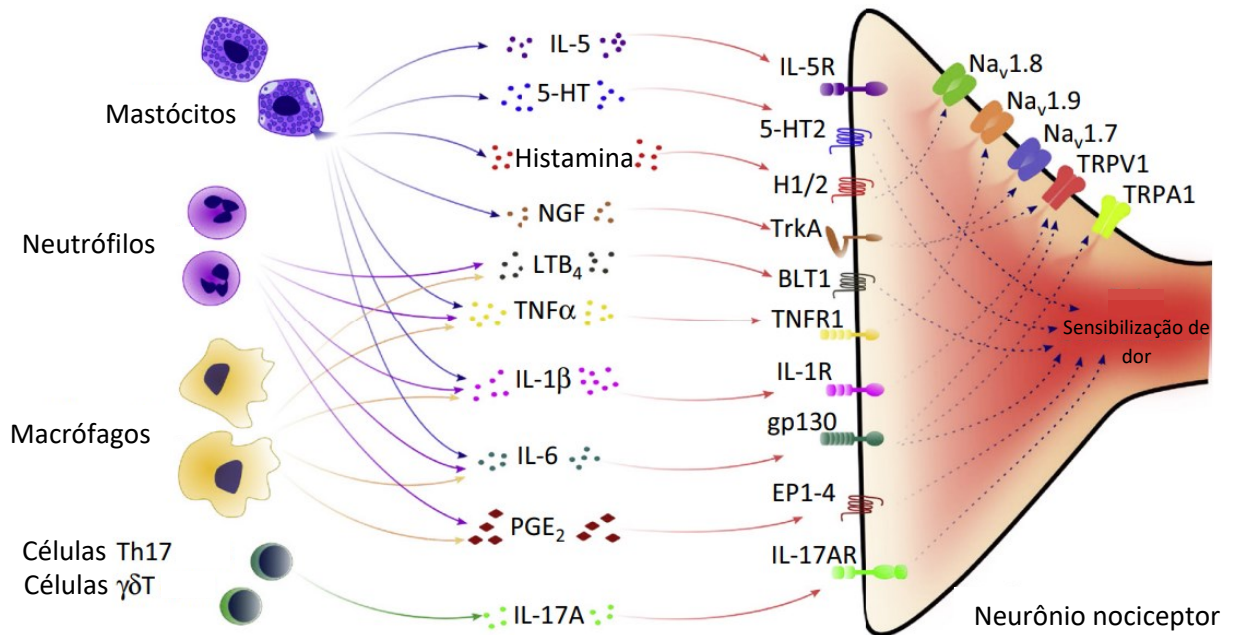
Os estímulos normalmente são estímulos inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, alterações de temperaturas (calor ou frio) ou lesão mecânica. Ao sentir esses estímulos, potenciais de ação são gerados nos terminais nociceptores que são transduzidos para o corno dorsal da medula espinhal e retransmitidos para o cérebro para serem processados e percebidos como dor. O sistema nervoso, responsivo a estímulos de dor, é dividido anatomicamente em Sistema Nervoso Central (encéfalo e medula espinhal) e Sistema Nervoso Periférico (nervos e gânglios nervosos que conectam o sistema nervoso central aos órgãos do corpo). A condução do estímulo nocivo a partir do sistema nervoso periférico (SNP) até o sistema nervoso central (SNC) começa com a estimulação periférica, passando pelos gânglios da raiz dorsal (DRG) e chegando à medula espinhal, por onde tem acesso aos centros superiores de processamento (Baral et al., 2019).

O Sistema Nervoso Periférico (SNP) é constituído de nervos, gânglios e terminações nervosas e sua função é facilitar a comunicação entre o SNC e a periferia (órgãos internos e externos, como trato gastrointestinal, pele, coração, órgãos secretores e músculos). O SNP é funcionalmente dividido em sistema nervoso autônomo (SNA) e sistema nervoso somático (SNS), que podem ser subdivididos em simpático e parassimpático para o SNA, e sensoriais e motoras para o SNS. Enquanto o SNA é responsável por funções involuntárias associadas a células cardíacas, lisas e glandulares, o SNS é responsável por controle de músculo esquelético e processamento de sensações somáticas, incluindo a dor. Terminais nervosos periféricos nociceptores possuem receptores e canais iônicos que detectam mediadores moleculares liberados durante um estímulo doloroso (Figura 6), após a ativação por esses mediadores, potenciais de ação são transduzidos para corpos celulares nociceptores dentro dos gânglios da raiz dorsal (DRG) e retransmitidos para a medula espinhal e o cérebro para serem processados como dor (Pinho-Ribeiro et al., 2017). Os DRG são estruturas importantes na transdução e modulação sensorial, incluindo a transmissão da dor. O DRG pode ser considerado um alargamento da raiz dorsal contendo corpos celulares de neurônios sensoriais primários (Esposito et al., 2019). Em cada DRG podem ser encontrados cerca de 15.000 neurônios, de natureza pseudounipolar, e cerca de 8x esse número para células satélites gliais, que fornecem suporte estrutural e metabólico necessário para a função dos neurônios. As células gliais contidas no DRG criam unidades funcionais fisicamente isoladas para cada

corpo celular de neurônio sensorial presente ali. Um único axônio se projeta do corpo celular no DRG e se bifurca em uma junção em T, com uma porção central do axônio se estendendo até o SNC e a outra porção se estendendo para a periferia. Os axônios desses neurônios são agrupados em nervos que contêm nociceptores A $\beta$ , A $\delta$  e fibras C (Liu et al., 2021). As fibras A $\beta$  e A $\delta$  são mielinizadas e têm uma alta velocidade de transdução do sinal nociceptivo agudo e transmitem sinais de estímulos de temperatura, mecânico e químico. As fibras C são amielinizadas, possuem um diâmetro menor e possuem uma condução de sinal mais lenta, esses nociceptores respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. As terminações nervosas livres das fibras A $\delta$ - $\beta$  e fibras C constituem a região sensorial dos nociceptores (Krames, 2014).

Os terminais sensitivos dos nociceptores possuem diversos receptores, que são sensíveis as mais diversas moléculas, incluindo receptores para citocinas, lipídeos, proteases e fatores de crescimento (Figura 6) (Pinho-Ribeiro et al., 2017). Esses receptores quando ativados levam a sensibilização direta ou vão mediar cascatas de sinalização que levam a sensibilização neuronal via canais iônicos como TRPV1, TRPA1, Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9 (White et al., 2007; Wood et al., 2004). A Prostaglandina E2 (PGE2), uma molécula frequentemente relacionada a indução de dor inflamatória, sensibiliza os neurônios nociceptores via receptores neuronais EP1-EP4 que vão atuar nos canais de íons proximais, a PGE2 também pode levar a hiperalgesia persistente via PKA e ativação de NF-kB mediada por PKC em neurônios no DRG (Souza et al., 2015). A primeira citocina descrita com papel hiperalgésico foi a IL-1 $\beta$ , que induz a produção de prostaglandinas mas além disso sensibiliza os neurônios nociceptores via fosforilação dos canais de sódio Nav1.8, levando ao aumento da geração de potencial de ação e resultando em hiperalgesia mecânica e térmica (Binshtok et al., 2008; Ferreira et al., 1988). Além disso, IL-1 $\beta$  atua via ativação de IL-1R1 em neurônios nociceptores que levam a um aumento de expressão do TRPV1 e, conseqüentemente, aumento de sensibilidade à dor (Ebbinghaus et al., 2012). Outras citocinas como IL-6 e TNF também tem mecanismos de indução de dor bem descritos, por levar a produção de prostaglandinas ou pela ação direta nos nociceptores. A IL-6 se liga ao receptor gp130 expresso nos nociceptores e leva ao aumento de expressão de TRPV1 e TRPA1, enquanto a sensibilização via TNF é dependente do receptor TNFR1. Receptores como IL-17AR também são amplamente

expressos por neurônios nociceptores induzindo um rápido aumento da excitabilidade neuronal via IL-17, além disso a IL-5 também pode sensibilizar os neurônios nociceptores que expressam os receptores IL-5 (Figura 6) (Pinho-Ribeiro et al., 2017).



**Figura 6: Mediadores imunes que induzem sensibilização periférica via receptores nos neurônios nociceptores.**

Durante uma lesão ou estímulo inflamatório células residentes ou recrutadas vão liberar mediadores moleculares que podem agir via receptores específicos em terminais periféricos de neurônios sensoriais levando a sensibilização e dor. Citocinas, lipídios e fatores específicos vão levar a ativação direta ou a modulação de canais iônicos como Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, TRPV1 e TRPA1. Na degranulação, os mastócitos liberam Interleucina 5 (IL-5), serotonina (5-HT), histamina e fator de crescimento nervoso (NGF) que atuam sobre IL-5R, 5-HT<sub>2</sub>, receptor de histamina 2 (H2), TrkA. Os neurônios nociceptores também são sensibilizados pelo TNF, IL-1b, e IL-6 produzidos por mastócitos, macrófagos e neutrófilos. A ativação do TNFR1 leva à fosforilação dos canais Nav1.9. A ativação do receptor IL-1R1 aumenta a expressão de TRPV1 pelos nociceptores, enquanto a IL-6 liga o gp130 nos nociceptores e isto aumenta a expressão do TRPV1 e TRPA1. A PGE<sub>2</sub> liberada por macrófagos e outras células imunes inatas também sensibiliza os neurônios nociceptores através dos receptores EP1-4. As células Th17 e células  $\gamma\delta$ T também podem sensibilizar os neurônios nociceptores através da liberação de IL-17A e da sinalização neuronal de IL-17RA.

Fonte: Adaptado de Pinho-Ribeiro et al., 2017.

Além das interações neuroimunes que ocorrem no local da lesão, as células imunes também podem interagir com os corpos celulares dos neurônios nociceptores dentro dos DRGs para levar a dor. Um pequeno número de células imunes inatas e adaptativas reside nos DRGs e há evidências de que seu número aumenta em

condições de dor crônica. Em modelos de dor neuropática induzida pela ligadura do nervo ciático é demonstrado um aumento no número de macrófagos, monócitos, neutrófilos e células T no DRG (Liu et al., 2014). A presença de células inflamatórias nesse tecido, provavelmente, está relacionada a uma liberação prolongada de citocinas excitatórias e conseqüentemente uma dor prolongada, mesmo após a resolução da lesão original. As células gliais também respondem à lesão de um nervo periférico multiplicando e liberando mediadores inflamatórios. A axotomia periférica causa aumento da expressão de fatores neurotróficos nas células gliais satélites ao redor dos corpos celulares dos neurônios sensoriais no DRG, essas moléculas no DRG podem levar a uma alodinia mecânica persistente e podem causar dor neuropática após lesão do nervo periférico. A PGE<sub>2</sub> também é produzida e secretada pelas células gliais, que cercam os neurônios DRG, em resposta à fractalcina (CX3CL1), uma quimiocina liberada pelos neurônios do DRG em um estado inflamado (Milligan & Watkins, 2009).

Além disso, já foi demonstrado que o tratamento de células neuronais com quimiocinas aumenta a sensibilidade do potencial receptor transitório vaniloide 1 (TRPV1), um canal iônico que é crítico para a percepção da dor (Jiang et al., 2020). Conseqüentemente, durante a inflamação, a ativação dos receptores de quimiocinas nos neurônios contribui para a hiperalgesia ao sensibilizar o TRPV1 através das vias de sinalização mediadas pela proteína G (Jiang et al., 2020; Pinho-Ribeiro et al., 2017). Os receptores de quimiocinas são expressos por vários tipos celulares além dos leucócitos, como exemplos células endoteliais vasculares e células do sistema nervoso. A expressão dos receptores de quimiocinas já foi descrita em células microgliais, astrócitos, oligodendrócitos e neurônios, incluindo neurônios sensoriais periféricos, além de neurônios do SNC. Esses receptores participam de condições inflamatórias e neurodegenerativas do SNC, bem como do desenvolvimento do cérebro e das atividades sinápticas (Tran & Miller, 2003; White et al., 2005).

De forma geral, os principais mediadores inflamatórios descritos como participantes do processo de desenvolvimento e manutenção da dor neuropática estão as citocinas TNF, IL-1 $\beta$  e IFN. Ainda, existem evidências de que a ativação de células da glia pelos mediadores CCL2 e CCL5, quimiocinas com importante participação no processo de infecção pelo CHIKV, pode estar relacionada com o

desenvolvimento da dor neuropática (Abbadie et al., 2003; Kiguchi et al., 2010; Milligan & Watkins, 2009). Vários trabalhos demonstram uma regulação positiva dessas quimiocinas, incluindo CCL2, CCL5 e CXCL1, em modelos de doenças neuroinflamatórias ou de lesão direta do nervo periférico (Cui et al., 2020; Zhu et al., 2014). As evidências indicam uma sensibilização direta dos neurônios periféricos, uma vez que os receptores para estas quimiocinas são expressos em células neuronais (Komiya et al., 2020; Ma et al., 2020). Além disso, alguns modelos descrevem uma regulação positiva, sustentada de CCR2 no DRG de animais em modelo de lesão no nervo ciático (Abbadie et al., 2003). Curiosamente, camundongos deficientes para o receptor de quimiocina CCR2 não desenvolvem alodinia mecânica em um modelo de dor neuropática, mesmo a sensibilidade a dor permanecendo normal nestes animais na ausência do dano ao nervo (Abbadie et al., 2003), sugerindo um papel importante deste sistema. Diversos estudos recentes ainda mostram uma modulação direta de várias classes de neurônios no sistema nervoso periférico e central por quimiocinas, como a CCL2 (Ma et al., 2020; Watson et al., 2020).

De forma geral, sabe-se que a maioria dos mediadores inflamatórios conhecidos que podem de alguma forma se ligar a nociceptores no sistema nervoso periférico causa algum tipo de sensibilização e dor (Matsuda et al., 2019), sugerindo um papel cada vez maior da inflamação em comunicação com o sistema nervoso e como participando de processos dolorosos de diversos tipos.

#### 1.6. Dor associada a infecção por vírus artritogênicos

A dor articular prolongada é o principal sinal patognomônico de pacientes crônicos da doença causada pelo CHIKV, que podem ter dores articulares por meses ou anos após a fase aguda da doença (Burt et al., 2017) e mesmo 70 anos após a descrição do primeiro caso de CHIKV, a artrite persistente causada pelo vírus permanece sem uma descrição clara do seu mecanismo. Além disso, os tratamentos para dores crônicas são inespecíficos e muitas vezes ineficazes devido à complexidade desta manifestação. Os tratamentos farmacológicos convencionais usados para controlar a artrite dolorosa crônica incluem paracetamol, anti-



inflamatórios não esteróides (AINEs) orais ou tópicos, opioides e corticosteróides intra-articulares (Kidd et al., 2007). Medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs), como metotrexato ou anticorpos monoclonais anti-TNF, também são usados para tratar as dores articulares. Embora a terapia com DMARD diminua a dor por preservar os tecidos articulares, uma grande proporção de pacientes ainda relata a sensação de dor (Abbasi et al., 2019). Conseqüentemente, novas opções de tratamento farmacológico são necessárias para controlar a dor em pacientes com artrite inflamatória.

A artrite causada pelo CHIKV é descrita como similar em muitos aspectos a artrite reumatoide. Um estudo de base populacional discute que distúrbios reumáticos preexistentes podem estar associados a dor persistente causada por CHIKV (Gerardin et al., 2011), porém um estudo prospectivo realizado na ilha de La Reunion mostrou que apenas 2,8% dos pacientes com a dor crônica associada a infecção possuíam uma doença articular preexistente (Schilte et al., 2013).

Em outras doenças artríticas virais, como por exemplo causada por RRV (Soden et al., 2000), adenovírus entre outros, foram identificados a persistência de vírus, antígenos virais e/ou ácidos nucleicos virais nas articulações afetadas (Suhrbier & Mahalingam, 2009). Esses achados sugerem que artropatias virais podem estar associadas a replicação, persistência ou presença do patógeno ou do seu material genético, causando inflamação persistente e conseqüentemente as manifestações reumáticas. Para o CHIKV, em um estudo prospectivo envolvendo 9 pacientes com sintomas crônicos da doença, na Ilha de La Reunion, foi observado que apenas um paciente apresentava antígenos virais (RNA e proteínas) em macrófagos sinoviais perivasculares 18 meses após a infecção (Hoarau et al., 2010). De maneira interessante, um estudo em modelo animal, com macacos, forneceu evidências de um papel importante para macrófagos neste sentido. No estudo foi observado um alto índice de infiltração de macrófagos/células mononucleares em órgãos linfóides e presença em grandes quantidades de antígeno CHIKV e vRNA foram detectados nessas células por períodos prolongados (até 3 meses pós infecção), indicando que os macrófagos poderiam estar servindo como reservatório do vírus e assim desempenhando um papel importante no desenvolvimento de sintomas crônicos da doença (Labadie et al., 2010). Porém essa relação ainda não foi estabelecida, uma

vez que em estudos em humanos ou camundongos não foi possível isolar o vírus infeccioso de tecidos ou soro e os mecanismos pelo qual essa possível persistência do antígeno poderia acontecer também não foram esclarecidos (Poo, Rudd, et al., 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

O vírus chikungunya é considerado um importante problema de saúde pública no Brasil. O vírus induz uma doença que é associada à alta morbidade onde aproximadamente 30% dos indivíduos acometidos desenvolvem sequelas de caráter subagudo ou crônico. A artralgia persistente associada ao CHIKV desempenha um relevante impacto socioeconômico devido a redução da produtividade da população trabalhadora, queda da qualidade de vida dos indivíduos acometidos e grande impacto econômico aos órgãos públicos de saúde.

Vários estudos vêm sendo feitos na tentativa de entender a patologia associada à infecção pelo CHIKV, porém muitos aspectos associados à dor persistente ainda permanecem por serem elucidados. A gravidade da doença de forma geral eventualmente é associada a presença de vírus ou uma resposta imune exacerbada, associada principalmente à presença de macrófagos, componentes que podem ser importantes moduladores do sistema nervoso. Neste trabalho buscamos entender estes aspectos associados à infecção pelo CHIKV com um direcionamento para um componente do sistema nervoso periférico, o DRG, na tentativa de entender os mecanismos associados à dor persistente causada pelo CHIKV.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o papel do vírus e macrófagos inflamatórios na manutenção de um ambiente inflamatório no DRG e seu impacto na gênese e manutenção da hipernocicepção induzida pelo CHIKV.

