

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Carla Daiane Ferreira de Sousa

PAPEL DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINA CCR2 E CCR5 NA  
PATOGENESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA

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 Litwinski

Belo Horizonte

Fevereiro, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Carla Daiane Ferreira de Sousa

PAPEL DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINA CCR2 E CCR5 NA  
PATOGENESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA

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

Belo Horizonte

Fevereiro, 2019

- 043      Sousa, Carla Daiane Ferreira de.  
            Papel dos receptores de quimiocina CCR2 e CCR5 na patogênese da infecção pelo vírus Chikungunya [manuscrito] / Carla Daiane Ferreira de Sousa. – 2019.
- 80 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dra. Daniele da Gloria de Souza. Co-orientadora: Vivian Vasconcelos Costa Litwinski.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Vírus Chikungunya. 3. Quimiocinas. 4. Inflamação. I. Souza, Daniele da Gloria de. II. Litwinski, Vivian Vasconcelos Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CARLA DAIANE FERREIRA DE SOUSA  
Nº REGISTRO: 2017662032

Às 14 horas do dia 25 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Vanessa Pinho (UFMG), Daiane Boff (UFMG) e a Profa. Daniele da Glória de Souza - Orientadora, para julgar o trabalho final "PAPEL DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINA CCR2 E CCR5 NA PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA", da aluna, **Carla Daiane Ferreira de Sousa**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2019.

Dra. Vanessa Pinho

*Vanessa Pinho da Silva*

Dra. Daiane Boff

*Daiane Boff*

Profa. Daniele da Glória de Souza (Orientadora)

*Danielle da Glória de Souza*

*Flávio Guimarães da Fonseca*  
Prof. Flávio Guimarães da Fonseca  
Coordenador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer minha família por todo apoio ao longo dessa trajetória. Agradeço a minha mãe, por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer situação e pai por sempre acreditar em mim e me apoiar e ajudar em cada decisão. Agradeço aos dois por serem meus exemplos de força e determinação.

Agradeço, à Prof. Danielle (Dani) e a Prof. Vivian (Vivi), minhas orientadoras, por me acolher nessa família linda do LIMHO, agradeço toda confiança e apoio. Vocês são exemplos a serem seguidos. Obrigada pelos sorrisos, pelas críticas, pelo apoio e por acreditar em mim.

À todos da família Viviridae, que sempre estão dispostos a ajudar, sempre prestativos e pacientes, em especial a chefinha, Vivi, por sempre ser tão disponível, por todo aprendizado e oportunidades.

À Thai e Fran por serem minhas parceiras inseparáveis, por sempre serem tão prestativas, pelos bons papos e horas de trabalho, que se tornam mais leve com sua presença.

A todos do LIMHO por todos os momentos que compartilhamos, vocês são parte essencial deste trabalho. Em especial aos amigos do Sassarico, Brenda, Camila, Fran, Gabi, Ian, Jojo, Micheli, Rafa, Thai, Thales e Vidy por todo companheirismo, carinho e apoio nos momentos difíceis.

Ao Guilherme por se fazer sempre presente e pelos puxões de orelha e ajuda inestimável na formatação e revisão deste trabalho.

Às companheiras de república, Flávia e Jô, pelas conversas, carinho, paciência e amizade.

Aos colegas e professores do grupo Imunofar, muito obrigada pela ajuda em diversos momentos e pelo convívio durante a realização deste trabalho.

Às queridas Ingedy, Gil, Frank, Ilma e Rose por possibilitarem um ambiente de trabalho adequado e por sempre serem tão solícitas a nos ajudar.

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

## RESUMO

A febre Chikungunya é uma doença viral que tem como agente etiológico o Chikungunya virus (CHIKV) e é transmitida, principalmente, por mosquitos do gênero *Aedes*, como *Aedes aegypti* e *A. albopictus*. A doença causada pelo CHIKV apresenta sinais e sintomas semelhantes aos de outras arboviroses de importância clínica, como a dengue, porém, o principal fator patognomônico que a difere das demais arboviroses é a artralgia debilitante e persistente, que pode durar de meses a anos e está associada à perda de qualidade de vida dos indivíduos acometidos e elevado impacto econômico nos sistemas públicos de saúde. Por fim, não existe tratamento específico ou vacina disponível contra a febre Chikungunya (CHIKF), além de os mecanismos envolvidos na patogênese da artralgia induzida pelo CHIKV serem pouco conhecidos. Recentemente, durante a padronização do modelo experimental de infecção pelo CHIKV feita em nosso laboratório, foi observado que a inoculação do CHIKV em camundongos selvagens (WT) induziu diversos sinais e sintomas associados à infecção vista em humanos, a exemplo da hipernocicepção articular e o aumento expressivo de algumas quimiocinas relacionadas ao recrutamento de macrófagos e linfócitos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar o papel dos receptores de quimiocina do tipo CC (CCR2 e CCR5) na patogênese da infecção pelo CHIKV *in vitro* e *in vivo*. Para isso, foram utilizados camundongos WT da linhagem C57BL/6 e deficientes para os receptores CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>) e CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>). O perfil de expressão desses receptores em diferentes tipos celulares, assim como de suas quimiocinas ligantes (CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5) e diversos parâmetros clínicos e inflamatórios normalmente associados à doença em humanos foram avaliados. Utilizando análises de citometria de fluxo foi observado o aumento da expressão dos receptores CCR2 e CCR5 após infecção pelo CHIKV predominantemente em macrófagos (células F4/80<sup>+</sup>) e linfócitos (CD3<sup>+</sup>). Nos camundongos WT foram observados linfopenia, aumento das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 na pata e recuperação de carga viral na pata, baço e linfonodo poplíteo, além de dano tecidual e hipernocicepção articular prolongada. Na ausência do receptor CCR2 foi encontrado um maior nível das