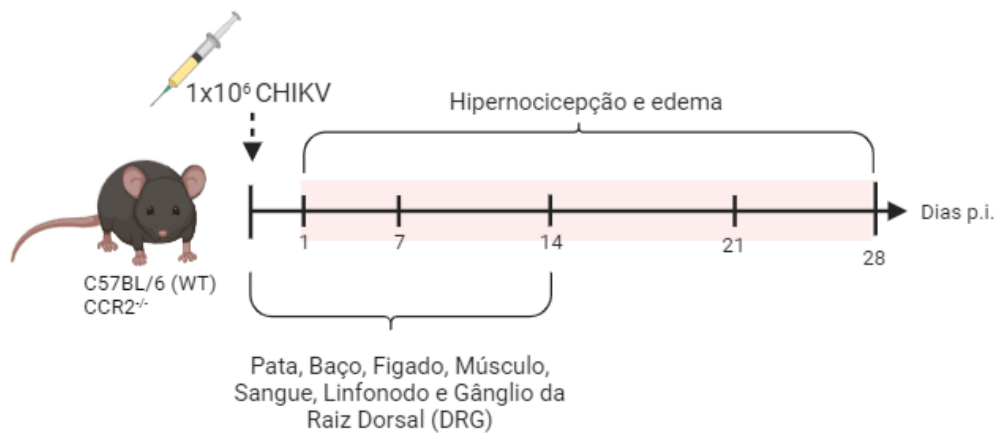
##### 3.1.1. Objetivos específicos

- 1) Avaliar parâmetros clínicos e inflamatórios na pata, linfonodo e sangue de camundongos C57BL/6 infectados pelo CHIKV;
- 2) Avaliar a presença, e impacto na hipenocicepção, de vírus ou RNA viral no DRG em camundongos C57BL/6 infectados pelo CHIKV;
- 3) Avaliar o perfil e presença de leucócitos e citocinas no DRG em tempos iniciais e tardios em camundongos C57BL/6 infectados pelo CHIKV;
- 4) Avaliar o impacto da inibição farmacológica de COX-2 na hipernocicepção em camundongos C57BL/6 infectados pelo CHIKV;
- 5) Avaliar o impacto da deleção genética ou farmacológica do receptor CCR2 na hipernocicepção e resposta inflamatória em camundongos C57BL/6 infectados pelo CHIKV.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Estratégia experimental

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 de quatro semanas, infectados por via subcutânea (intraplantar) com o inóculo de  $1 \times 10^6$  PFU de vírus diluídos em 50 $\mu$ l de PBS. Camundongos WT ou deficientes para o receptor CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>) foram infectados no tempo 0 e eutanasiados nos tempos 1, 7 ou 14 dias pós-infecção (p.i.) para coleta de amostras. Para as medidas de hipernocicepção e edema os animais foram acompanhados por 28 dias ou até o fim da hipernocicepção (Figura 7). Estes parâmetros foram definidos previamente durante a padronização do modelo de infecção pelo CHIKV (MOREIRA, T. P., et al., 2022).



**Figura 7: Esquema representativo dos experimentos *in vivo*.**

Camundongos WT ou deficientes para o receptor CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>) foram infectados por via intraplantar com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV. Os animais foram eutanasiados nos dias 1, 7 ou 14 pós-infecção (p.i.), para obtenção de amostras (pata, sangue, linfonodo e DRG) ou acompanhados até o 28º dia p.i. para medidas de edema e hipernocicepção.

#### 4.2. Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos do tipo “selvagem” (WT) da linhagem C57BL/6 com quatro semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais. Além disso, foram utilizados camundongos deficientes para o receptor de quimiocina CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>), os quais foram adquiridos do Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas, ração e água sem restrições de acordo com o protocolo de número 78/2018 aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFMG.

#### 4.3. Vírus

Neste trabalho foi utilizado uma linhagem de vírus chikungunya asiática isolada de uma amostra clínica de um paciente virêmico que foi gentilmente cedida pelo Prof. Maurício Lacerda Nogueira da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, sob número de acesso BHI3762/H 804917.

#### 4.4. Cirurgia e injeção intratecal

Com os animais anestesiados foi feita uma perfusão utilizando BPS. Para a perfusão foi feita uma abertura no abdômen do animal para exposição do fígado e caixa torácica, que deve ser aberta para exposição do coração. Uma agulha, presa a ponta da bomba de perfusão, foi inserida na câmara ventricular esquerda do animal e no átrio direito foi feito um corte. O sangue deve sair pelo átrio direito e o fígado é utilizado como um controle, à medida que ele vai perdendo lentamente sua tonalidade

avermelhada. Após 5 minutos de uma perfusão bem sucedida, o aparelho de perfusão foi retirado, a pele do animal removida na parte dorsal.

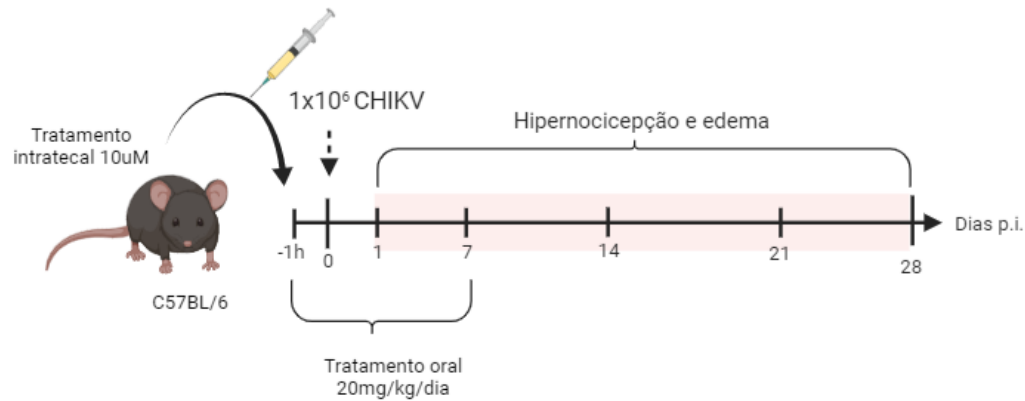
Para a cirurgia, os músculos das coxas são retirados cuidadosamente para expor o nervo ciático. Uma vez exposto, as ramificações em direção a medula espinhal são cuidadosamente expostas. Músculos e tecido mole são retirados do entorno da coluna vertebral e uma vez que a coluna está exposta é feita uma remoção do arco vertebral (laminectomia) do segmento lombar para expor a medula espinhal e os DRGs. Neste ponto as ramificações do ciático são importantes para “pescar” os DRGs puxando-os cuidadosamente pelo nervo. Os DRGs são então coletados e armazenados para as análises.

Para injeção intratecal os camundongos foram anestesiados com administração contínua de Isofurano durante o procedimento. O pelo da região lombar das costas foi retirado e o processo L6, mais proeminente, foi localizado para detectar o local de injeção. Uma agulha de 30G foi inserida cuidadosamente entre o sulco das vértebras L5 e L6 e um movimento de cauda indica uma entrada bem sucedida da agulha no espaço intradural (Njoo et al., 2014). Os volumes de injeção utilizados neste trabalho foram de 10-20 ul.

#### 4.5. Tratamentos

##### 4.5.1. Sofosbuvir

Os animais C57B/6 machos com quatro semanas de idade foram tratados com o antiviral Sofosbuvir por via oral, 20 mg/kg em um volume de 80 ul, uma hora antes da infecção e diariamente durante 7 dias conforme descrito por Ferreira et al. (Ferreira et al., 2019). O grupo controle foi tratado com PBS 5% de DMSO. Para o tratamento intratecal foi utilizado uma dose única de 10uM em 10ul com o tratamento uma hora antes da infecção, o grupo controle recebeu 10uL intratecal de PBS 5% de DMSO.



**Figura 8: Esquema representativo dos experimentos *in vivo* – Tratamento com Sofosbuvir.**

Camundongos C57BL/6 foram tratados com sofosbuvir uma hora antes da infecção com 10uM via intratecal ou 20 mg/kg por via oral. O tratamento por via oral foi feito durante 7 dias, todos os dias, enquanto o tratamento intratecal foi feito em dose única. Após uma hora de tratamento, os animais foram infectados por via intraplantar com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV. Os animais foram então acompanhados até o 28º dia p.i. para medidas de edema e hipernocicepção.

#### 4.5.2. Celecoxibe

Os animais C57B/6 machos com quatro semanas de idade foram tratados com o Celecoxibe (15 mg/kg, i.p. 1 vez ao dia). Os camundongos foram tratados nos dias 0, 1 e 2 da infecção e a hipernocicepção foi avaliada a partir do 1º até o 28º dia da infecção. Outro grupo de animais foi tratado por via intratecal (5 ug/10ul) em dose única.

#### 4.5.3. Antagonista de ccr2

Os animais C57B/6 machos com quatro semanas de idade foram tratados com um antagonista específico de CCR2 (RS504393 - Tocris). Os animais foram tratados em dose única por via intratecal, com 25 ug/20uL, imediatamente antes da infecção.



#### 4.6. Propagação e concentração do vírus

O CHIKV foi propagado em células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número 0343 mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), com atmosfera umidificada a 37°C na presença de meio de cultivo Leibowitz L- 15 suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 2% Soro Fetal Bovino – por 5-7 dias.

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

#### 4.7. Determinação da carga viral

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

Células da linhagem VERO (células derivadas de rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) provenientes do BCRJ sob número 0245 crescidas em meio RPMI 1X, suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino. As células são tripsinizadas, homogeneizadas e plaqueadas, em placas de 12 poços, a uma densidade de  $5 \times 10^5$

células/poço. As placas são incubadas em uma estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sup>2</sup> por cerca de 24 horas, quando seus poços devem apresentar uma monocamada de células com confluência de 85 a 90%.

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

#### 4.1. Análise por RT-PCR

A reação de RT-PCR foi realizada para a determinação de carga viral no DRG, além dos marcadores TRPV1, COX-2, CXCL1, CCL2, IL-1β e TNF, cujos primers estão

descritos na tabela abaixo (Tabela 1). As amostras foram submetidas à extração de RNA e, subsequentemente, à síntese de cDNA utilizando Random primers (Promega, EUA) e SuperScript Reverse Transcriptase III (Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. A reação de amplificação foi realizada no termociclador 7500 Fast usando o fluoróforo SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, EUA) e iniciadores específicos (obtido da Integrated DNA Technologies (IDT, EUA)) e demais marcadores avaliados.

**Tabela 1: Sequências de *primers* utilizados.**

<b>Alvos</b>	<b>Sequência dos <i>primers</i></b>
GAPDH	F - ACGGCCGCATCTTCTTGCA R - CGCCCAATCCGTTACACCG
CCL2	F - 5'-TAA AAA CCT GGA TCG GAA CCA AA-3' R - 5'-GCA TTA GCT TCA GAT TTA CGG GT- 3'
CXCL1	F - TGTCCCAAGTAACGGAGAAA R - TGTCAGAAGCCAGCGTTCAC
COX-2	F - AGAAGGAAATGGCTGCAGAA R - GCTCGGCTTCCAGTATTGAG
TRPV1	F -CTGTGAGGGCGTCAAGCGCA R - TCCGGCTGGGTGCTATGCCT
IL1 $\beta$	F – TGCAGGTCATTTAACCAAGTGG R – TGGGTATTGCTTGGGATCCA
TNF	F – CCCTCACACTCAGATCATCTTCT R – GCTACGACGTGGGCTACAG

#### 4.2. Medida da hipernocicepção articular inflamatória

A avaliação de hipernocicepção, ou medida de dor em animais de experimentação, foi realizada por teste de medida de pressão eletrônica de acordo com a metodologia proposta originalmente por CUNHA e colaboradores (2004), com algumas modificações. A hipernocicepção foi avaliada em diferentes tempos (1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias) por um período de até 28 dias após infecção com o CHIKV. Para este teste os camundongos são colocados em caixas de acrílico sobre uma tela de suporte metálica pelo período de 15 a 30 minutos (período de adaptação). Neste

experimento foi utilizado um medidor de pressão eletrônico que visa avaliar a transmissão do estímulo através de um sensor (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O teste consiste na aplicação de uma ponteira romba de  $0,5\text{mm}^2$  na parte posterior da pata dos animais infectados pelo CHIKV ou nos animais controle (PBS), onde a força perpendicular aplicada na área central da superfície plantar induz a flexão da articulação do joelho seguido da resposta de retirada da pata pelo animal. A intensidade da pressão é automaticamente gravada pelo sensor, em gramas, e os valores para a resposta foram obtidos após três medidas, antes e após a infecção de cada animal individualmente (Cunha et al., 2004).

#### 4.3. Medida do edema plantar

Com a utilização de um paquímetro, foi realizada a medida do edema plantar após a infecção pelo CHIKV. As medidas foram realizadas previamente à injeção intraplantar do vírus, para obtenção dos níveis basais de cada animal, e diariamente até o término do experimento. A medida do volume da pata foi realizada sempre duas vezes pelo mesmo operador e a média destes valores foi utilizada para a computação dos dados. O aumento no volume da pata foi expresso como média ou  $\Delta$  do volume da pata ( $\text{mm}^2$ ). Para controle do experimento, foram utilizados camundongos que receberam injeção via ipl. contendo apenas PBS.

#### 4.4. Determinação dos níveis de citocinas e quimiocinas

As quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL1 ou citocinas IL1 $\beta$  ou TNF foram quantificadas no coxim plantar ou no plasma sanguíneo. Para isso, fragmentos do coxim plantar foram homogeneizados em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1mM phenylmethanesulfonyl fluoride; 0,1mM benzethonium chloride; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução; foi utilizado um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e os

sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) a -20 °C, para análise. Amostras de sangue foram processadas para obtenção do plasma, amostras tratadas com heparina foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e armazenado para uso.

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

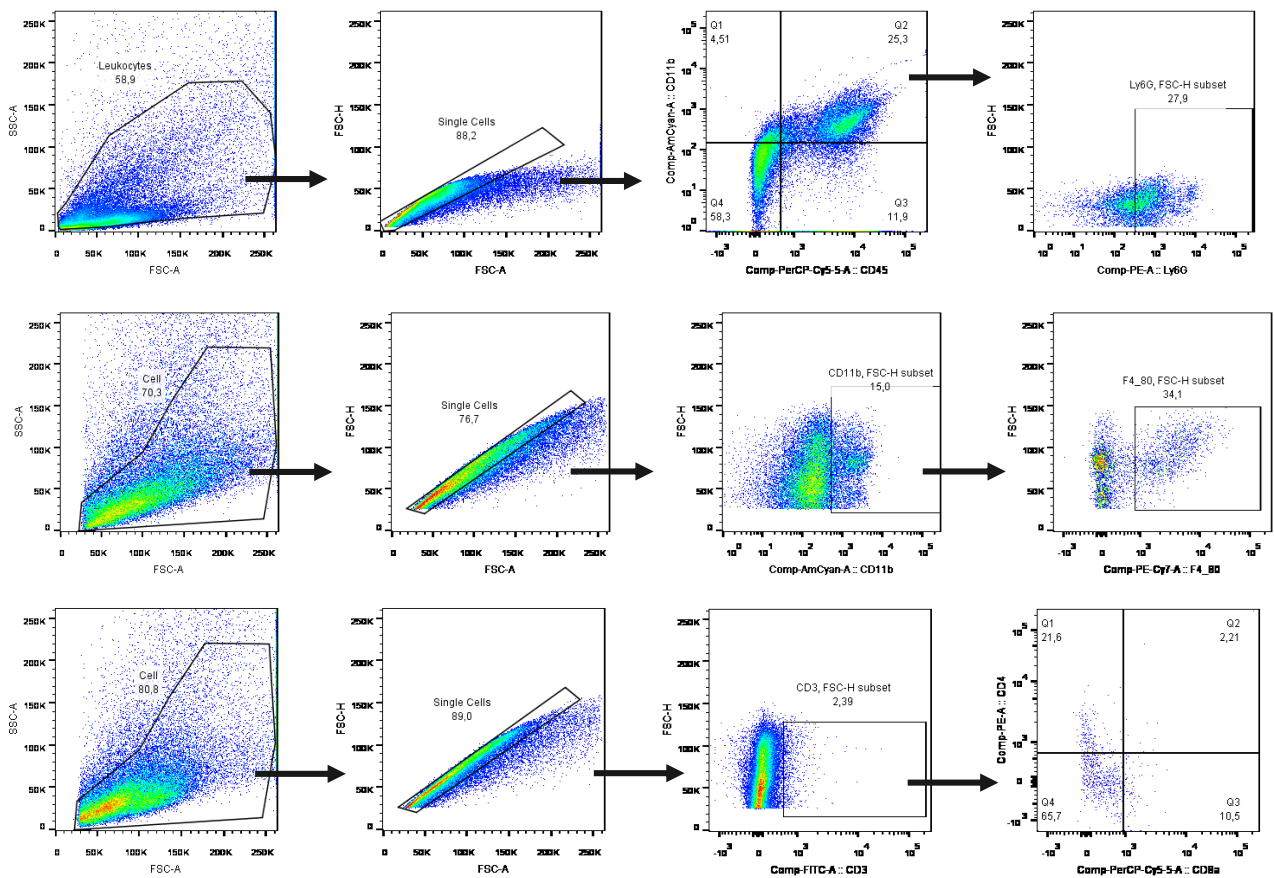
Para a realização do ensaio, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4), sendo que a sensibilização foi feita durante 18h a 4°C. A reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, EUA). As amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por 18h. Os poços foram então lavados e o anticorpo de detecção adicionado pelo período de 2h. A reação foi detectada pela incubação com streptavidina conjugada com peroxidase (HRP-Streptavidin Pharmingem – 1:4000) e revelada com OPD (o-phenylenediamine dihidrocloride – Sigma-Aldrich, EUA). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com a adição de 50uL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura foi feita em espectrofotômetro de placa (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm.