quimiocinas citadas, assim como um aumento de infiltrado de neutrófilos no coxim plantar e dano tecidual prolongado. Nos camundongos CCR5<sup>-/-</sup> também foi observado um maior nível de quimiocinas e aumento de infiltrado de neutrófilos no coxim plantar, além de maior recuperação viral em tempos iniciais pós-infecção. Em contrapartida, a hipernocicepção observada nos grupos de animais CCR2<sup>-/-</sup> ou CCR5<sup>-/-</sup> foi apenas nos tempos iniciais, enquanto em animais selvagens continua por até 21 dias. Por fim, estudos *in vitro* demonstraram que o vírus foi capaz de infectar macrófagos de camundongos WT e deficientes para os receptores CCR2 e CCR5, sem toxicidade às células, demonstrado pelos ensaios de MTT e LDH. As células de camundongos deficientes para CCR2 ou CCR5 apresentaram menor carga viral recuperada, diferente do que foi observado em experimentos *in vivo*. Neste contexto, este trabalho reforça a importância dos macrófagos e linfócitos no controle da doença causada pelo CHIKV, uma vez que são as principais células afetadas pela ausência dos receptores CCR2 e CCR5, além de demonstrar que os receptores estudados parecem ser importantes na montagem da resposta imune apropriada, para combater o vírus e resolver a inflamação. Estes receptores interferem, ainda, direta ou indiretamente em mecanismos associados a hipernocicepção induzida pela infecção pelo CHIKV.

**Palavras-Chave:** *Chikungunya virus*; quimiocinas; inflamação.



## ABSTRACT

Chikungunya fever (CHIKF) is a viral disease that has the etiological agent known as Chikungunya virus (CHIKV) and it is transmitted mainly by the mosquitoes of the *Aedes* genus. The disease caused by the CHIKV shows signs and symptoms similar to other arboviral diseases that have clinical significance, such as the dengue fever. However, the main pathognomonic factor that differs CHIKF from other arboviral diseases is the debilitating and persistent arthralgia that can last for months or even years and the mechanisms involved in the pathogenesis of CHIKV-induced arthralgia are poorly understood. Recently, during standardization of the experimental model of CHIKV infection done in our laboratory, we observed that the inoculation of CHIKV on wild type mice (WT) induced several signs and symptoms associated with the infection that is normally seen in humans, such as the articular hypernociception and expressive increase of some chemokines related to the recruitment of macrophages and lymphocytes. Thereby, the aim of this work was to study the role of the chemokine type CC receptors (CCR2 and CCR5) in the pathogenesis of CHIKV in vitro and in vivo infection. To do so, WT mice of the C57BL/6 lineage were used along with and knockouts for CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>) and CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>) receptors. The expression profile of these receptors in different cell types, as well as their binding chemokines (CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5), in addition to several clinical and inflammatory parameters normally associated with the disease in humans, were evaluated. Flow cytometry analyses showed increased expression of CCR2 and CCR5 receptors after the CHIKV infection predominantly in macrophages (F4/80<sup>+</sup> cells) and lymphocytes (CD3<sup>+</sup>). On the WT mice, several signs of the disease along with inflammation were observed, such as: lymphopenia, increased CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5 chemokines and recovery of the viral load in several tissues, in addition to tissue damage and prolonged articular hypernociception. However, in the absence of the CCR2 and CCR5 receptors, the inflammation was more exacerbated, since in these groups a higher level of chemokines was found, as well as an increased neutrophil infiltrate and prolonged tissue damage in CCR2<sup>-/-</sup>

<sup>-/-</sup> mice. In the CCR5<sup>-/-</sup> mice, in addition to the mentioned findings, a higher viral recovery was also observed in initial post-infection time. However, the hypernociception observed in the groups of knockout animals happened only in the initial time with respect to the CCR2<sup>-/-</sup>, or nonexistent, in the CCR5<sup>-/-</sup> mice. In vitro studies also demonstrated that the virus was able to infect macrophages derived from WT mice and knockouts to the CCR2 and CCR5 receptors, but without toxicity to the cells. Interestingly, cells derived from CCR2<sup>-/-</sup> or CCR5<sup>-/-</sup> mice showed lower recovered viral load. As a final point, this work reinforces the importance of macrophages and lymphocytes in the control of the disease caused by CHIKV, since they are the main cells affected by the absence of the CCR2 and CCR5 receptors, besides demonstrating that the receptors studied seem to be important in the assembly of the appropriate immune response for fighting the virus and resolving the inflammation process. These receptors also interfere directly or indirectly in mechanisms associated with the hypernociception induced by the CHIKV infection.

**Key-words:** Chikungunya virus; chemokines; inflammation.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**A .*Aegypti*** – *Aedes Aegypti*

**A. *Albopictus*** – *Aedes Albopictus*

**C** – Proteína do capsídeo

**CCL**- Quimiocina CC Ligante

**CCR**- Receptor de quimiocina de motivo C-C

**CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais

**CHIKF** – *Chikungunya fever* – Febre Chikungunya

**CHIKV** – *Chikungunya virus*

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

**CXCL** – Quimiocina CXC Ligante

**DAG**- Diacilglicerol

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

**DENV** – *Dengue virus*

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**E1-E2** – Glicoproteínas transmembrana envelope 1 – envelope 2

**ECSA** – *East/Central/South African genotype*

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

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

**EPM** – Erro Padrão da Média

**FAMERP** - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

**FGF**- Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico

**GM-CSF** – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* - 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** – *Hexadecyltrimethylammonium Bromide* – Brometo de hexadeciltrimetilamônio