#### 4.5. Avaliação do perfil de receptores e tipos celulares

A expressão dos receptores de superfície CCR2, CX3CR1, F4/80, CD11b, CD45, Ly6C e IBA-1 e MHCII em monócitos ou macrófagos, além de Ly6G, CD19, CD69, CD3, CD4, CD8 e CD11c para neutrófilos, linfócitos e células dendríticas durante a infecção pelo CHIKV foi avaliada através de citometria de fluxo. Foram retirados para citometria linfonodo poplíteo, pata e DRG nos tempos de 1, 7 e 14 dias após infecção. As amostras de linfonodo foram coletadas e homogeneizadas usando maceradores de vidro temperado. As células da pata ou DRG foram obtidas por

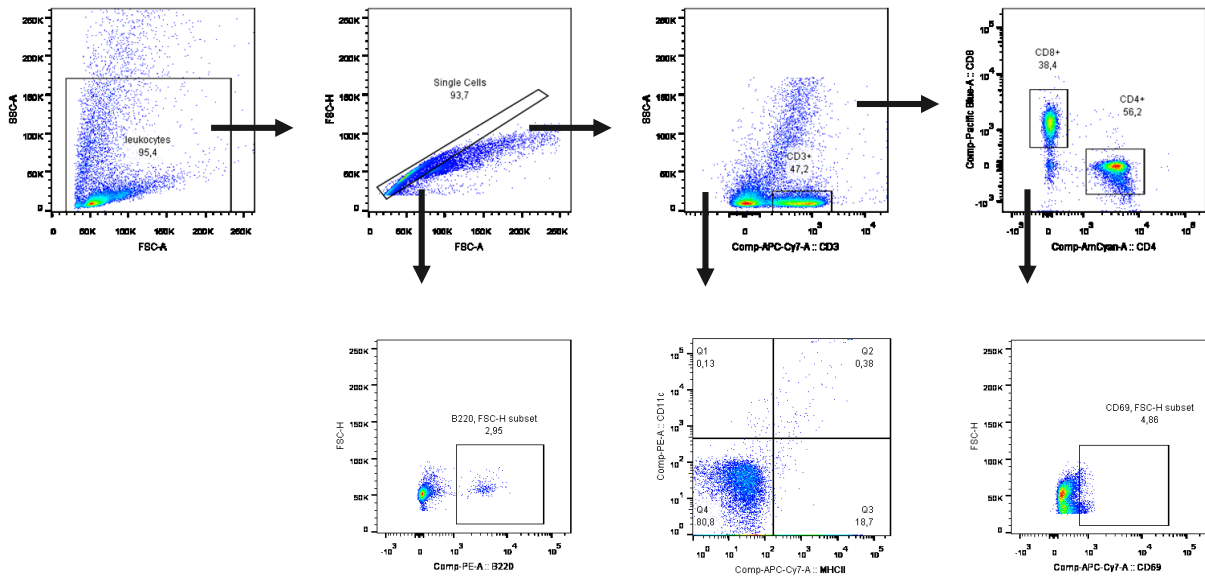
digestão enzimática do tecido (1mg/mL de colagenase IV - Worthington, Lakewood, NJ) a 37°C durante 1 h. As células previamente contadas em câmara de Neubauer, foram plaqueadas em placa de 96 poços para marcação com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos.

Os anticorpos anti cada marcador avaliado foram utilizados além de controles de isótipo das empresas BD Pharmigen TM, eBiosciences e Biolegend. As amostras foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos, seguida de lavagem com PBS-BSA 1%, incubação com estreptavidina conjugada a PE-Cy7 por 30 minutos, outra lavagem e fixação em formaldeído 4% v/v. As células marcadas com anticorpos foram adquiridas no citômetro FACSCanto II e analisadas no software FlowJo (Tree Star). As estratégias de gate utilizadas para análise estão especificadas abaixo (Figuras 9, 10, 11 e 12).



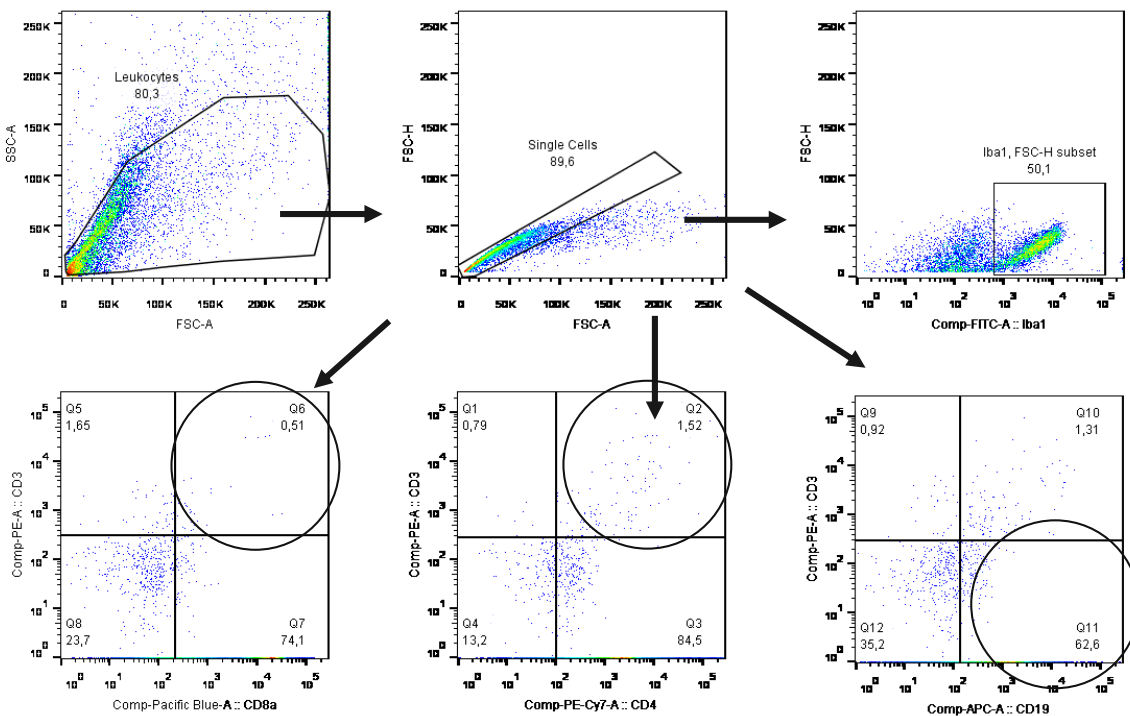
**Figura 9: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no coxim plantar.**

Primeiramente foram feitos gates para células totais e *single cell*. A seguir os leucócitos foram selecionados a partir da marcação de CD11b e CD45 seguido de Ly6G para seleção de neutrófilos. CD11b seguido de F4/80 para macrófagos e CD3 seguido de CD4 ou CD8 para seleção de linfócitos.



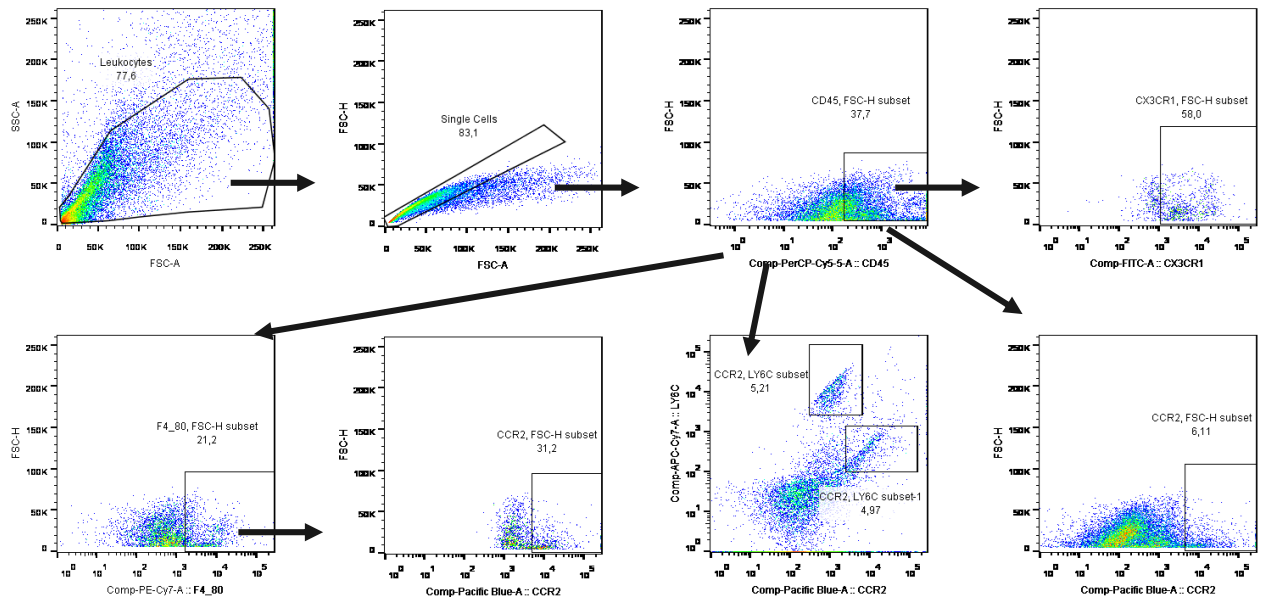
**Figura 10: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no linfonodo poplíteo.**

Primeiramente foram feitos gates para células totais e *single cell*. A seguir os leucócitos foram selecionados a partir da marcação de CD3 positivo ou negativo. A partir de CD3 positivo foram utilizados os marcadores CD4 ou CD8 para linfócitos, seguido de CD69. A partir de CD3 negativo foram utilizados os marcadores CD11c e MHCII para fagocitos mononucleares. Além disso foi utilizado o marcador B220 a partir de *single cell* para avaliação de linfócito B.



**Figura 11: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no DRG - I.**

Primeiramente foram feitos gates para células totais e *single cell*. A seguir foram selecionados os marcadores IBA1, CD3/CD8 ou CD3/CD4 para linfócitos T, ou CD19 com CD3 negativo para células B.



**Figura 12: Estratégia de gate para avaliação de leucócitos no DRG - II.**

Primeiramente foram feitos gates para células totais e *single cell*. A seguir os leucócitos foram selecionados a partir de células CD45<sup>+</sup> seguido dos marcadores CX3CR1, F4/80, CCR2 ou Ly6c/CCR2.

#### 4.6. Detecção indireta de neutrófilos (MPO)

O acúmulo de neutrófilos na pata foi avaliado pelo ensaio indireto através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para tanto, fragmentos do coxim plantar dos animais infectados ou controles foram retirados e congelados a -20 °C. Após o descongelamento, 100 mg do tecido foi homogeneizado em 2 mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO<sub>4</sub>; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 -- Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000 g, por 10 min, a 4 °C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2 % gelada (para 100 mg de tecido, 1,5 mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6 % e glicose 5 % gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5 % p/v e re-homogeneizado. Alíquotas de 1 mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) de 1,5 mL e submetidas



a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 3000 g e os sobrenadantes coletados.

A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitura em espectrofotômetro (450 nm) usando tetramethylbenzidine (1.6 mM) e H2O2 (0.5 mM) para a medição das alterações da densidade óptica (OD). Os resultados foram expressos como unidade de absorbância (ABS).

#### 4.7. Análise histopatológica

O membro inferior direito dos camundongos, contendo pata e tornozelo foi coletado ao longo da cinética da infecção e fixado em formol 10 %v/v por no mínimo 2 dias. Em seguida, os tecidos permaneceram em uma solução de EDTA 10 %p/v, durante aproximadamente 40 dias, com troca da solução a cada 3 dias, para a sua desmineralização. Uma vez desmineralizados, os tecidos foram processados, incluídos em parafina, cortados, montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) como descrito por Costa e colaboradores (2015). Foram avaliados os seguintes parâmetros nos cortes: Intensidade de infiltrado inflamatório, hiperemia e perda da arquitetura tecidual em uma escala de 0-7 como descrito por Queiroz-Junior e colaboradores (2011).

#### 4.8. Análise estatística

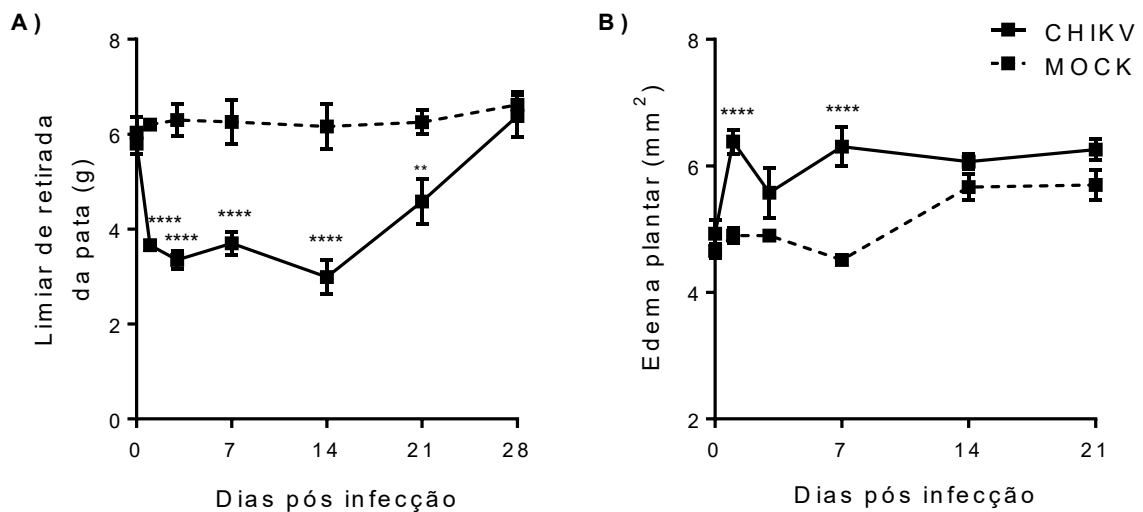
Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão médio (EPM) por grupo de animais. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico (MAN-WHITNEY) ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY ou TWO-WAY), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para a realização de todas as análises, foi utilizado o software GraphPad PRISM (GraphPad Software, EUA). Níveis de significância estabelecidos em  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. A infecção pelo CHIKV induz alteração de parâmetros clínicos e inflamatórios

#### 5.1.1. A infecção pelo CHIKV induz hipernociceção e edema de pata em camundongos C57BL/6

Como previamente demonstrado pelo nosso grupo (Moreira et al., 2022), e reproduzido neste trabalho, a infecção por CHIKV induziu uma hipernociceção que pode ser observada a partir do dia 1 pós-infecção (p.i.) até o dia 21 p.i., não sendo mais observadas diferenças significativas no dia 28 p.i. (Figura 13 A). Além disso, observamos aumento significativo de edema plantar nos dias 1 e 7 p.i. (Figura 13 B).

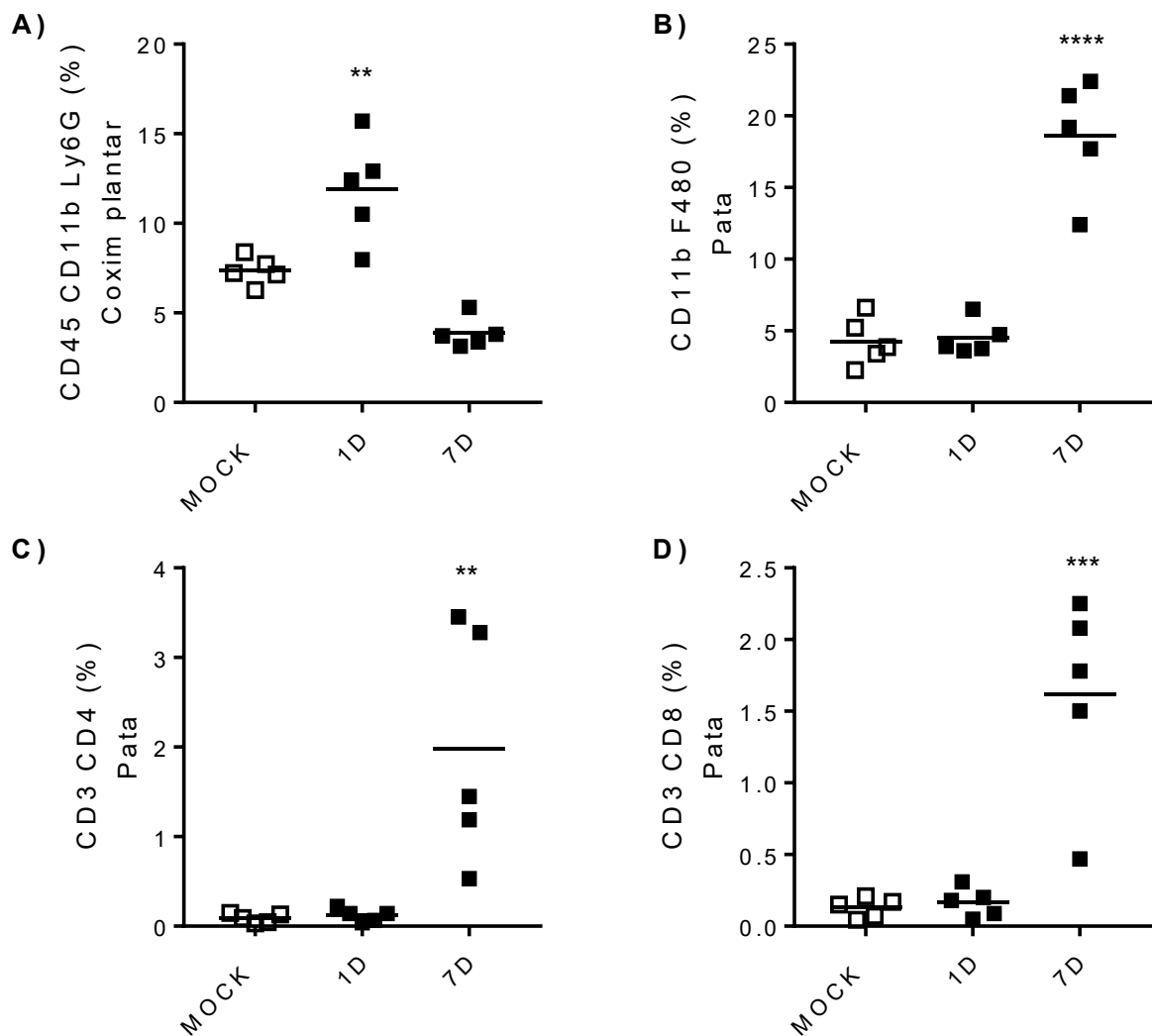


**Figura 13: A infecção subcutânea pelo CHIKV em camundongos induz hipernociceção mecânica e edema plantar.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e as análises de: (A) hipernociceção, através de von frey eletrônico, e (B) edema de pata, pela utilização de um paquímetro, foram realizadas. Os resultados são apresentados como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tíbiotarsal, seguida pela retirada da pata ou em  $\text{mm}^2$  para edema de pata. MOCK= não infectado.  $n=5$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$  Vs MOCK, teste 2way ANOVA.

### 5.1.2. A infecção por CHIKV induz aumento de leucócitos na pata e linfonodo

Para entender o perfil celular após a infecção por CHIKV, realizamos citometria de fluxo nas patas de animais 1 e 7 dias após a infecção. Nossos resultados demonstram um aumento significativo em porcentagem de neutrófilos no dia 1 p.i., sem diferenças no dia 7 p.i. (Figura 14 A). Por outro lado, a porcentagem de macrófagos foi observada aumentada apenas no dia 7 p.i. (Figura 14 B). A porcentagem de linfócitos T CD4 também estava aumentada no dia 7 p.i. (Figura 14 C), assim como os linfócitos T CD8 (Figura 14 D).

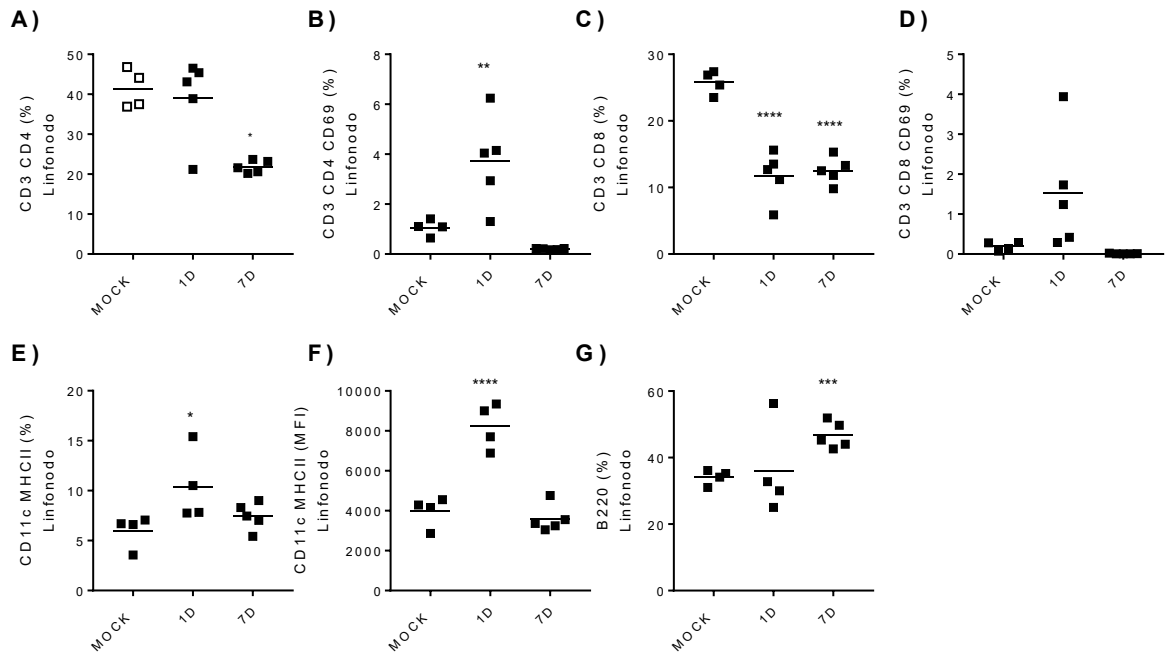


**Figura 14: Caracterização do perfil celular local (coxim plantar) após a infecção pelo CHIKV.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV, a pata foi retirada nos dias 1 e 7 p.i. e a imunofenotipagem por análises de

citometria de fluxo foram realizadas. Foram analisados (A) neutrófilos, (B) macrófagos, (C) linfócitos TCD4, e (D) linfócitos TCD8. Os resultados são apresentados em porcentagem (%) por células totais. MOCK= não infectado.  $n=5$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , \*\*\* $p=0,0001$ , \*\* $p<0,01$  Vs MOCK, teste one-way ANOVA.

Em seguida, foi realizada avaliação do perfil de leucócitos no linfonodo poplíteo drenante (ipsilateral) de animais infectados com CHIKV com 1 e 7 dias p.i.. Para linfócitos do tipo TCD4 foi observado uma diminuição no dia 7 p.i. (Figura 15 A), além



de um aumento em porcentagem de células CD4 CD69<sup>+</sup>, no primeiro dia pós infecção (Figura 15 B). Uma diminuição na porcentagem de células TCD8 nos tempos de 1 e 7 dias pós infecção (Figura 15 C) foi observada, sem alteração significativa na expressão do marcador CD69<sup>+</sup> nessas células (Figura 15 D). Foi observado um aumento de células dendríticas expressando o MHCII<sup>+</sup> no dia 1 p.i. (Figura 15 E), com aumento de MFI (*Median Fluorescence Intensity*) para MHCII nestas células (Figura 15 F). Ainda observamos um aumento significativo de células B no dia 7 pós infecção (Figura 15 G).

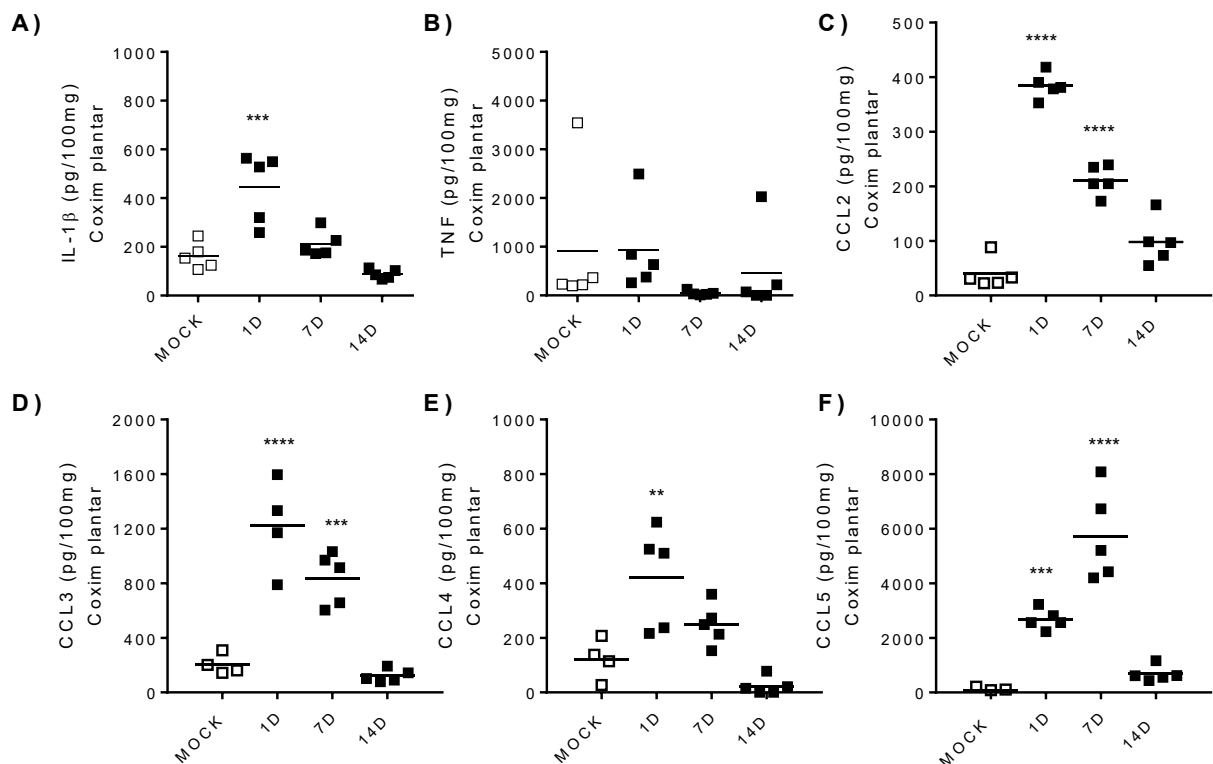
**Figura 15: Caracterização do perfil de leucócitos no linfonodo poplíteo drenante após a infecção pelo CHIKV.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e o linfonodo poplíteo foi retirado nos dias 1 e 7 p.i. para análises de citometria de fluxo. Foram analisados linfócitos TCD4 (A), linfócitos TCD4 CD69<sup>+</sup> (B), linfócitos TCD8 (C) e TCD8 CD69<sup>+</sup> (D), além de células dendríticas (E) e MHCII (F) e linfócitos B (G). Os resultados são apresentados em porcentagem (%) por células totais ou MFI. MOCK= não infectado.  $n=5$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , \*\*\* $p=0,0001$ , \*\* $p<0,01$  Vs MOCK, teste one-way ANOVA.

### 5.1.3. A infecção por CHIKV induz aumento de citocinas na pata e sangue

Em seguida, avaliamos a produção de citocinas/quimiocinas no coxim plantar destes animais. Foi possível observar um aumento da concentração de IL-1 $\beta$  no coxim plantar de animais infectados pelo CHIKV nos tempos de 1 dia p.i. quando comparado ao seu controle não infectado, não havendo mais diferença significativa no dia 7 pós infecção (Figura 16 A), enquanto para TNF não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos tempos avaliados, quando comparado ao seu controle (Figura 16 B).

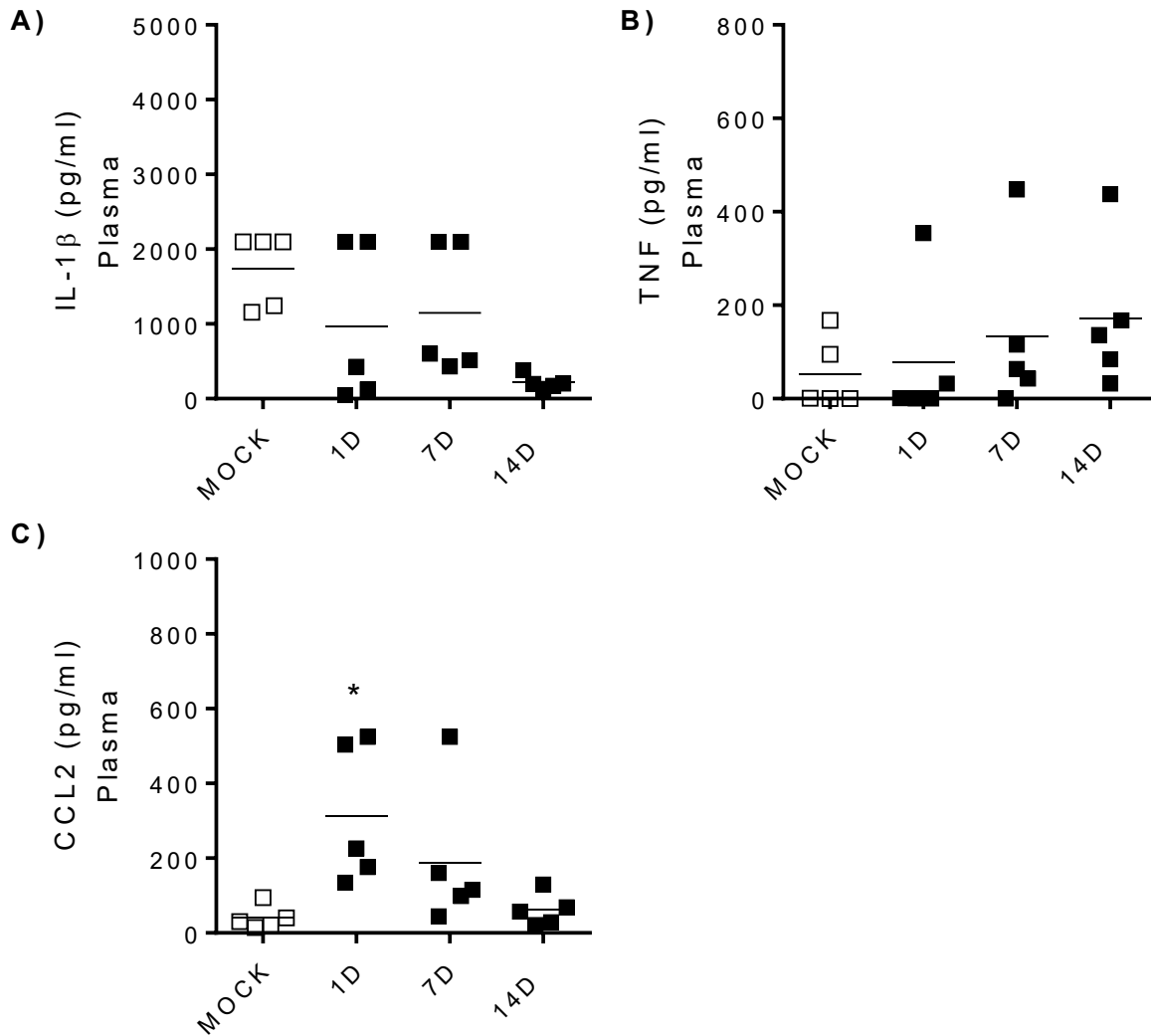
Observamos aumento nas concentrações de CCL2, CCL3 e CCL5 nos dias 1 e 7 pi (Figura 16 C, D, F). Houve um aumento significativo da concentração de CCL4 1 dia p.i. (Figura 16 E).



**Figura 16: A infecção pelo CHIKV induz a um aumento de citocinas e quimiocinas local.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV. Níveis de IL-1 $\beta$  (A), TNF (B), CCL2 (C), CCL3 (D), CCL4 (E) e CCL5 (F) foram quantificadas por ELISA no coxim plantar. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. MOCK= não infectado. n= 5, \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p=0,0001, \*\*p<0,01 Vs MOCK, teste one-way ANOVA.

Nosso próximo passo foi avaliar a concentração de citocinas circulantes. De maneira interessante, não observamos aumento significativo na concentração de IL-1 $\beta$  (Figura 17 A), ou TNF (Figura 17 B), no plasma de animais infectados com CHIKV nos tempos avaliados. Entretanto, foi observado um aumento na concentração de CCL2 circulante 1 dia pós infecção (Figura 17 C).



**Figura 17: A infecção pelo CHIKV induz um aumento de CCL2 no plasma, sem alteração nos níveis das citocinas IL-1 $\beta$  ou TNF.**

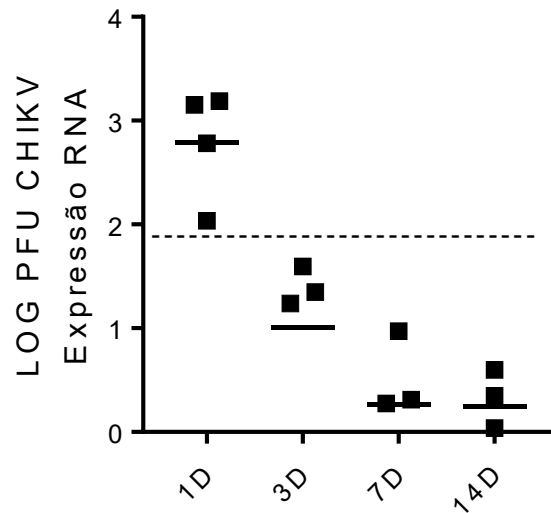
Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV. Níveis de IL-1 $\beta$  (A), TNF (B) ou CCL2 (C) foram quantificados por ELISA no plasma. Os resultados são apresentados como pg por ml. MOCK= não infectado.  $n=5$ ,  $*p<0,05$  Vs MOCK, teste one-way ANOVA.

Em conjunto com os dados já publicados pelo nosso grupo (Moreira et al., 2022), os dados apresentados nesta seção complementam a caracterização sistêmica

da doença no nosso modelo após infecção pelo CHIKV. De forma geral, observamos que a inflamação sistêmica persiste apenas na fase aguda da doença com 1 ou 7 dias pós infecção, retornando aos níveis basais no dia 14. Uma vez que a hipernocicepção foi observada por períodos tardios (até 21 dias pós infecção), os dados do modelo já publicados ou descritos até aqui, não explicam por completo este fenótipo de persistência observado. Assim, nosso próximo passo foi avaliar e caracterizar os possíveis componente imunoinflamatórios do sistema nervoso periférico no gânglio da raiz dorsal (DRG) destes animais infectados pelo CHIKV.

5.2. A presença de vírus no DRG não parece ser um fator determinante para a manutenção da hipernocicepção

Inicialmente avaliamos a presença do vírus nos DRGs associados ao nervo ciático. Através de ensaio de recuperação viral viável, titulação viral, não foram recuperados vírus viáveis no DRG nos tempos de 1, 3 ou 7 dias pós infecção (dados não mostrados). Em seguida, avaliamos a presença do genoma viral por meio da quantificação do RNA viral neste tecido. Nossos resultados demonstram que no primeiro dia pós infecção foi possível observar uma quantidade significativa de RNA viral, recuperado por RT PCR no DRG, indicando a presença de componentes virais neste tecido (Figura 18). Não observamos RNA viral nos demais tempos avaliados.

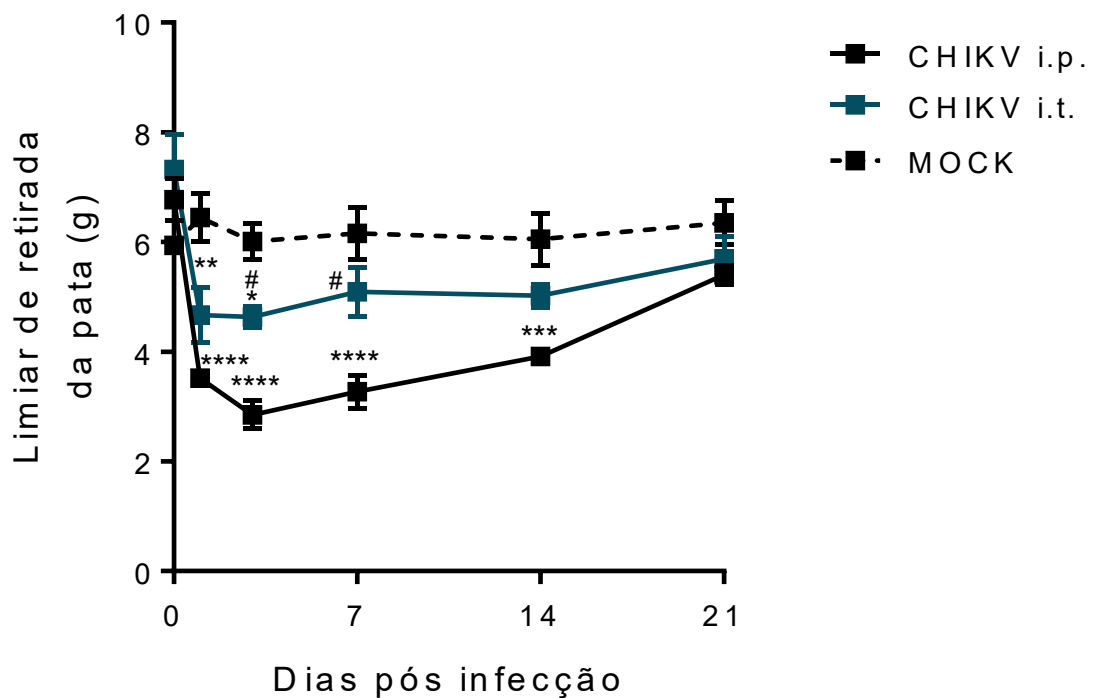


**Figura 18: Recuperação de RNA viral no DRG com 1 dia pós infecção.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e o DRG foi retirado para análises por RT-PCR. A presença de RNA viral foi avaliada e os resultados são expressos através da conversão, utilizando uma curva padrão, para LOG PFU. n=3-4 animais.

Para entender se a presença do RNA viral no DRG poderia contribuir com a hipernocicepção persistente observada após infecção pelo CHIKV, nosso próximo passo foi avaliar o efeito da infecção intratecal com o CHIKV na hipernocicepção mecânica e compará-lo com a infecção subcutânea. A infecção intratecal induziu hipernocicepção a partir do primeiro dia p.i. quando comparado aos animais não infectados. Porém de forma interessante, a hipernocicepção induzida pela injeção intratecal foi menor quando comparado ao grupo infectado por via subcutânea (Figura 19).