**Ig** – Imunoglobulinas

**IP3**- Inositol trifosfato

**i.pl.** – Intraplantar

**IFN** – Interferon

**IL** – *Interleukin* – *Interleucina*

**IOL** – *Indian Ocean Lineage*

**LNP** – Linfonodo poplíteo

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

**MPO** – Mieloperoxidase

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

**NI** – Não infectados

**NK** – *Natural Killer*

**nsP1-nsP4** – Proteínas não- estruturais 1-4

**OD** – *Optical Density* – Densidade ótica

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

**OPG** – *Osteoprotegerin* – *Osteoprotegerina*

**p.i.** – Pós-infecção.

**PI3K $\gamma$** - Fosfatidilinositol-3-quinase gama

**PKC**- Proteína cinase C

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

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

**PLC  $\beta$** - Fosfolipase C  $\beta$

**PMN** – Polimorfonuclear

**RNA**- Ribonucleic acid

**RRV** –*Ross River Virus*

**SFB** - *Serum Fetal Bovine* – *Soro fetal bovin*

**TBEV**- Tick-borne Encephalitis Virus

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**UFMG** – Universidade Federal de Minas Gerais

**WNV**- West Nile Virus

**WT** – *Wild Type* – Animais selvagens

**ZIKV**

–

*Zika*

*virus*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura conformacional e genômica do CHIKV. ....	20
Figura 2: Ciclo de multiplicação do vírus Chikungunya. ....	22
Figura 3: Disseminação do vírus Chikungunya no hospedeiro. ....	25
Figura 4: Representação esquemática dos receptores de quimiocinas e das vias de transdução de sinais ativadas pela ligação da quimiocina. ....	25
Figura 5: Esquema representativo dos experimentos <i>in vivo</i> .....	2833
Figura 6: Estratégia para análise de células CCR2 <sup>+</sup> ou CCR5 <sup>+</sup> ..	47
Figura 7: Estratégia para análise de leucócitos CCR2 <sup>+</sup> ou CCR5 <sup>+</sup> .....	369
Figura 8: Esquema representativo dos experimentos <i>in vitro</i> . ....	42
Figura 9: Níveis de CCL2 durante cinética de infecção por CHIKV .....	42
Figura 10: Expressão do receptor CCR2 em leucócitos do linfonodo e baço durante cinética de infecção pelo CHIKV em camundongos WT. ....	455
Figura 11: Expressão de CCR2 em leucócitos do linfonodo e baço durante cinética de infecção por CHIKV em camundongos WT. ....	486
Figura 12: Avaliação da hipernocicepção articular inflamatória em animais WT e CCR2 <sup>-/-</sup> .....	497
Figura 13: Carga viral viável recuperada após infecção por CHIKV em camundongos WT e CCR2 <sup>-/-</sup> .....	618
Figura 14: Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos durante a infecção pelo CHIKV em camundongos WT e CCR2 <sup>-/-</sup> .....	5050
Figura 15: Avaliação de MPO e NAG durante infecção por CHIKV em camundongos WT e CCR2 <sup>-/-</sup> .....	5151
Figura 16: Produção de CXCL-1 e CXCL-2 no coxim plantar de animais pós infecção por CHIKV .....	532
Figura 17: Produção de CCL3 e CCL5 em coxim plantar de animais WT e CCR2 <sup>-/-</sup> infectados por CHIKV. ....	543
Figura 18: Score e imagens representativas da análise histopatológica após infecção por CHIKV. ....	553
Figura 19: Produção de IL-6 e TNF- $\alpha$ no coxim plantar de animais WT e CCR2 <sup>-/-</sup> infectados por CHIKV. ....	565

Figura 20: Viabilidade e carga viral em macrófagos de cultura primária de animais WT e CCR2 <sup>-/-</sup> ..	576
Figura 21: Níveis de CCL3 e CCL5 durante cinética de infecção por CHIKV	587
Figura 22: Expressão de CCR5 em leucócitos do linfonodo e baço durante cinética de infecção por CHIKV.....	628
Figura 23: Avaliação da hipernociceção articular inflamatória em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> .....	639
Figura 24: Carga viral viável após infecção pelo CHIKV em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> .....	6460
Figura 25: Contagem total e diferencial de células sanguíneas em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> após infecção pelo CHIKV.....	61
Figura 26: Níveis de MPO e NAG em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> .....	662
Figura 27: Níveis de CXCL-1 e CXCL-2 em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> .....	663
Figura 28: Níveis de CCL2 e CCL3 em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> após infecção pelo CHIKV.....	673
Figura 29: Escore e imagens representativas da análise histopatológica após infecção por CHIKV em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> .....	684
Figura 30: Níveis de IL-6 e TNF $\alpha$ em animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> após infecção pelo CHIKV .....	595
Figura 31: Viabilidade celular e carga viral em macrófagos de cultura primária de animais WT e CCR5 <sup>-/-</sup> .....	66



## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
1.1. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV).....	19
1.2. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL .....	20
1.3. A FEBRE CHIKUNGUNYA (CHIKF) .....	23
1.3.1. Infecção e Manifestações Clínicas .....	23
1.3.2. Imunopatogênese .....	24
1.4. QUIMIOCINA E SEUS RECEPTORES.....	26
1.4.1. Quimiocinas .....	26
1.4.2. CCR2/CCR5 e a Febre Chikungunya .....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>34</b>
4.1. ANIMAIS .....	34
4.2. VÍRUS E CÉLULAS.....	34
4.3. PROPAGAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO CHIKV.....	35
4.4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....	35
4.5. DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL .....	36
4.6. MEDIDA DA HIPERNOCICEPÇÃO ARTICULAR INFLAMATÓRIA....	38
4.7. ANÁLISE HEMATOLÓGICA .....	38
4.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ...	39
4.9. AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS CELULARES E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR2 e CCR5 .....	40
4.10. DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS (MPO).....	42
4.11. DETECÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS (NAG).....	43
4.12. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	44
4.13. CULTURA PRIMÁRIA DE MACRÓFAGOS DE MEDULA ÓSSEA .....	44