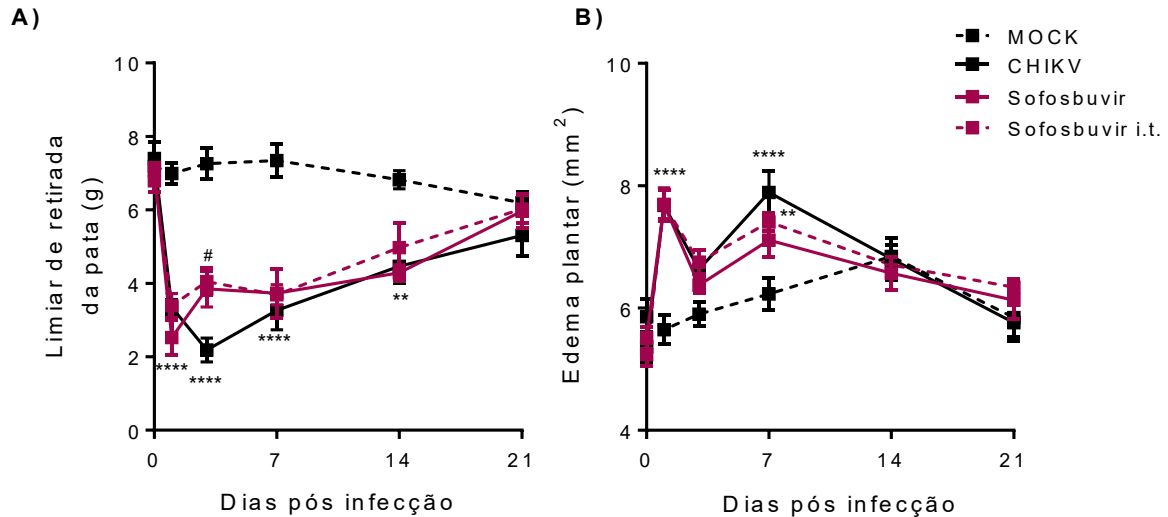


**Figura 19: A infecção por via intratecal pelo CHIKV induz hipernocicepção mecânica em menor magnitude se comparado à infecção subcutânea.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via intratecal com  $2 \times 10^5$  PFU de CHIKV e análises de hipernocicepção foram realizadas através de von frey eletrônico (A). Os resultados são apresentados como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tibiotarsal, seguida pela retirada da pata. MOCK= não infectado, CHIKV i.p. = infecção intraplantar, CHIKV i.t. = infecção intratecal.  $n=5$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , \*\*\* $p=0,0001$ , \*\* $p<0,01$  Vs MOCK, teste 2way ANOVA.

Nosso próximo objetivo foi avaliar se o tratamento com um antiviral seria capaz de inibir o efeito nociceptivo induzido pela infecção por CHIKV. Para isso foi realizado tratamento por via sistêmica ou intratecal com um antiviral, o sofosbuvir, com efeito já demonstrado para CHIKV (Ferreira et al., 2019). O tratamento com o antiviral Sofosbuvir foi realizado por via sistêmica (oral) por 7 dias, ou por via intratecal, em dose única, e a hipernocicepção (Figura 20 A) e edema (Figura 20 B) foram avaliados. Os animais infectados pelo CHIKV e tratados com o veículo apresentaram hipernocicepção persistente até o dia 14 p.i.. O tratamento com Sofosbuvir por ambas as vias inibiu na hipernocicepção apenas com 3 dias pi (Figura 20 A). Para as medidas de edema de pata, foi observado um aumento de edema nos dias 1 e 7 p.i. para o grupo de animais infectados e não foram observadas alterações significativas quando

os grupos tratados foram comparados ao grupo infectado e tratado com veículo (Figura 20 B).



**Figura 20: Tratamento com antiviral por via sistêmica ou intratecal reverte parcialmente a hipernocicepção induzida pelo CHIKV no 3dpi..**

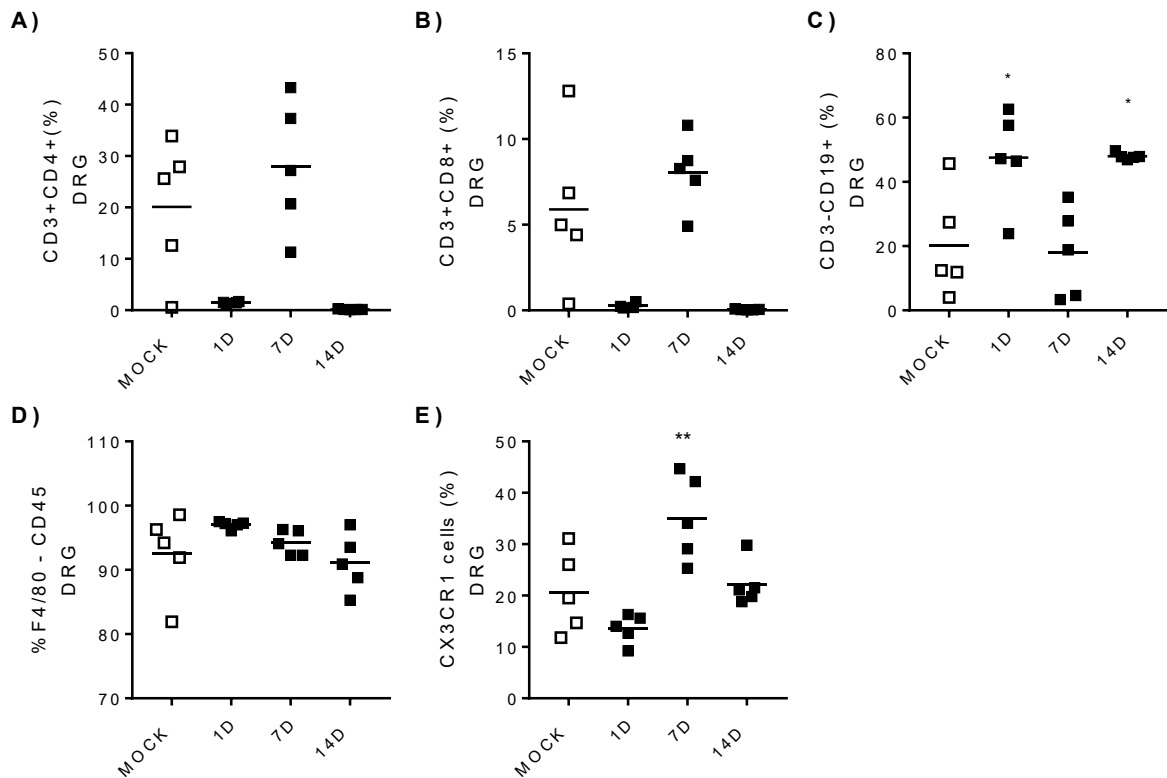
Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e em seguida foram tratados com Sofosbuvir na dose de 20 mg/kg/80ul por via sistêmica ou 10uM/10ul por via intratecal. Análises de hipernocicepção foram realizadas através de von frey eletrônico (A), além de edema de pata (B). Os resultados são apresentados como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tíbiotarsal, seguida pela retirada da pata ou em  $\text{mm}^2$  para edema de pata. MOCK= não infectado.  $n = 5$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p = 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  Vs MOCK, # Vs CHIKV, teste 2way ANOVA.

A partir deste grupo de resultados podemos concluir que a presença de vírus no DRG parece não ser o fator determinante para o desenvolvimento e manutenção da hipernocicepção induzida pelo CHIKV. Assim, resolvemos avaliar os possíveis aspectos imunoinflamatórios no DRG após infecção por via subcutânea pelo CHIKV.

5.3. A resposta imunoinflamatória no DRG é determinante para a gênese e manutenção da hipernocicepção após infecção pelo CHIKV

5.3.1. Após infecção pelo chikv é observado um aumento e persistência de leucócitos no DRG

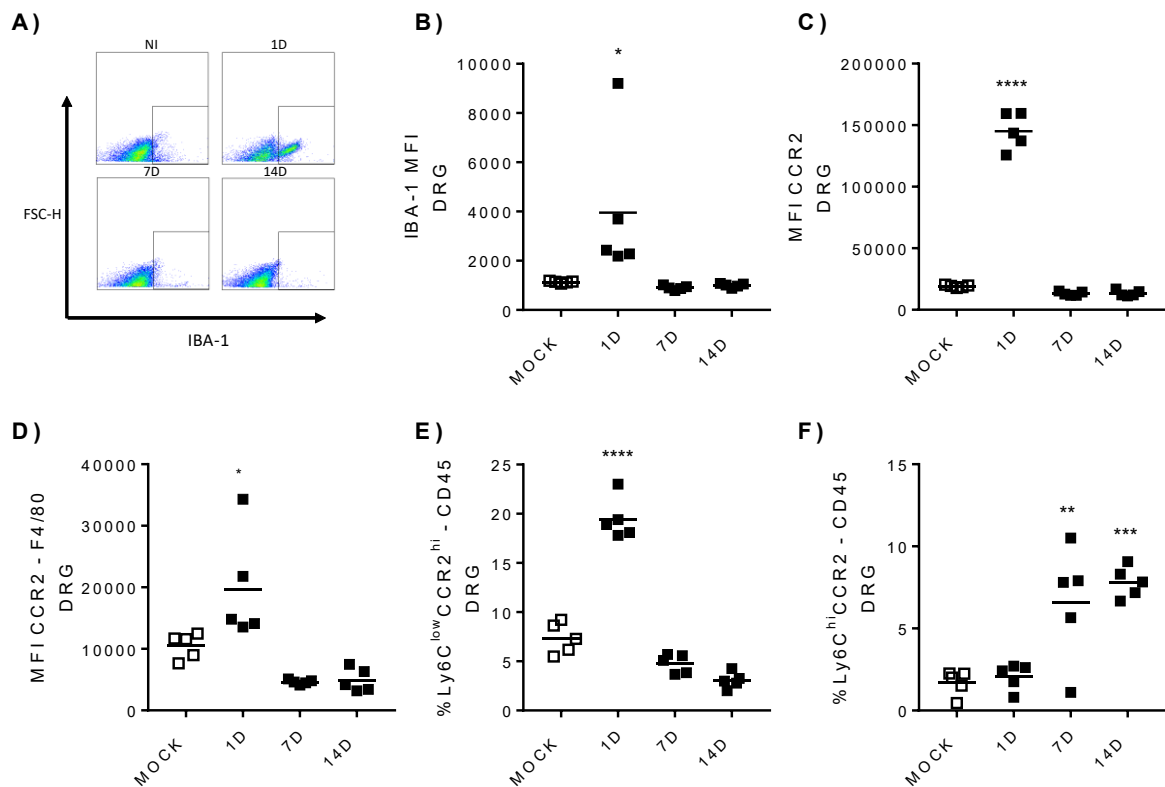
A seguir foram feitas análises de perfil inflamatório no DRG de animais infectados. Primeiramente imunofenotipamos os leucócitos no DRG através de citometria de fluxo. Não foram observadas diferenças significativas para linfócitos do tipo TCD4<sup>+</sup> (Figura 21 A) ou TCD8<sup>+</sup> (Figura 21 B). Para células B (CD19) foram observados aumento nos tempos de 1 e 14 dias pós infecção (Figura 21 C). Quando avaliado o marcador F4/80 para os macrófagos residentes não foi observado alterações significativas (Figura 21 D), enquanto para CX3CR1 foi observado um aumento no 7º dia pós infecção (Figura 21 E).



**Figura 21: Perfil de Leucócitos no DRG de camundongos infectados pelo CHIKV.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e os DRG foram retirados para análises por citometria de fluxo. Foram avaliados marcadores para células CD4+ (A), CD8+ (B), CD19+ (C), F4/80+ (D) ou CX3CR1 (E). Os dados são expressos como porcentagem (%) de células. MOCK= não infectado. n= 5, \*\*p<0,01, \*p<0,05 Vs MOCK, teste one-way ANOVA.

Uma vez que foi observado a presença de CCL2 no sangue e pata de animais infectados e dada a importância de monócitos e macrófagos, já descrito na literatura, no desenvolvimento da doença causada pelo CHIKV, resolvemos aprofundar as análises nos macrófagos, avaliando marcadores como IBA1 ou CCR2, que indicam atividade pró-inflamatória destas células. O aumento de IBA-1 é observado no dia 1 p.i. através do aumento de MFI observado no esquema representativo (Figura 22 A) ou pelo gráfico (Figura 22 B). O aumento de CCR2 é observado para células totais (Figura 22 C) ou macrófagos F4/80 (Figura 22 D), no DRG, no dia 1 p.i.. Avaliamos ainda os marcadores Ly6C e CCR2 em configurações *high/low* e foi observado um aumento de células CCR2<sup>hi</sup> no primeiro dia pós infecção (Figura 22 E), além de aumento de células Ly6C<sup>hi</sup> em tempos tardios, 7 e 14 p.i. (Figura 22 F).

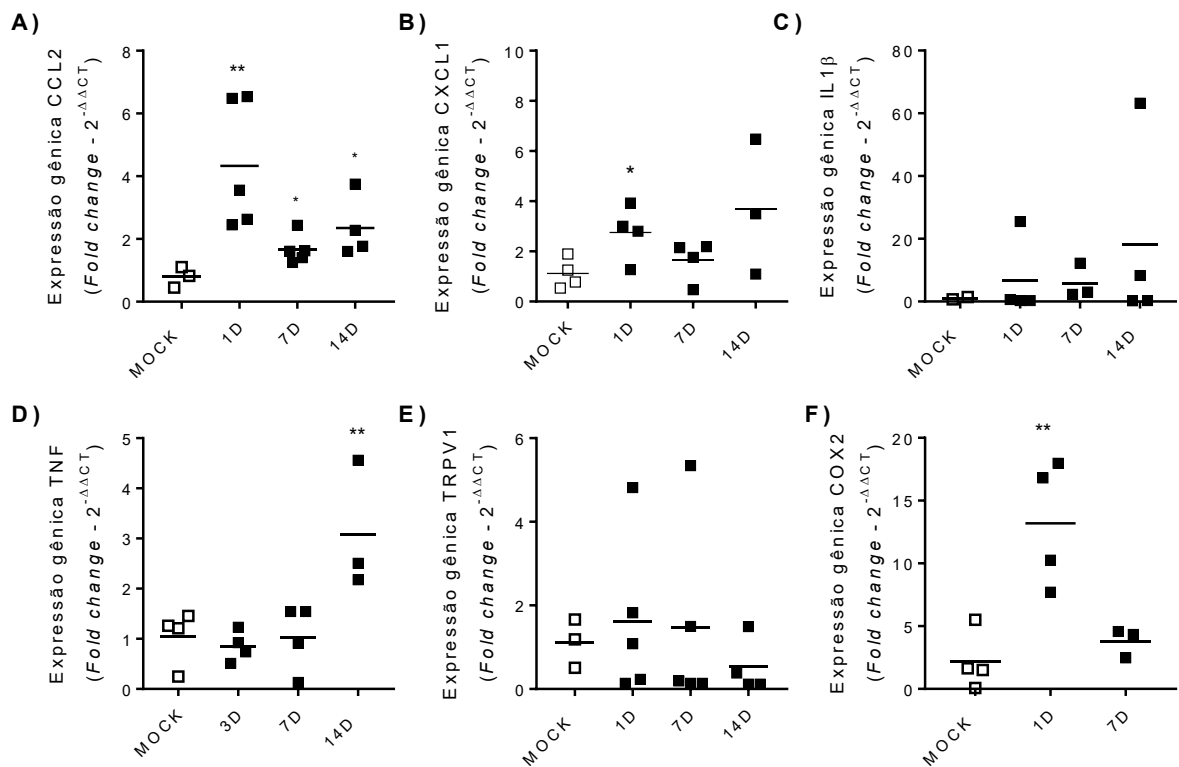


**Figura 22: Perfil de macrófagos no DRG após infecção por CHIKV.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e os DRG foram retirados para análises por citometria de fluxo. Foram avaliados marcadores para células IBA+ (A) e (B), CCR2+ (B), F4/80+CCR2+ (C), além de células Ly6C<sup>low</sup>CCR2<sup>hi</sup> (D) e Ly6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>low</sup> (E). Os dados são expressos como porcentagem (%) de células ou MFI. MOCK= não infectado. n= 5, \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p=0,0001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 Vs MOCK, teste one-way ANOVA.

Uma vez demonstrado que há aumento de marcadores associados a células inflamatórias no DRG, nosso próximo passo foi avaliar a expressão de citocinas como CCL2, CXCL1, IL1 $\beta$ , TNF, do canal iônico TRPV1 e de COX-2 no DRG.

Foi observado um aumento de CCL2 em todos os tempos pós infecção avaliados, 1, 7 e 14 dias p.i. (Figura 23 A), além de um aumento de CXCL1 no dia 1 p.i. (Figura 23 B). Para IL1 $\beta$  não foram observadas alterações significativas (Figura 23 C), porém foi observado um aumento de TNF no dia 14 p.i. (Figura 23 D). Não foi observada diferença significativa na expressão de TRPV1 em nenhum dos tempos avaliados (Figura 23 E). De maneira interessante, observamos aumento de COX-2 no dia 1 p.i. mas não no dia 7 pi (Figura 23 F).

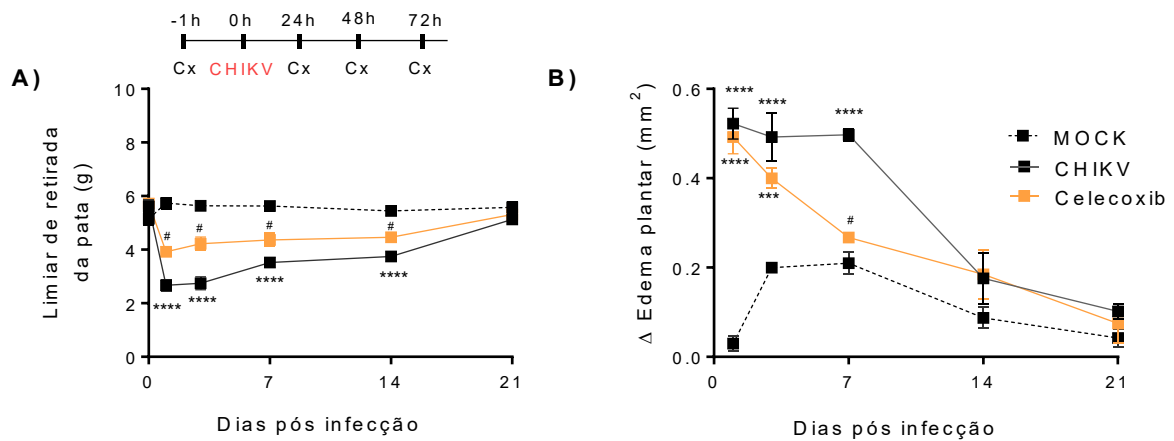


**Figura 23: Após infecção por CHIKV é observado aumento das citocinas inflamatórias CCL2, CXCL-1 e TNF além da enzima COX-2 e no DRG.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e os DRG foram retirados para análises por RT PCR. Foram avaliadas as citocinas CCL2 (A) IL1 $\beta$  (B), TNF (C) ou o canal iônico TRPV1 (D). MOCK= não infectado. n= 5, \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p=0,0001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 Vs MOCK, teste one-way ANOVA.

### 5.3.2. A enzima COX-2 tem um importante impacto na gênese da hipernocicepção induzida por CHIKV.

Uma vez demonstrado o aumento de COX-2 no DRG em fases iniciais da infecção, decidimos avaliar se a inibição dessa enzima estava associada a hipernocicepção induzida pela infecção por CHIKV. Inicialmente, animais infectados com CHIKV receberam o tratamento por via intraperitoneal com celecoxibe, um inibidor específico de COX-2. Com o tratamento com celecoxibe foi observado uma diminuição na hipernocicepção induzida por CHIKV (Figura 24 A), além de uma diminuição no edema no dia 7 p.i. quando comparado ao grupo de animais infectados e tratados com veículo (Figura 24 B).



**Figura 24: A hipernocicepção é parcialmente reduzida após o tratamento com um inibidor específico de COX-2.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e tratados por via intraperitoneal com Celecoxibe (15mg/kg, i.p. 1 vez ao dia), uma hora antes da infecção e durante 3 dias consecutivos. Análises de hipernocicepção foram realizadas através de von frey eletrônico (A), além de edema de pata (B). MOCK= não infectado. n= 5, \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p=0,0001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 Vs MOCK, # Vs CHIKV, teste one-way ANOVA.

Entretanto, não houve diferença na recuperação de vírus viável na pata, joelho, linfonodo, músculo, baço e fígado. Foi observado um aumento de recuperação viral apenas no sangue de animais tratados com Celecoxibe, quando comparado ao grupo controle (Tabela 2).

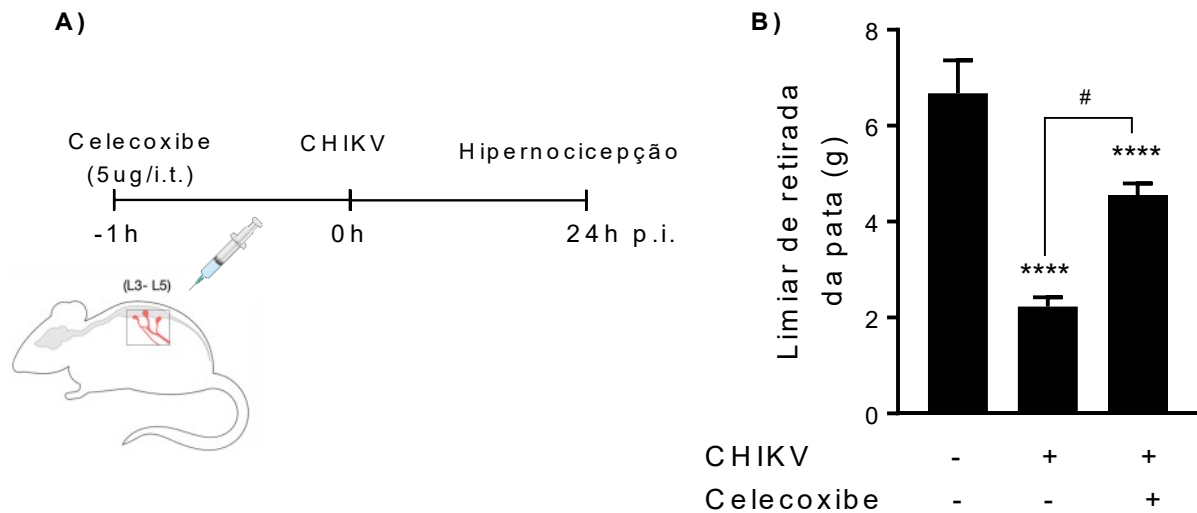
	Titulação (LOG CHIKV/PFU)					
	1 d.p.i		3 d.p.i		7 d.p.i	
	Veic	Celecoxibe	Veic	Celecoxibe	Veic	Celecoxibe
Pata	8,96 ± 0,32	8,87 ± 0,19	8,11 ± 0,38	7,69 ± 0,42	2,86 ± 0,84	2,73 ± 0,99
Joelho	7,96 ± 0,32	7,91 ± 0,17	7,16 ± 0,89	7,38 ± 0,17	2,86 ± 2,86	2,36 ± 0,81
Linfonodo poplíteo	6,02 ± 0,68	6,35 ± 0,26	3,76 ± 0,25	3,76 ± 0,25	nd	nd
Musculo	5,65 ± 0,29	5,97 ± 0,06	2,2 ± 0,44	2,39 ± 0,62	nd	nd
Baço	6,08 ± 0,14	5,91 ± 0,10	3,15 ± 0,31	3,16 ± 0,28	nd	nd
Figado	5,40 ± 0,15	5,25 ± 0,27	2,20 ± 0,28	2,10 ± 0,23	nd	nd
Sangue	4,58 ± 0,21	<b>5,66 ± 0,29</b>	2,54 ± 0,83	2,10 ± 0,23	nd	nd

**Tabela 2: O bloqueio farmacológico de COX-2 induz aumento de título viral no sangue sem alteração para os demais tecidos avaliados.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e tratados por via intraperitoneal com Celecoxibe (15mg/kg, i.p. 1 vez ao dia) uma hora antes da infecção e durante 3 dias consecutivos. Análises de placa de lise e titulação viral foram utilizados para determinar o título viral. Veic= Tratado com veículo e infectado. n= 5, \*p<0,05 Vs Veic, Teste t de Student.

A seguir, na intenção de entender se uma inibição de COX-2 local no DRG seria capaz de alterar a resposta de dor em animais infectados, realizamos o tratamento intratecal com celecoxibe (5ug/animal) uma hora antes da infecção e a hipernocicepção foi avaliada 24 horas depois (Figura 25 A). Com o tratamento intratecal com celecoxibe é observado uma hipernocicepção diminuída, quando comparado ao controle infectado e tratado com o veículo no primeiro dia p.i. (Figura 25 B).





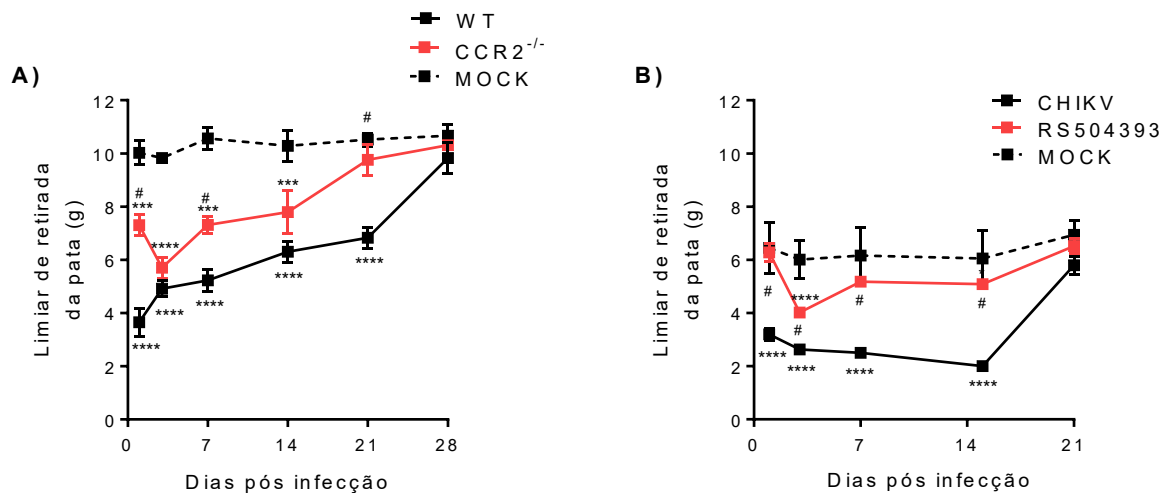
**Figura 25: O tratamento intratecal com o celecoxibe diminui parcialmente a hipernocicepção induzida pelo CHIKV.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e tratados por via intratecal com Celecoxibe (5ug/animal) uma hora antes da infecção em dose única (A) e foram feitas medidas de hipernocicepção 24 horas após a infecção (B). MOCK= não infectado.  $n=5$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p = 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  Vs MOCK, # Vs CHIKV, teste one-way ANOVA.

### 5.3.3. O receptor CCR2 tem um importante impacto na hipernocicepção induzida por CHIKV

Em seguida, buscamos entender o impacto do receptor CCR2 na doença causada pelo CHIKV em nosso modelo. Para isso animais deficientes para o receptor CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>) foram infectados com CHIKV e a cinética de hipernocicepção avaliada. Para animais WT foi observado uma hipernocicepção a partir do primeiro dia p.i. que é mantida até 21 dias. Já para o grupo de animais CCR2<sup>-/-</sup> foi observada uma hipernocicepção estatisticamente reduzida quando comparada com os animais WT nos tempos de 1, 7 e 21 dias pi, sendo que no dia 21 os animais já não apresentavam hipernocicepção quando comparado ao controle não infectado (Figura 26 A).

Para avaliar se a inibição local de CCR2 no DRG seria capaz de reduzir a hipernocicepção, realizamos um tratamento intratecal com um antagonista específico de CCR2 (RS504393 - 25ug/20uL). Foi observado que com o tratamento intratecal com RS504393 os animais apresentam uma hipernocicepção diminuída, quando comparado ao controle infectado que recebeu veículo, sendo estatisticamente diferente em todos os tempos avaliados, 1, 3, 7 ou 14 dias p.i. (Figura 26 B).

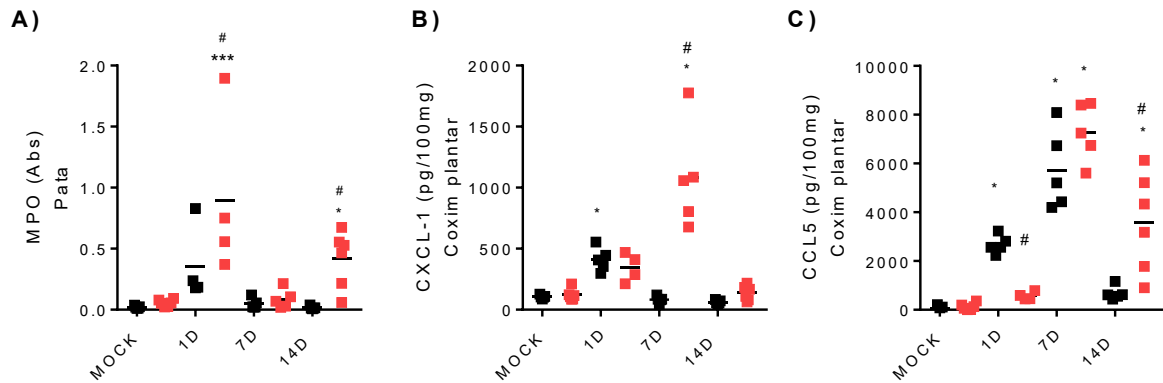


**Figura 26: A deleção genética ou inibição farmacológica de CCR2 está associada a redução da hipernocicepção causada pelo CHIKV.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e foram acompanhados para análise de hipernocicepção por até 28 dias. Camundongos C57BL/6 foram tratados por via intratecal. Hipernocicepção de animais C57BL/6 ou CCR2<sup>-/-</sup> (A), tratamento com RS504393 (B). Os resultados são apresentados como a força (g) necessária para induzir a flexão dorsal da articulação tíbiotarsal, seguida pela retirada da pata ou em mm<sup>2</sup> para edema de pata. MOCK= não infectado. n= 5, \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p=0,0001, \*\*p<0,01, \*p<0,05 Vs MOCK, # Vs CHIKV, # Vs CHIKV, teste one-way ANOVA.

Buscando entender o papel do receptor CCR2 na infecção por CHIKV, nós avaliamos o papel desse receptor na modulação da resposta inflamatória. Nossos dados demonstram que enquanto os animais C57B/6 (WT) não apresentam aumento de MPO na pata, os animais CCR2<sup>-/-</sup> apresentaram um aumento significativo dessa peroxidase nos tempos 1 e 14 dias p.i. (Figura 27 A). De maneira interessante há alteração na cinética de produção de CXCL-1, enquanto em animais WT se observou um aumento significativo dessa quimiocina no dia 1 p.i., em animais CCR2<sup>-/-</sup> este aumento foi observado apenas no dia 7 p.i. (Figura 27 B). Foi observado um aumento na quimiocina CCL5, nos tempos 1 e 7 pós infecção em animais WT, enquanto em

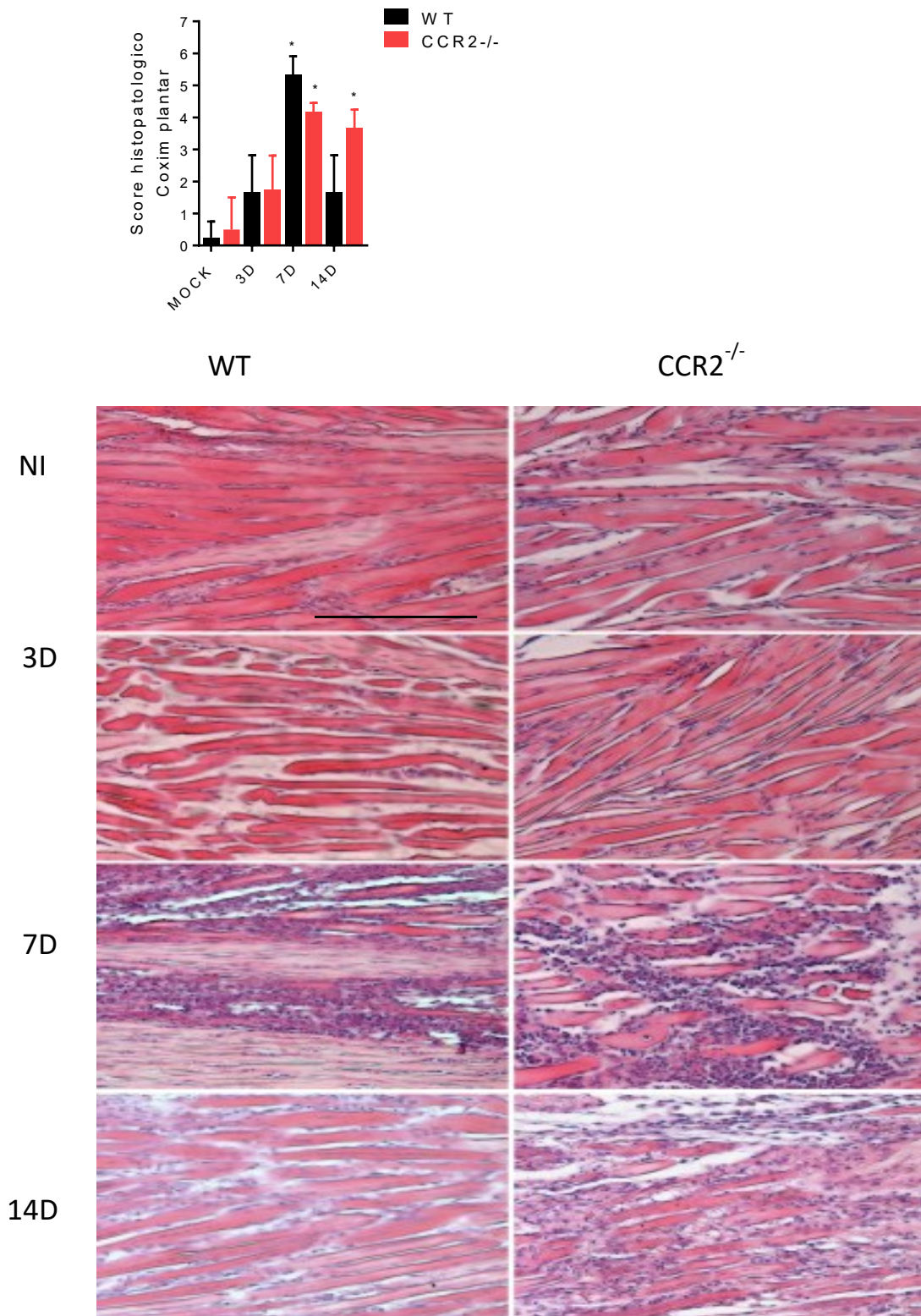
camundongos  $CCR2^{-/-}$  o aumento de CCL5 foi observado nos dias 7 e 14 pós infecção (Figura 27 C).



**Figura 27: A deleção genética de CCR2 causa alteração nas concentrações de MPO, CXCL-1 e CCL5.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV. A presença da enzima mieloperoxidase foi avaliada através de ensaio enzimático, os resultados são apresentados por níveis de absorbância (A). Níveis das quimiocinas CXCL1 (B) ou CCL5 (C) foram avaliados através de ensaio de ELISA em diversos tempos pós infecção na pata dos animais e os resultados são expressos em pg/100mg de tecido. Quantificação de vírus viável foi realizado através da técnica de lise de placa para pata, linfonodo, músculo, baço e sangue (D). MOCK= não infectado.  $n=5$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , \*\*\* $p=0,0001$ , \*\* $p<0,01$ , \* $p<0,05$  Vs MOCK, # Vs CHIKV, # Vs CHIKV, teste one-way ANOVA.

As observações histológicas demonstraram um pequeno infiltrado celular no dia 3 p.i. de forma semelhante para animais WT ou  $CCR2^{-/-}$  com um máximo de dano tecidual e infiltrado celular no dia 7 p.i., novamente sem diferença entre os grupos avaliados. No dia 14 p.i. os animais WT já apresentam uma diminuição considerável no dano observado enquanto os animais  $CCR2^{-/-}$  permanecem com um intenso infiltrado e perda de arquitetura tecidual (Figura 28). Uma análise gráfica representativa é apresentada utilizando uma pontuação 0-7 para intensidade de dano tecidual, para o gráfico podemos observar diferenças significativas nos dois grupos avaliados (WT e  $CCR2^{-/-}$ ) para o dia 7 p.i.. Para o dia 14 p.i. o grupo WT não apresenta diferença significativa quando comparado ao controle, enquanto animais  $CCR2^{-/-}$  continuam com o score aumentado nesse tempo (Figura 28).



**Figura 28: Na ausência de CCR2 é observado dano tecidual persistente no coxim plantar dos animais infectados pelo CHIKV.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6, foram infectados por via subcutânea com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV e a pata coletada nos tempos de 3, 7 e 14 dias pós infecção, além dos animais não infectados, para análises de histopatologia. À esquerda uma representação esquemática em prancha de cortes histológicos e à direita representação gráfica do score analisado. MOCK= não infectado. n=3-4 animais.

Nosso próximo passo foi verificar o papel do receptor CCR2 na recuperação viral de CHIKV na pata, linfonodo, músculo, baço e plasma sanguíneo, nos tempos de 1, 3, 7 e 14 dias pós infecção.