4.13.1.	Viabilidade Celular .....	45
4.13.2.	Análise Estatística .....	46
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
5.1.	PAPEL DO RECEPTOR CCR2 FRENTE A INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA.....	47
5.1.1.	Perfil de quimiocinas e receptor.....	47
5.1.2.	Medida de hipernocicepção .....	49
5.1.3.	Carga viral .....	50
5.1.4.	Contagem de leucócitos no sangue.....	52
5.1.5.	Ensaio enzimático para detecção indireta de neutrófilo e macrófago.....	53
5.1.6.	Níveis de quimiocinas em camundongos wt e CCR2 <sup>-/-</sup> .....	55
5.1.7.	Análise histopatológica da pata .....	56
5.1.8.	Níveis de citocina IL-6 e TNF .....	57
5.1.9.	Cultura primária .....	58
5.2.	PAPEL DO RECEPTOR CCR5 FRENTE A INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA.....	59
5.2.1.	Perfil de quimiocinas e receptor.....	59
5.2.2.	Medida de hipernocicepção .....	61
5.2.3.	Carga viral .....	62
5.2.4.	Contagem de leucócitos no sangue.....	63
5.2.5.	Ensaio enzimático para detecção indireta de neutrófilo e macrófago.....	64
5.2.6.	Níveis de quimiocinas em camundongos wt e CCR5 <sup>-/-</sup> .....	65
5.2.7.	Análise histopatológica da pata .....	67
5.2.8.	Níveis de citocina il-6 e tnf.....	68
5.2.9.	Cultura primária .....	68
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO DO VÍRUS CHIKUNGUNYA (CHIKV)

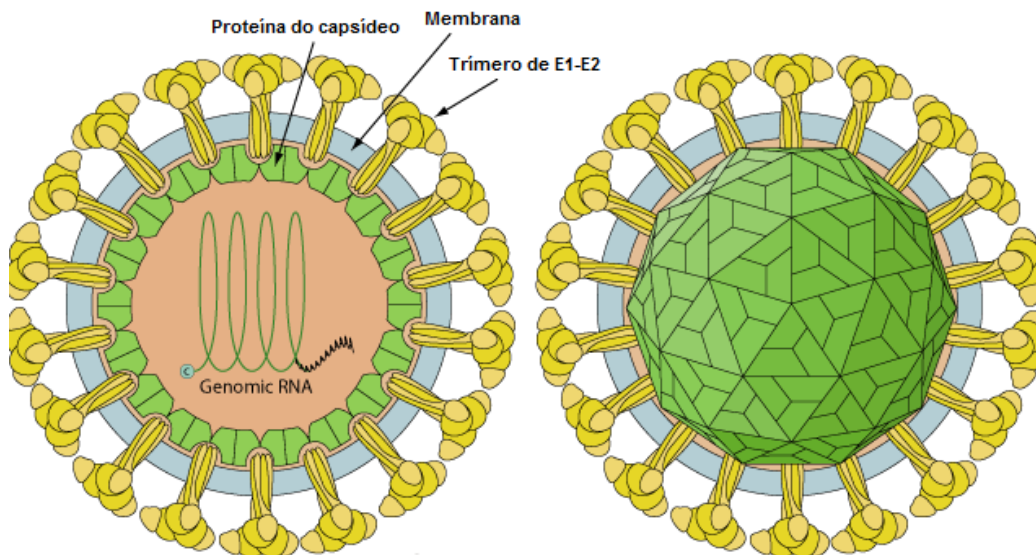
Os primeiros relatos da febre chikungunya (CHIKF) foram descritos na Tanzânia por volta de 1952, onde ocorreu um surto de doença exantemática com sintomas que incluíam febre alta e poliartralgia altamente debilitante. A população local nomeou a doença de “chikungunya”, palavra de origem do dialeto Africano Makonde, cujo significado é derivado da expressão “aquele que se curva” e se refere à postura inclinada de indivíduos acometidos pela doença (BURT, F. J. et al., 2017). Este surto foi então seguido por novas epidemias ainda no território africano bem como em vários países do mundo. Por exemplo, um surto ocorrido no Kenya em 2004 resultou em quase meio milhão de casos de CHIKF e na disseminação do vírus para regiões próximas, como as ilhas de Comoros e *La Reunion* em 2005 (RENAULT, P. et al., 2007). Um dos maiores surtos de CHIKF ocorreu na Índia, em 2005, onde 1,4 milhões de pessoas foram infectadas (BURT, F. J. et al., 2017). Em 2013, foram confirmados os primeiros casos da infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV) nas Américas, na ilha de St. Martin, seguido por casos no Caribe e na América Latina no ano de 2015. Atualmente o vírus tem sido reportado em 42 países, incluindo territórios no Caribe, América Central e América do Norte, com mais de um milhão de casos suspeitos e 25.000 casos confirmados nestas regiões (WAHID, B. et al., 2017).

No Brasil, o primeiro caso autóctone de CHIKF foi descrito em 2014 no Amapá. Desde então o CHIKV se expandiu para todo o território nacional. Em 2015 foram confirmados 13.236 casos da doença, a maioria ocorrendo na Região Nordeste, incluindo cidades em 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).