Podemos observar na tabela abaixo que houve recuperação de títulos virais nos tempos de 1, 3 e 7 dias pi na pata em animais WT e CCR2<sup>-/-</sup> com diferença no primeiro e sétimo dia, sendo que animais CCR2<sup>-/-</sup> apresentaram uma maior recuperação viral nestes tempos (Tabela 3). No linfonodo foi recuperado vírus nos tempos 1 e 3 pi sem diferença entre os animais WT e CCR2<sup>-/-</sup>. No músculo foi recuperado vírus nos tempos de 1 e 3 dias, sem diferenças significativas entre os grupos. No baço e plasma nos tempos avaliados para animais WT e CCR2 não foram recuperados carga viral significativa através desta técnica (Tabela 3). No tempo de 14 dias p.i. não foram recuperadas partículas virais em nenhum dos tecidos avaliados (dados não mostrados).

	Titulação (LOG CHIKV PFU)					
	1 d.p.i		3 d.p.i		7 d.p.i	
	WT	CCR2 <sup>-/-</sup>	WT	CCR2 <sup>-/-</sup>	WT	CCR2 <sup>-/-</sup>
Pata	6,58 ± 0,70	<b>7,57 ± 0,44</b> *	7,38 ± 0,46	7,35 ± 0,48	3,37 ± 0,62	<b>4,71 ± 0,73</b> *
Linfonodo poplíteo	3,54 ± 0,69	3,94 ± 0,78	3,88 ± 0,17	3,31 ± 0,52	nd	nd
Musculo	2,51 ± 0,71	2,66 ± 0,44	2,51 ± 0,71	nd	nd	nd
Baço	nd	nd	nd	2,13 ± 0,26	nd	nd
Sangue	nd	nd	nd	nd	nd	nd

**Tabela 3: A deleção genética de CCR2 induz aumento de vírus com 1 e 7 dias pós infecção.**

Camundongos de 3-4 semanas, machos, da linhagem C57BL/6 (WT) ou CCR2<sup>-/-</sup>, foram infectados por via subcutânea com 1x10<sup>6</sup> PFU de CHIKV. Análises de placa de lise e titulação viral foram utilizados para determinar o título viral. Quantificação de vírus viável foi realizado através da técnica de lise de placa para pata, linfonodo, músculo, baço e sangue. n= 5, \*p<0,05 Vs WT, Teste t de Student.

## 6. DISCUSSÃO

O vírus Chikungunya é considerado endêmico no Brasil, abrangendo todo o território nacional. A febre Chikungunya (FC) possui sinais semelhantes aos de outras arboviroses de importância clínica, como a dengue, com o diferencial de que o principal fator patogênomico associado a FC é uma artralgia debilitante que pode durar de meses a anos, o que a coloca como uma das arboviroses de maior importância clínica do país. Porém, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da artralgia causada pelo CHIKV, sendo necessários novos estudos, a fim de elucidar essa interação vírus-hospedeiro e identificar novos potenciais alvos terapêuticos para a doença. Neste trabalho investigamos potenciais mecanismos associados a gênese da dor durante a infecção pelo CHIKV, nossos principais achados foram associados a uma inflamação no DRG que persiste mesmo quando aparentemente a inflamação sistêmica está resolvida.

Em nosso laboratório padronizamos um modelo murino de infecção pelo CHIKV (MOREIRA, T. P. et al., 2022). Os resultados demonstraram que a infecção intraplantar pelo CHIKV induz hipernociceção mecânica prolongada em camundongos que mimetiza o que acontece em seres humanos. Com o modelo padronizado, foi possível testar diferentes estratégias para entender os mecanismos associados a dor prolongada. Um dos primeiros parâmetros avaliados neste trabalho foi a resposta inflamatória e para isso observamos que a resposta inflamatória sistêmica é caracterizada por um infiltrado de neutrófilos que é rapidamente substituído por um infiltrado de macrófagos, além de uma mudança de perfil celular no linfonodo com alteração da porcentagem para diversos marcadores de linfócitos e células dendríticas. Uma característica interessante do modelo é que o recrutamento celular está associado ao aumento de quimiocinas, incluindo CCL2, que pode estar relacionado ao infiltrado de macrófagos nos tecidos. A resposta inflamatória leva a dano tecidual caracterizado por um intenso infiltrado de células e perda de arquitetura tecidual transitória com pico no sétimo dia e um dano tecidual já resolvido no dia 14. De maneira interessante, alterações no perfil celular e na produção de mediadores inflamatórios tem pico no primeiro dia pós infecção e é detectada até o sétimo, ou

seja, o dano tecidual parece ser secundário a resposta inflamatória. O vírus é encontrado sistemicamente, incluindo tecidos como baço e fígado, porém no sétimo dia já não é encontrado mais em nenhum tecido, indicando um clearance eficiente das partículas viáveis. Estes dados estão de acordo com dados da literatura que mostram uma robusta resposta celular e molecular em resposta à infecção, caracterizada principalmente por infiltrado de monócitos, produção de CCL2 e TNF e vírus encontrado sistemicamente, porém apenas nos tempos iniciais (Gardner et al., 2010).

De maneira interessante e instigante, a resposta inflamatória induzida pelo CHIKV é rápida e autoresolutiva (dura cerca de 7 dias). Além disso, a inflamação parece ser eficiente uma vez que a recuperação de vírus em vários tecidos só é observada em tempos iniciais pós infecção. Dessa maneira, surge a pergunta: se não há mais inflamação e se não há mais partícula viral detectável, por que a dor é persistente? Sabe-se que o DRG é um importante tecido na gênese da dor, uma vez que estímulos periféricos podem gerar alterações no ambiente do DRG, resultando em amplificação ou cronificação de um sinal doloroso (Esposito et al., 2019). Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho visa entender os mecanismos que ocorrem no DRG e que contribui para a dor persistente induzida por CHIKV.

De forma interessante alguns trabalhos relatam a presença de RNA viral nas articulações de pacientes mesmo meses após infecção (Hoarau et al., 2010). Alguns estudos também detectaram a presença de IgM específico de forma persistente em pacientes após infecção pelo CHIKV (Borgherini et al., 2008; Hoarau et al., 2010). Em um modelo utilizando camundongos o RNA viral também foi detectado em tecidos associados a articulação por até 16 semanas (Hawman et al., 2013). No modelo de infecção utilizado neste trabalho não observamos partículas viáveis de forma persistente nos tecidos avaliados. Além disso, não foram detectadas partículas de vírus viável no DRG, porém conseguimos detectar a presença de RNA viral neste tecido no primeiro dia pós infecção.

Pelo nosso conhecimento, até então, nenhum trabalho havia demonstrado a presença do vírus no DRG. A não recuperação de vírus viável no DRG pode estar relacionada a limitações técnicas como limite de detecção associada ao ensaio de placa de lise e titulação viral ou mesmo a dificuldade de processamento do tecido,

uma vez que o DRG é um tecido pequeno, de outra forma a presença de RNA viral no DRG pode estar associada a presença de antígenos em células inflamatórias. Para entender o impacto do vírus diretamente neste tecido realizamos a injeção do vírus CHIKV de forma intratecal. Diferente do esperado não observamos aumento na hipernocicepção mecânica, o que indica que uma replicação e/ou sensibilização periférica pode ser necessária para os mecanismos de dor associados a infecção pelo CHIKV. Neste sentido uma limitação metodológica talvez seja o caso, uma vez que o vírus injetado de forma intratecal pode ter gerado uma sensibilização não necessariamente associada a hipernocicepção mecânica que era nosso foco neste momento.

Ainda não está claro se a presença de RNA viral está associada a chegada do vírus no tecido por via sistêmica ou se células inflamatórias como o macrófago podem ter carregado antígenos virais para o tecido induzindo um estado inflamatório no DRG. Uma vez que foi demonstrado para modelos de infecção pelo CHIKV que macrófagos e monócitos inflamatórios podem ser reservatório de partículas virais, mesmo por longos períodos pós infecção (Labadie et al., 2010). Além disso nossos dados demonstram aumento de CCR2, um marcador associado a macrófagos inflamatórios e que normalmente não é encontrado no DRG em condições basais, alguns estudos ainda associam o aumento de CCR2 a chegada de monócitos neste tecido (Zigmond & Echevarria, 2019). Além da presença do CCR2, também observamos um aumento de leucócitos e alteração de perfil de macrófagos neste tecido.

Após a replicação viral, danos às células e tecidos podem ocorrer diretamente através da elaboração de produtos virais citotóxicos ou indiretamente através da indução de respostas imunes prejudiciais do hospedeiro. Desta forma uma outra estratégia que utilizamos para avaliar o impacto do vírus na hipernocicepção foi através do tratamento com um antiviral clinicamente aprovado para o tratamento da hepatite C e com atividade demonstrada para CHIKV, o Sofosbuvir (Ferreira et al., 2019). O tratamento com Sofosbuvir não foi capaz de diminuir de forma permanente a dor associada a infecção, seja pelo tratamento sistêmico ou pelo tratamento intratecal. Este dado sugere que a replicação associada ao CHIKV pode não ser um fator determinante associado a indução de dor persistente. De forma interessante Lentscher et al., (2020) demonstrou que a restrição da replicação do CHIKV no



músculo esquelético resultou na diminuição da indução de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF em camundongos, sendo que IL-1 $\beta$  e IL-6 são biomarcadores de doença grave de CHIKV em humanos (Lentscher et al., 2020).

Como a presença do vírus no DRG não parece ser uma condição necessária para a hipernocicepcao prolongada, nosso próximo passo foi caracterizar a resposta inflamatória no DRG, gerada após infecção pelo CHIKV. Após lesão de neurônios sensoriais primários levando a dor neuropática, mediadores inflamatórios produzidos por células de Schwann e células gliais dentro do DRG são liberados, incluindo eicosanoides, bradicininas, serotonina, neurotrofinas, citocinas como as interleucinas, TNF (Sweitzer et al., 2001) e quimiocinas (White et al., 2007). As células gliais possuem receptores para quimiocinas e citocinas entre outros podendo receber sinais de outras células e sensibilizar neurônios no DRG (Hanani, 2005), indicando que elas participam ativamente do processo de transmissão de informações dentro do DRG. Durante inflamação aguda pode haver liberação de IL-1 $\beta$  que medeia a indução de COX-2, por células no DRG, levando à liberação de prostanoídes, que sensibilizam os terminais nociceptores periféricos e produzem hipersensibilidade localizada à dor (Samad et al., 2001). De forma interessante observamos aumento de leucócitos em tempos iniciais e tardios (14 dias), e de citocinas como CCL2, TNF e COX-2 no DRG.

COX-2 está intimamente relacionada com a indução de dor inflamatória, uma vez que induz a produção de prostaglandinas levando a sensibilização direta dos neurônios nociceptores. A produção de COX-2 é induzida principalmente por citocinas como TNF e IL1 $\beta$  e está associada a células inflamatórias, como macrófagos e monócitos. A presença de COX-2 no DRG indica a presença de um ambiente inflamatório nociceptivo. Em nosso estudo já publicado (Moreira et al., 2022) demonstramos que animais deficientes para o receptor de TNF ou tratados com Etanercept, um inibidor de TNF, apresentam uma diminuição quase completa da hipernocicepção, quando tratados em tempos iniciais de forma sistêmica ou em tempos tardios com tratamento intratecal. De forma interessante COX-2 foi encontrada aumentada apenas no dia 1 p.i. enquanto TNF apenas em tempos mais tardios, neste contexto a COX-2 poderia estar sendo induzida por CCL2 outro componente inflamatório que pode levar a produção de COX-2 via ligação ao receptor CCR2 (Pflucke et al., 2013).

Outro mediador que tem sido exaustivamente demonstrado como indutor da ativação de COX é a citocina IL1 $\beta$ . Um estudo prévio demonstra que há ativação do inflamassoma NLRP3, que medeia a ativação de caspase-1 e secreção de IL1 $\beta$ , em células PBMCs isoladas de pacientes infectados com CHIKV, e que o tratamento com um inibidor de NLRP3 (mcc950) em camundongos diminuiu a inflamação, perda óssea e miosite além de diminuir citocinas como CCL2, TNF e IL6 (Chen et al., 2017). No nosso modelo há aumento de IL1 $\beta$  na pata 1 dia após a infecção, entretanto não detectamos aumento de IL1 $\beta$  no sangue e no DRG, o que sugere que o estímulo para produção de COX-2 seja independente da produção de IL1 $\beta$ . Como discutido anteriormente o TNF tem importante papel nesse sistema, além disso, de maneira muito interessante demonstramos um aumento de CCL2 no DRG o que está de acordo com estudo prévio que demonstra que CCL2 também foi encontrado aumentado no cérebro de camundongos infectados com CHIKV (Sharma & Jain, 2018). De fato, Pflucke et al., (2013) demonstra CCL2 como capaz de induzir COX-2.

O papel de CCR2 está associado à função e recrutamento dos monócitos, devido à sua alta expressão nestas células durante o processo inflamatório. Além disso, trabalhos tem sugerido um papel chave para monócitos/macrófagos tanto no desenvolvimento de artrite causada por CHIKV quanto na permanência do vírus no hospedeiro, o que poderia desencadear a resposta crônica (Gardner et al., 2010; Hoarau et al., 2010; Labadie et al., 2010; Morrison et al., 2011). Estudos em camundongos usando o inibidor de CCL2, bindarit, sugeriram que monócitos ou macrófagos são essenciais durante infecções por alfavírus artritogênicos. Foi observado que a inibição de CCL2 através do tratamento com bindarit contribuiu para a redução da gravidade da doença em camundongos infectados pelo vírus RRV ou CHIKV (Chen et al., 2015). De acordo, a doença músculoesquelética induzida por CHIKV foi mais grave em camundongos CCR2<sup>-/-</sup> (Poo, Nakaya, et al., 2014), que mostraram um recrutamento diminuído de monócitos e aumento no recrutamento de neutrófilos para tecidos, sugerindo que os monócitos podem proteger o hospedeiro do desenvolvimento das formas mais graves da doença induzida pelo CHIKV. Em conjunto os dados acima indicam um papel importante dos monócitos durante a patogênese de infecções artritogênicas por alfavírus.

Neste trabalho, a ausência do receptor CCR2 foi associada a um maior recrutamento de neutrófilos e produção aumentada de CXCL1, uma quimiocina importante no recrutamento de neutrófilos. Estes achados estão associados a um maior dano histopatológico observado nos animais CCR2<sup>-/-</sup> no sítio da infecção (coxim plantar) no dia 14 p.i.. De maneira interessante, no dia 7 p.i, os camundongos CCR2<sup>-/-</sup> apresentaram escore de lesão similar ao observado nos camundongos WT, porém a resolução da resposta em camundongos deficientes parece ser mais lenta, pois enquanto camundongos WT tem escore com retorno ao nível basal com 14 dias, camundongos CCR2<sup>-/-</sup> permanecem com aumento de escore neste tempo. Estes achados podem ter relação com a deficiência no recrutamento de monócitos nas fases iniciais da doença, visto que macrófagos são essenciais no processo de resolução da inflamação (Murray & Wynn, 2011). De acordo com os achados, S. P. Yee e colaboradores, 2014, utilizando animais CCR2<sup>-/-</sup> em modelo de infecção por CHIKV observaram um perfil semelhante, sem alterações na carga viral e com um erosivo infiltrado de neutrófilos, que foi associado à artrite prolongada. Apesar da resposta inflamatória exacerbada e aparentemente com falhas na resolução, foi observado, nos grupos de camundongos CCR2<sup>-/-</sup> uma hipernocicepção diminuída quando comparado a grupos de animais WT. Na literatura, pouco se discute sobre os mecanismos associados a gênese da dor causada pelo CHIKV, e o papel dos receptores CCR2<sup>-/-</sup> e suas quimiocinas ligantes na hipernocicepção induzida pelo CHIKV ainda permanece por ser elucidado. Sabe-se que a resposta dolorosa está direta ou indiretamente relacionada à resposta inflamatória, visto que a migração de leucócitos associados à inflamação é responsável por secretar mediadores que podem levar a estímulos dolorosos (Baral et al., 2019). Além disso, citocinas pró-inflamatórias que participam do processo nócico podem ter origem em células imunológicas, neuronais e gliais (microglia e astrócitos), tanto no sistema nervoso periférico quanto no central, e essas moléculas podem desencadear efeitos como por exemplo hiperexcitabilidade crônica e alterações em nociceptores, além de processamento anormal dos sinais nócicos e exacerbção dos processos de dor (Watkins & Maier, 2002). Algumas quimiocinas e seus receptores têm sido associadas a este processo, entre elas CCL2/CCR2. Trabalhos na literatura mostram que o aumento da expressão de CCL2 ou CCR2 foi relacionado a modelos de dor neuropática (Wu et al., 2018), dor inflamatória e osteoartrite (Harth & Nielson, 2019). No gânglio da raiz dorsal CCL2 pode agir estimulando os neurônios nociceptivos primários por processo autócrino

e/ou parácrino. Além disso, CCL2 sintetizada no gânglio da raiz dorsal é deslocada para o corno dorsal da medula, onde altera a atividade de neurônios pós-sinápticos e células gliais, facilitando a transmissão nóxica (Bhangoo et al., 2007).

Em conclusão, com este trabalho, conseguimos aprofundar no entendimento da participação de alguns componentes envolvidos na gênese e manutenção da hipernocicepção frente a infecção pelo CHIKV. Conseguimos caracterizar uma resposta inflamatória prolongada no DRG associada a presença de RNA viral em tempos iniciais e com importante participação de células CCR2<sup>+</sup>. A presença de resposta inflamatória no DRG em dias tardios nos leva a acreditar que um estímulo recorrente neste tecido estaria levando a um nicho inflamatório responsável por levar a sensibilização persistente de neurônios sensitivos. A inflamação inicial gerada na extremidade periférica provavelmente é importante no sentido de deflagrar uma resposta inflamatória com sensibilização de nociceptores que seriam intensificados pela presença de RNA viral no DRG. De forma geral podemos dizer que a dor causada pelo CHIKV é complexa e envolve componentes do sistema imune, sensibilização periférica e atividade inflamatória no DRG. Neste sentido, este trabalho traz uma contribuição para a literatura de possíveis mecanismos associados a gênese e manutenção da dor causada pela infecção pelo CHIKV.