## 1.2. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA PARTÍCULA VIRAL

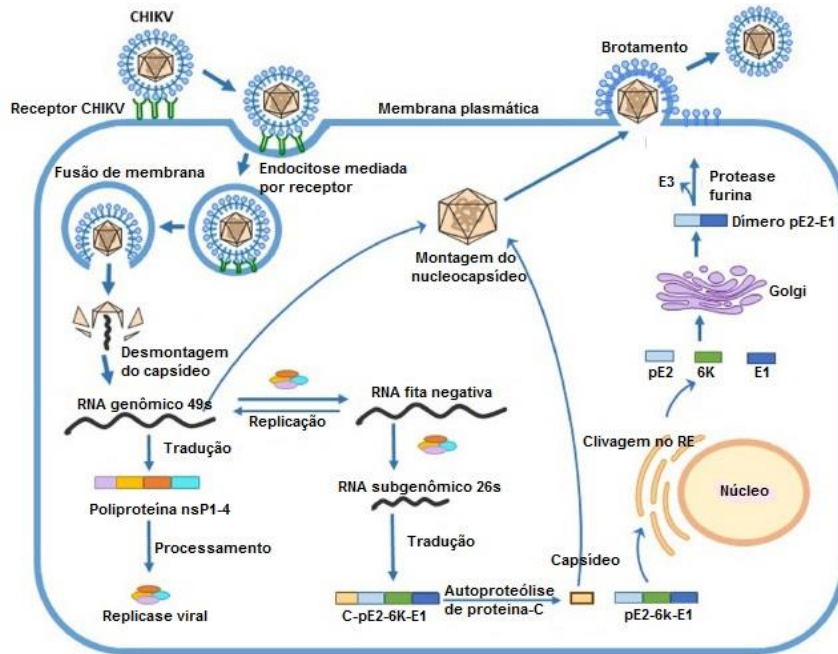
O CHIKV é um arbovírus do gênero *Alphavirus* pertencente à família *Togaviridae*. O vírion, envelopado e com estrutura icosaédrica, apresenta 70nm de diâmetro e é composto por unidades repetidas de glicoproteínas transmembrana (E1 e E2), a proteína do capsídeo e uma bicamada lipídica. O genoma é de 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 de 1 a 4 (nsP1-4) e cinco proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E1) (SCHWARTZ, O. e ALBERT, M. L., 2010; BURT, F. J. et al., 2017). A Figura 1 mostra uma representação esquemática da estrutura da partícula viral.



**Figura 1: Representação esquemática da estrutura conformacional e genômica do CHIKV.**

A imagem mostra a estrutura icosaédrica do vírion, a qual é composta por três proteínas estruturais, sendo elas as proteínas do envelope (E1 e E2) e a proteína do capsídeo (C). As proteínas E1 e E2 formam tríades de glicoproteínas, em forma de espigas, ancoradas a membrana que cobrem a superfície viral. (Fonte: Adaptado de WEAVER & LECUIT, 2015; Swiss Institute of Bioinformatics, viralZone, 2017)

O ciclo de multiplicação do CHIKV (Figura 2) tem início após sua inoculação intradérmica pela picada da fêmea do mosquito vetor, geralmente do gênero *Aedes* nos centros urbanos, e sua adsorção na célula alvo pelo processo de endocitose mediada por receptor. Ainda não existe um consenso de qual é o receptor principal envolvido na internalização do CHIKV, entretanto, alguns receptores são sugeridos e 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 (SCHWARTZ, O. e ALBERT, M. L., 2010; HOORNWEG, T. E., et al., 2016). 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 seguida, dois precursores de proteínas não estruturais (nsPs) são traduzidos a partir do RNA mensageiro (mRNA) viral e a clivagem destes precursores resultam 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. O RNA sintetizado serve como modelo para a síntese de RNA subgenômicos (26S) e genômicos (49S). O RNA subgenômico tem papel na expressão do precursor da poliproteína C-pE2-6K-E1. Após liberação do capsídeo (C), as glicoproteínas pE2 e E1 são formadas e exportadas para a membrana plasmática, onde a pE2 é clivada em E2 e E3, as quais 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 pelo recrutamento das glicoproteínas de envelope associadas à membrana (SCHWARTZ, O. e ALBERT, M. L., 2010). As novas partículas virais deixam a célula pelo processo de brotamento através da membrana celular onde os vírions adquirem o envelope de bicamada lipídica contendo as glicoproteínas E1 e E2 codificadas pelo vírus (SOLIGNAT, M et al., 2009; SILVA, L. A., et al., 2017).



**Figura 2: Ciclo de multiplicação do vírus Chikungunya.**

Por meio do processo de endocitose mediada por receptor, o CHIKV é adsorvido pela célula alvo. Em seguida, o ambiente ácido no interior do endossoma desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, levando à liberação do genoma viral no citoplasma. Esse, por sua vez, é traduzido em proteínas virais não estruturais (nsP1-4). Após o processamento, o complexo de proteínas não estruturais forma a replicase viral, a qual catalisa a síntese de uma cadeia de RNA de sentido negativo 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).

De acordo com análises filogenéticas, até o momento existem quatro linhagens do CHIKV identificadas, as quais apresentam características genóticas e antigênicas distintas e únicas. São elas: (1) O genótipo do Oeste Africano que consiste em isolados do Senegal e da Nigéria. (2) O genótipo do Leste/Centro/Sul Africano (ECSA), outro genótipo enzoótico encontrado na África. (3) Isolados de países da Ásia que estão incluídos no genótipo Asiático e, finalmente, (4) o genótipo mais recente, uma Linhagem do Oceano Índico (IOL), o qual se propagou das ilhas Comores em 2004 e resultou em epidemias graves no sudeste asiático e na Índia durante os anos 2005-2008 (GALÁN- HUERTA et al., 2015; WAHID et al., 2017).