## REFERÊNCIAS

- Abbadie, C., Lindia, J. A., Cumiskey, A. M., Peterson, L. B., Mudgett, J. S., Bayne, E. K., DeMartino, J. A., MacIntyre, D. E., & Forrest, M. J. (2003). Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(13), 7947-7952. <https://doi.org/10.1073/pnas.1331358100>
- Abbasi, M., Mousavi, M. J., Jamalzehi, S., Alimohammadi, R., Bezvan, M. H., Mohammadi, H., & Aslani, S. (2019). Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol*, *234*(7), 10018-10031. <https://doi.org/10.1002/jcp.27860>
- Abdelnabi, R., Neyts, J., & Delang, L. (2015). Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral Res*, *121*, 59-68. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.017>
- Baral, P., Udit, S., & Chiu, I. M. (2019). Pain and immunity: implications for host defence. *Nat Rev Immunol*, *19*(7), 433-447. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0147-2>
- Bhangoo, S., Ren, D., Miller, R. J., Henry, K. J., Lineswala, J., Hamdouchi, C., Li, B., Monahan, P. E., Chan, D. M., Ripsch, M. S., & White, F. A. (2007). Delayed functional expression of neuronal chemokine receptors following focal nerve demyelination in the rat: a mechanism for the development of chronic sensitization of peripheral nociceptors. *Mol Pain*, *3*, 38. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-3-38>
- Binshtok, A. M., Wang, H., Zimmermann, K., Amaya, F., Vardeh, D., Shi, L., Brenner, G. J., Ji, R. R., Bean, B. P., Woolf, C. J., & Samad, T. A. (2008). Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J Neurosci*, *28*(52), 14062-14073. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3795-08.2008>
- Borgherini, G., Poubeau, P., Jossaume, A., Goux, A., Cotte, L., Michault, A., Arvin-Berod, C., & Paganin, F. (2008). Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. *Clin Infect Dis*, *47*(4), 469-475. <https://doi.org/10.1086/590003>
- Burt, F. J., Chen, W., Miner, J. J., Lenschow, D. J., Merits, A., Schnettler, E., Kohl, A., Rudd, P. A., Taylor, A., Herrero, L. J., Zaid, A., Ng, L. F. P., & Mahalingam, S. (2017). Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis*, *17*(4), e107-e117. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30385-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30385-1)
- Caglioti, C., Lalle, E., Castilletti, C., Carletti, F., Capobianchi, M. R., & Bordini, L. (2013). Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol*, *36*(3), 211-227. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23912863>
- Chen, W., Foo, S. S., Taylor, A., Lulla, A., Merits, A., Hueston, L., Forwood, M. R., Walsh, N. C., Sims, N. A., Herrero, L. J., & Mahalingam, S. (2015). Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein synthesis, protects against bone loss

induced by chikungunya virus infection. *J Virol*, 89(1), 581-593.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02034-14>

Chen, W., Foo, S. S., Zaid, A., Teng, T. S., Herrero, L. J., Wolf, S., Tharmarajah, K., Vu, L. D., van Vreden, C., Taylor, A., Freitas, J. R., Li, R. W., Woodruff, T. M., Gordon, R., Ojcius, D. M., Nakaya, H. I., Kanneganti, T. D., O'Neill, L. A. J., Robertson, A. A. B., . . . Mahalingam, S. (2017). Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. *Nat Microbiol*, 2(10), 1435-1445. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0015-4>

Chow, A., Her, Z., Ong, E. K., Chen, J. M., Dimatatac, F., Kwek, D. J., Barkham, T., Yang, H., Renia, L., Leo, Y. S., & Ng, L. F. (2011). Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Infect Dis*, 203(2), 149-157.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiq042>

Cui, L. Y., Chu, S. F., & Chen, N. H. (2020). The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*, 83, 106314.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106314>

Cunha, R. V. D., & Trinta, K. S. (2017). Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(8), 523-531.  
<https://doi.org/10.1590/0074-02760170044>

Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Vivancos, G. G., Moreira, I. F., Reis, S., Parada, C. A., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz J Med Biol Res*, 37(3), 401-407. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000300018>

Dupuis-Maguiraga, L., Noret, M., Brun, S., Le Grand, R., Gras, G., & Roques, P. (2012). Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(3), e1446.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001446>

Ebbinghaus, M., Uhlig, B., Richter, F., von Banchet, G. S., Gajda, M., Brauer, R., & Schaible, H. G. (2012). The role of interleukin-1beta in arthritic pain: main involvement in thermal, but not mechanical, hyperalgesia in rat antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 64(12), 3897-3907. <https://doi.org/10.1002/art.34675>

Esposito, M. F., Malayil, R., Hanes, M., & Deer, T. (2019). Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Med*, 20(Suppl 1), S23-S30. <https://doi.org/10.1093/pm/pnz012>

Ferreira, A. C., Reis, P. A., de Freitas, C. S., Sacramento, C. Q., Villas Boas Hoelz, L., Bastos, M. M., Mattos, M., Rocha, N., Gomes de Azevedo Quintanilha, I., da Silva Gouveia Pedrosa, C., Rocha Quintino Souza, L., Correia Loiola, E., Trindade, P., Rangel Vieira, Y., Barbosa-Lima, G., de Castro Faria Neto, H. C., Boechat, N., Rehen, S. K., Bruning, K., . . . Souza, T. M. L. (2019). Beyond Members of the Flaviviridae Family, Sofosbuvir Also Inhibits Chikungunya Virus Replication. *Antimicrob Agents Chemother*, 63(2). <https://doi.org/10.1128/AAC.01389-18>

- Ferreira, S. H., Lorenzetti, B. B., Bristow, A. F., & Poole, S. (1988). Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334(6184), 698-700. <https://doi.org/10.1038/334698a0>
- Gardner, J., Anraku, I., Le, T. T., Larcher, T., Major, L., Roques, P., Schroder, W. A., Higgs, S., & Suhrbier, A. (2010). Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. *J Virol*, 84(16), 8021-8032. <https://doi.org/10.1128/JVI.02603-09>
- Gerardin, P., Fianu, A., Malvy, D., Mussard, C., Boussaid, K., Rollot, O., Michault, A., Gauzere, B. A., Breart, G., & Favier, F. (2011). Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. *BMC Med*, 9, 5. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-5>
- Hakim, M. S., & Aman, A. T. (2022). Understanding the Biology and Immune Pathogenesis of Chikungunya Virus Infection for Diagnostic and Vaccine Development. *Viruses*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/v15010048>
- Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev*, 48(3), 457-476. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>
- Harth, M., & Nielson, W. R. (2019). Pain and affective distress in arthritis: relationship to immunity and inflammation. *Expert Rev Clin Immunol*, 15(5), 541-552. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2019.1573675>
- Hawman, D. W., Stoermer, K. A., Montgomery, S. A., Pal, P., Oko, L., Diamond, M. S., & Morrison, T. E. (2013). Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. *J Virol*, 87(24), 13878-13888. <https://doi.org/10.1128/JVI.02666-13>
- Hoarau, J. J., Jaffar Bandjee, M. C., Krejbich Trotot, P., Das, T., Li-Pat-Yuen, G., Dassa, B., Denizot, M., Guichard, E., Ribera, A., Henni, T., Tallet, F., Moiton, M. P., Gauzere, B. A., Bruniquet, S., Jaffar Bandjee, Z., Morbidelli, P., Martigny, G., Jolivet, M., Gay, F., . . . Gasque, P. (2010). Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. *J Immunol*, 184(10), 5914-5927. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900255>
- Hoorweg, T. E., van Duijl-Richter, M. K. S., Ayala Nunez, N. V., Albuлесcu, I. C., van Hemert, M. J., & Smit, J. M. (2016). Dynamics of Chikungunya Virus Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. *J Virol*, 90(9), 4745-4756. <https://doi.org/10.1128/JVI.03184-15>
- Hussain, K. M., Lee, R. C., Ng, M. M., & Chu, J. J. (2016). Establishment of a Novel Primary Human Skeletal Myoblast Cellular Model for Chikungunya Virus Infection and Pathogenesis. *Sci Rep*, 6, 21406. <https://doi.org/10.1038/srep21406>
- Jiang, B. C., Liu, T., & Gao, Y. J. (2020). Chemokines in chronic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, 212, 107581. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107581>
- Kidd, B. L., Langford, R. M., & Wodehouse, T. (2007). Arthritis and pain. Current approaches in the treatment of arthritic pain. *Arthritis Res Ther*, 9(3), 214. <https://doi.org/10.1186/ar2147>

- Kiguchi, N., Kobayashi, Y., Maeda, T., Saika, F., & Kishioka, S. (2010). CC-chemokine MIP-1alpha in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosci Lett*, *484*(1), 17-21. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.07.085>
- Komiya, H., Takeuchi, H., Ogawa, Y., Hatooka, Y., Takahashi, K., Katsumoto, A., Kubota, S., Nakamura, H., Kunii, M., Tada, M., Doi, H., & Tanaka, F. (2020). CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice. *Mol Brain*, *13*(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00607-3>
- Krames, E. S. (2014). The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain. *Pain Med*, *15*(10), 1669-1685. <https://doi.org/10.1111/pme.12413>
- Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., Guigand, L., Dubreil, L., Lebon, P., Verrier, B., de Lamballerie, X., Suhrbier, A., Cherel, Y., Le Grand, R., & Roques, P. (2010). Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest*, *120*(3), 894-906. <https://doi.org/10.1172/JCI40104>
- Lentscher, A. J., McCarthy, M. K., May, N. A., Davenport, B. J., Montgomery, S. A., Raghunathan, K., McAllister, N., Silva, L. A., Morrison, T. E., & Dermody, T. S. (2020). Chikungunya virus replication in skeletal muscle cells is required for disease development. *J Clin Invest*, *130*(3), 1466-1478. <https://doi.org/10.1172/JCI129893>
- Liu, J. A., Yu, J., & Cheung, C. W. (2021). Immune Actions on the Peripheral Nervous System in Pain. *Int J Mol Sci*, *22*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms22031448>
- Liu, X. J., Zhang, Y., Liu, T., Xu, Z. Z., Park, C. K., Berta, T., Jiang, D., & Ji, R. R. (2014). Nociceptive neurons regulate innate and adaptive immunity and neuropathic pain through MyD88 adapter. *Cell Res*, *24*(11), 1374-1377. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.106>
- Ma, S. B., Xian, H., Wu, W. B., Ma, S. Y., Liu, Y. K., Liang, Y. T., Guo, H., Kang, J. J., Liu, Y. Y., Zhang, H., Wu, S. X., Luo, C., & Xie, R. G. (2020). CCL2 facilitates spinal synaptic transmission and pain via interaction with presynaptic CCR2 in spinal nociceptor terminals. *Mol Brain*, *13*(1), 161. <https://doi.org/10.1186/s13041-020-00701-6>
- Matsuda, M., Huh, Y., & Ji, R. R. (2019). Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. *J Anesth*, *33*(1), 131-139. <https://doi.org/10.1007/s00540-018-2579-4>
- Milligan, E. D., & Watkins, L. R. (2009). Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*, *10*(1), 23-36. <https://doi.org/10.1038/nrn2533>
- Moreira, T. P., Sousa, C. D. F., Melo Costa, V. R., Queiroz-Junior, C. M., Santos, F. M., Bonilha, C. S., Esper, L. M., Nogueira, M. L., Cunha, T. M., Teixeira, M. M., Costa, V. V., & de Souza, D. D. G. (2022). Tumour necrosis factor plays a deleterious role in the pathogenesis of chikungunya virus infection. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/imm.13583>



- Morrison, T. E., Oko, L., Montgomery, S. A., Whitmore, A. C., Lotstein, A. R., Gunn, B. M., Elmore, S. A., & Heise, M. T. (2011). A mouse model of chikungunya virus-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. *Am J Pathol*, *178*(1), 32-40.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.018>
- Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*, *11*(11), 723-737.  
<https://doi.org/10.1038/nri3073>
- Ng, L. F. P. (2017). Immunopathology of Chikungunya Virus Infection: Lessons Learned from Patients and Animal Models. *Annu Rev Virol*, *4*(1), 413-427.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041808>
- Njoo, C., Heini, C., & Kuner, R. (2014). In vivo SiRNA transfection and gene knockdown in spinal cord via rapid noninvasive lumbar intrathecal injections in mice. *J Vis Exp*(85). <https://doi.org/10.3791/51229>
- Pflucke, D., Hackel, D., Mousa, S. A., Partheil, A., Neumann, A., Brack, A., & Rittner, H. L. (2013). The molecular link between C-C-chemokine ligand 2-induced leukocyte recruitment and hyperalgesia. *J Pain*, *14*(9), 897-910.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.02.012>
- Pinho-Ribeiro, F. A., Verri, W. A., Jr., & Chiu, I. M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol*, *38*(1), 5-19.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- Poo, Y. S., Nakaya, H., Gardner, J., Larcher, T., Schroder, W. A., Le, T. T., Major, L. D., & Suhrbier, A. (2014). CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. *J Virol*, *88*(12), 6862-6872.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.03364-13>
- Poo, Y. S., Rudd, P. A., Gardner, J., Wilson, J. A., Larcher, T., Colle, M. A., Le, T. T., Nakaya, H. I., Warrilow, D., Allcock, R., Bielefeldt-Ohmann, H., Schroder, W. A., Khromykh, A. A., Lopez, J. A., & Suhrbier, A. (2014). Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*, *8*(12), e3354. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003354>
- Renault, P., Solet, J. L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., Filleul, L., Lassalle, C., Thiria, J., Rachou, E., de Valk, H., Ilef, D., Ledrans, M., Quatresous, I., Quenel, P., & Pierre, V. (2007). A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg*, *77*(4), 727-731.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17978079>
- Rohatgi, A., Corbo, J. C., Monte, K., Higgs, S., Vanlandingham, D. L., Kardon, G., & Lenschow, D. J. (2014). Infection of myofibers contributes to increased pathogenicity during infection with an epidemic strain of chikungunya virus. *J Virol*, *88*(5), 2414-2425. <https://doi.org/10.1128/JVI.02716-13>
- Rulli, N. E., Rolph, M. S., Srikiatkachorn, A., Anantapreecha, S., Guglielmotti, A., & Mahalingam, S. (2011). Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute chikungunya virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic

protein-1 synthesis. *J Infect Dis*, 204(7), 1026-1030.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jir470>

Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., Bonventre, J. V., & Woolf, C. J. (2001). Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410(6827), 471-475. <https://doi.org/10.1038/35068566>

Schilte, C., Staikowsky, F., Couderc, T., Madec, Y., Carpentier, F., Kassab, S., Albert, M. L., Lecuit, M., & Michault, A. (2013). Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(3), e2137. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002137>

Schwameis, M., Buchtele, N., Wadowski, P. P., Schoergenhofer, C., & Jilma, B. (2016). Chikungunya vaccines in development. *Hum Vaccin Immunother*, 12(3), 716-731. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1101197>

Sharma, S. K., & Jain, S. (2018). Chikungunya: A rheumatologist's perspective. *Int J Rheum Dis*, 21(3), 584-601. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13273>

Soden, M., Vasudevan, H., Roberts, B., Coelen, R., Hamlin, G., Vasudevan, S., & La Brooy, J. (2000). Detection of viral ribonucleic acid and histologic analysis of inflamed synovium in Ross River virus infection. *Arthritis Rheum*, 43(2), 365-369.  
[https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200002\)43:2<365::AID-ANR16>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200002)43:2<365::AID-ANR16>3.0.CO;2-E)

Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*, 393(2), 183-197.  
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.024>

Sourisseau, M., Schilte, C., Casartelli, N., Trouillet, C., Guivel-Benhassine, F., Rudnicka, D., Sol-Foulon, N., Le Roux, K., Prevost, M. C., Fsihi, H., Frenkiel, M. P., Blanchet, F., Afonso, P. V., Ceccaldi, P. E., Ozden, S., Gessain, A., Schuffenecker, I., Verhasselt, B., Zamborlini, A., . . . Schwartz, O. (2007). Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS Pathog*, 3(6), e89.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030089>

Souza, G. R., Cunha, T. M., Silva, R. L., Lotufo, C. M., Verri, W. A., Jr., Funez, M. I., Villarreal, C. F., Talbot, J., Sousa, L. P., Parada, C. A., Cunha, F. Q., & Ferreira, S. H. (2015). Involvement of nuclear factor kappa B in the maintenance of persistent inflammatory hypernociception. *Pharmacol Biochem Behav*, 134, 49-56.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.04.005>

Suhrbier, A., & Mahalingam, S. (2009). The immunobiology of viral arthritides. *Pharmacol Ther*, 124(3), 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.09.005>

Sweitzer, S., Martin, D., & DeLeo, J. A. (2001). Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, 103(2), 529-539.  
[https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(00\)00574-1](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(00)00574-1)

Teng, T. S., Kam, Y. W., Lee, B., Hapuarachchi, H. C., Wimal, A., Ng, L. C., & Ng, L. F. (2015). A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute

- Chikungunya Virus Infection. *J Infect Dis*, 211(12), 1925-1935.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiv049>
- Tran, P. B., & Miller, R. J. (2003). Chemokine receptors: signposts to brain development and disease. *Nat Rev Neurosci*, 4(6), 444-455.  
<https://doi.org/10.1038/nrn1116>
- Vairo, F., Haider, N., Kock, R., Ntoumi, F., Ippolito, G., & Zumla, A. (2019). Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*, 33(4), 1003-1025.  
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.006>
- Wahid, B., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2017). Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis*, 58, 69-76.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.03.006>
- Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2002). Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev*, 82(4), 981-1011.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2002>
- Watson, A. E. S., Goodkey, K., Footz, T., & Voronova, A. (2020). Regulation of CNS precursor function by neuronal chemokines. *Neurosci Lett*, 715, 134533.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134533>
- White, F. A., Bhangoo, S. K., & Miller, R. J. (2005). Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 4(10), 834-844.  
<https://doi.org/10.1038/nrd1852>
- White, F. A., Jung, H., & Miller, R. J. (2007). Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(51), 20151-20158.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0709250104>
- Wood, J. N., Boorman, J. P., Okuse, K., & Baker, M. D. (2004). Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol*, 61(1), 55-71.  
<https://doi.org/10.1002/neu.20094>
- Wu, X. B., Jing, P. B., Zhang, Z. J., Cao, D. L., Gao, M. H., Jiang, B. C., & Gao, Y. J. (2018). Chemokine receptor CCR2 contributes to neuropathic pain and the associated depression via increasing NR2B-mediated currents in both D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in the nucleus accumbens shell. *Neuropsychopharmacology*, 43(11), 2320-2330.  
<https://doi.org/10.1038/s41386-018-0115-8>
- Zeller, H., Van Bortel, W., & Sudre, B. (2016). Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013-2014. *J Infect Dis*, 214(suppl 5), S436-S440. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw391>
- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., Rimkunas, R., Fong, R. H., Lin, H., Poddar, S., Crowe, J. E., Jr., Doranz, B. J., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 557(7706), 570-574. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0121-3>
- Zhu, X., Cao, S., Zhu, M. D., Liu, J. Q., Chen, J. J., & Gao, Y. J. (2014). Contribution of chemokine CCL2/CCR2 signaling in the dorsal root ganglion and spinal cord to the

maintenance of neuropathic pain in a rat model of lumbar disc herniation. *J Pain*, 15(5), 516-526. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2014.01.492>

Zigmond, R. E., & Echevarria, F. D. (2019). Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Prog Neurobiol*, 173, 102-121. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.12.001>