### 1.3. A FEBRE CHIKUNGUNYA (CHIKF)

#### 1.3.1. INFEÇÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A transmissão do vírus é causada pela picada da fêmea de um mosquito infectado, principalmente os mosquitos do gênero *Aedes* (ZELLER; VAN BORTEL; SUDRE, 2016), através de dois ciclos distintos, o silvático e urbano. Durante o ciclo silvático ou enzoótico, comum principalmente na África em áreas de florestas ou savanas, o vírus é transmitido por várias espécies do *Aedes* (*A. africanus*, *A. Cordellieri*, *A. furcicdcter-taylori*, *A. Luteocephalus*, entre outros) a primatas não humanos (macacos), os quais se apresentam como reservatório primário do vírus (NG, L. C. & HAPUARACHCHI, 2010). A infecção do homem pode ocorrer quando ele adentra estes ambientes selvagens dando início ao ciclo urbano. Esse, por sua vez, envolve duas espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, o *A. aegypti* e o *A. albopictus* que quando infectados podem transmitir o vírus ao homem (GALÁN- HUERTA et al., 2015).

A febre chikungunya (CHIKF), é uma doença febril exantemática aguda com sinais e sintomas similares com os relatados para outras arboviroses de importância médica, a exemplo da dengue, Zika e febre amarela. Dentre os sintomas, são observados febre alta de início agudo, dores articulares e musculares, cefaleia, náusea, fadiga e exantema generalizado. A principal manifestação clínica que a difere das outras arboviroses são as fortes e persistentes dores 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 (GALÁN- HUERTA et al., 2015).

A fase aguda da CHIKF tem início logo após o período de incubação, que pode durar de 3 a 7 dias no ser humano, e tem duração de até quatorze dias (BURT, F. J. et al., 2017). Febre alta (>39°C), calafrio, cefaleia, náusea, vômito, fadiga, erupções cutâneas eritematosas e maculopapulares, dor nas costas, mialgia e poliartralgia simétrica são apresentadas na fase aguda, 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 (Ministério da saúde, 2017). Entretanto, após a fase aguda, cerca de 30% das pessoas evoluem com dores articulares persistentes com duração de até três meses, fase subaguda, e quando a duração dos sintomas ultrapassa os três meses a condição é considerada crônica, podendo prolongar-se por anos, comprometendo a qualidade de vida do paciente (BURT, F. J. et al., 2017).

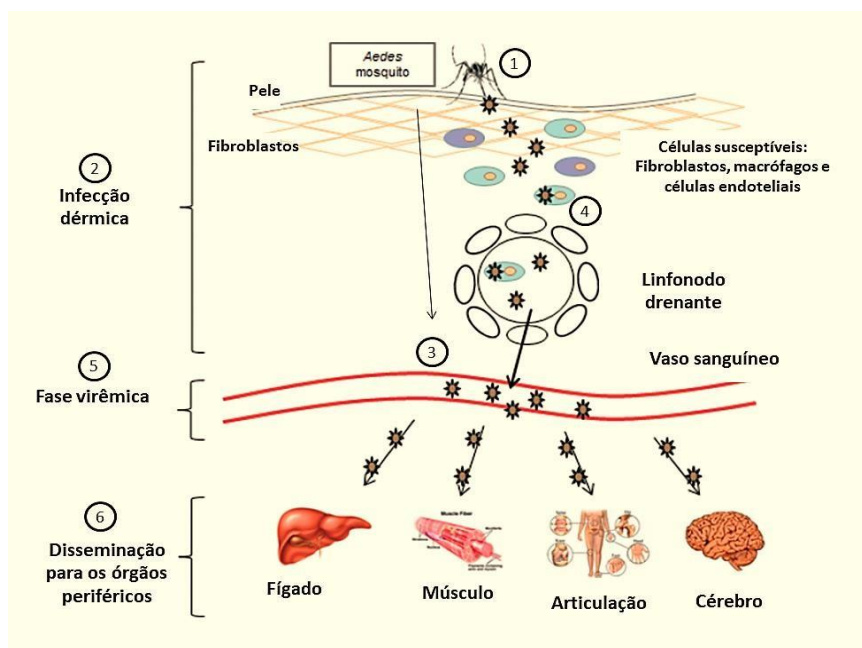
A artralgia causada pelo CHIKV afeta as extremidades, principalmente as articulações dos tornozelos, punhos e falanges (CASTRO, A. P. C. R, et al., 2016). Algumas manifestações clínicas podem variar de acordo com sexo ou idade, sendo que casos graves e óbitos ocorrem principalmente em pessoas com extremos de idade (crianças e idosos) ou apresentando comorbidades. As manifestações graves incluem doença gastrointestinal, complicações neurológicas (meningoencefalite e convulsões), complicações oftalmológicas (conjuntivite, retinite e uveíte), doenças cardiovasculares, manifestações hemorrágicas e morte (GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A, 2016; ROHATGI et al., 2014). O aumento no número de complicações da doença se deve a diversos fatores, dentre eles a ocorrência de surtos em grande escala, normalmente associados a melhor adaptação viral aos vetores artrópodes urbanos e outra causa são novas mutações das linhagens de CHIKV circulantes que aumentam sua virulência e patogenicidade (SCHWAMEIS et al., 2016).

### 1.3.2. IMUNOPATOGENESE

A infecção pelo CHIKV ocorre a partir da picada da fêmea do mosquito infectado, que inocula o vírus na pele do hospedeiro. 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 3) (CUNHA, R. V.; TRINTA, K. S, 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 satélite, neurônios e células da glia. Fibroblastos e macrófagos da pele foram identificados como sendo células alvo primárias da



infecção pelo CHIKV (fase de inoculação intradérmica) (SOURISSEAU, M., et al., 2007). Essa fase é seguida pela fase de replicação linfática onde ocorre a migração de células infectadas para os gânglios linfáticos drenantes e posteriormente sua disseminação na corrente sanguínea (fase de viremia), com posterior disseminação para outros órgãos, envolvendo outros tipos celulares como os hepatócitos, as células musculares esqueléticas e as células articulares (SCHWAMEIS, M., et al., 2016). Em um modelo de infecção em primatas não humanos foi demonstrada a ocorrência de infecção persistente de tecidos hepáticos, bem como níveis significativos de morte celular de hepatócitos (HUSSAIN, K. M., et al., 2016).



**Figura 3: 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 é acompanhada pela produção de níveis elevados de diversos mediadores inflamatórios no soro dos pacientes a exemplo das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas pirogênicas contribuem para a febre presente na fase aguda da doença (HOARAU, J. J. et al., 2010). Entretanto, estudos demonstraram que diferentes coortes de pacientes exibem padrões de mediadores inflamatórios distintos, sugerindo que os níveis basais desses mediadores diferem

entre as populações. Na tentativa de encontrar padrões comuns às diversas populações, uma metanálise comparativa demonstrou que as citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-2, IL-2R, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17 e IL-18; 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) formam uma assinatura genérica da infecção aguda por CHIKV em todas as coortes de pacientes analisadas (TENG, T. S., et al., 2015; NG, L. F. P., 2017).

Nos primeiros dias de infecção, células Natural Killer (NK) são ativadas e induzem uma resposta secundária de linfócitos do tipo T CD4+ e CD8+ contra várias proteínas virais (HOARAU, J. et al., 2013). Os linfócitos T desempenham um importante papel durante a infecção viral, sendo as células T do tipo T CD4+ e CD8+ necessárias para eliminar células infectadas por vírus em camundongos (NG, L. F. P., 2017). As células do tipo T CD4+ aparecem na fase tardia da doença e auxiliam na estimulação de células produtoras de imunoglobulinas (Igs) específicas contra o vírus (NG, L. F. P., 2017). O fim da fase aguda é caracterizado pela produção dos mediadores inflamatórios tais como o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), as quimiocinas CCL4 e CXCL12 e as interleucinas IL-6 e IL-8.

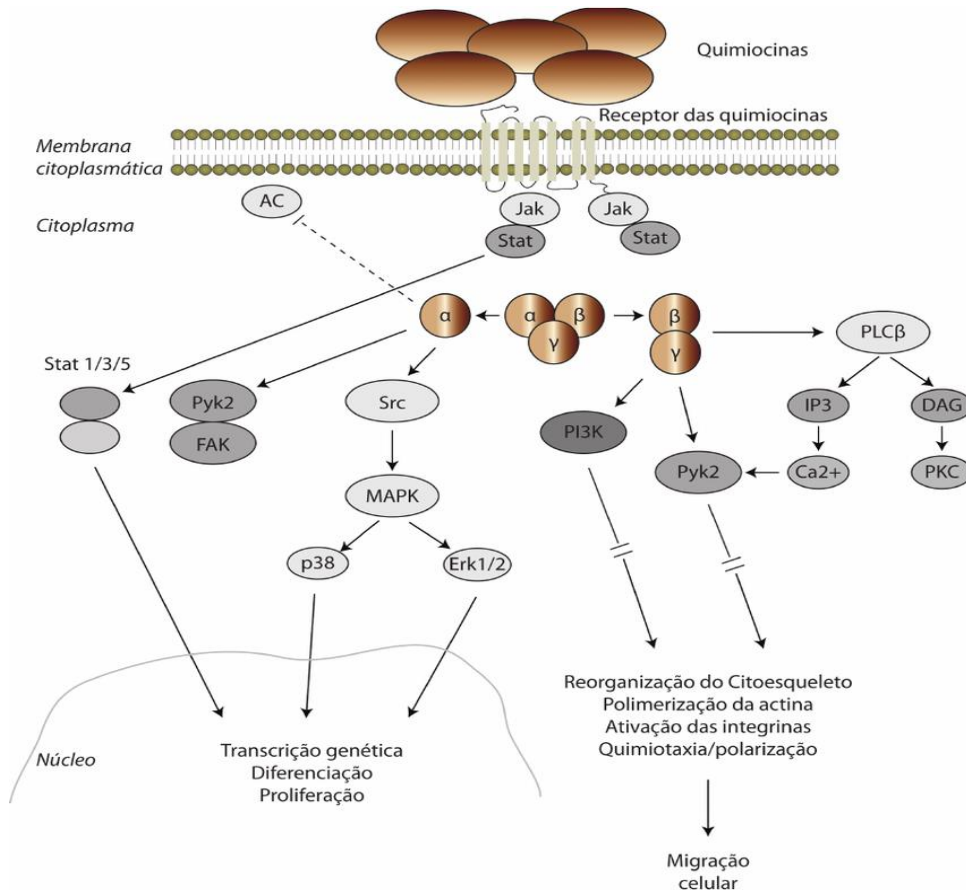
#### 1.4. QUIMIOCINA E SEUS RECEPTORES

##### 1.4.1. QUIMIOCINAS

As quimiocinas possuem importante papel para o recrutamento de leucócitos para o tecido alvo. As quimiocinas são pequenas proteínas com função quimiotática, que também desempenham papéis associados ao desenvolvimento de tecidos, a angiogênese, homeostase epitelial, além de vários processos fisiopatológicos. Elas exercem seus efeitos através da ligação a receptores de membrana específicos acoplados a proteína G (GPCRs) (GUERREIRO, R. et al., 2011). Os GPCRs são constituídos por sete domínios transmembrana (**Erro! Fonte de referência não**

**encontrada.)** e são expressos principalmente em leucócitos. Atualmente, os receptores de quimiocina são classificados em quatro subfamílias, nomeadas de acordo com a estrutura do seu ligante. Essa classificação leva em consideração os resíduos conservados de cisteína localizados na porção N-terminal. Dessa forma são consideradas: 1) quimiocinas C-C, quando duas cisteínas estão adjacentes; 2) C-X-C, CX3C e XC, quando a ou as cisteínas são separadas por um ou mais aminoácidos quaisquer, representado pela letra X. Seus receptores seguem, então, a mesma nomenclatura, sendo nomeados como receptores de quimiocina de motivo C-C (CCR), C-X-C (CXCR), C-3X-C (CX3CR) e XC (XCR), além dos receptores de quimiocina atípicos, incluindo ACKR1-ACKR6 (PALOMINO, D. C.; MARTI, L. C., 2015; CHEN, K., et al., 2017).

A ligação da quimiocina ao receptor específico desencadeia a ativação de uma série de vias de sinalização intracelular, levando a transcrição de genes que controlam processos de migração celular. Os GPCRs normalmente são regulados por processos que envolvem a fosforilação pela proteína quinase associada à proteína G (GRK), essa proteína possui as subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que quando ativadas se dissociam em  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$ . A dissociação da proteína G ativa várias vias de transdução de sinal. A subunidade  $G\alpha$  inibe a adenilciclase e ativa as tirosina cinases Scr, levando à ativação das MAP cinases, enquanto  $G\beta\gamma$  induz a ativação da fosfolipase C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ), conduzindo à formação de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que estimulam, respectivamente, a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ativação da PKC induz uma cascata de eventos que vão levar a quimiotaxia.  $G\beta\gamma$  também induz a ativação de PI3 cinase que ativa moléculas efetoras envolvidas no rearranjo do citosqueleto, auxiliando na adesão e migração celular (OPPERMANN, M., 2004). Por fim alguns receptores de quimiocinas também podem se homodimerizar ou heterodimerizar com outros GPCRs, podendo sinalizar via proteínas JAK-STAT como exemplificado na Figura 4 (ZWEEMER, A. J., et al., 2014).



**Figura 4: Representação esquemática dos receptores de quimiocinas e das vias de transdução de sinais ativadas pela ligação da quimiocina.**

A ligação do ligante muda a estrutura conformacional do receptor e leva à dissociação das subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$  da proteína G. Esta dissociação induz a ativação de diferentes vias de transdução de sinal. A subunidade  $G\alpha$  inibe a adenilato ciclase e ativa as tirosina quinases Src, levando à ativação das MAP quinases e PI3 quinase, assim como de quinases de adesão. A subunidade  $G\beta\gamma$  induz a ativação da fosfolipase C  $\beta$  (PLC  $\beta$ ), conduzindo à formação de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), que estimulam, respectivamente, a libertação de cálcio do retículo endoplasmático e ativação da proteína quinase C (PKC). A PKC conduz a uma cascata de eventos citoplasmáticos e dentro do núcleo.  $G\beta\gamma$  também induz a ativação de PI3  $\gamma$  quinase que ativa moléculas efetoras envolvidas no rearranjo do citoesqueleto, implicado na adesão e migração celular. (Fonte: GUERREIRO, R. *et al.*, 2011).

#### 1.4.2. CCR2/CCR5 E A FEBRE CHIKUNGUNYA

A CCL2 é uma quimiocina que está expressa em níveis elevados em casos de artrite causada por chikungunya e, assim como seu receptor, o receptor de quimiocina CC tipo 2 (CCR2), pode contribuir para o quadro inflamatório e desenvolvimento da forma crônica da doença. Trabalhos anteriores demonstram que a inibição da quimiocina CCL2, utilizando o fármaco Bindarit, melhora significativamente o quadro

da doença induzida pela infecção por Alphavirus dos gênero Ross River (RRV) e CHIKV em camundongos caracterizada pela diminuição de danos nos tecidos e menor recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão (CHEN, W., et al., 2015; RULLI, E. N., et al., 2011; RULLI, E. N., et al., 2009). No entanto, outro estudo que caracterizou o papel do CCR2 na artrite induzida pelo CHIKV demonstrou que o receptor pode estar relacionado ao desenvolvimento da artrite, mas também desempenha papel fundamental na resolução da inflamação, visto que camundongos deficientes do receptor CCR2 tiveram o agravamento da doença (POO, Y. S., et al., 2014).

O receptor de quimiocinas CC tipo 5 (CCR5) é um receptor do grupo "CC", assim como o CCR2, descrito acima. Este receptor possui domínios de ligação para as quimiocinas CCL3, CCL4 e CCL5. Ele regula principalmente o tráfico e a atividade efetora de linfócitos T (efetores/memória), macrófagos e células dendríticas imaturas. Normalmente o CCR5 está presente em células associadas à resposta imune, como monócitos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, células Natural Killer (NK), células dendríticas imaturas, desempenhando assim um papel importante nos processos de inflamação crônica e alérgica (GUERREIRO, R. et al., 2011).

O CCR5 já foi descrito em associação com diversas doenças devido ao seu papel no recrutamento de células do sistema imune (KHALID, A., et al., 2015). A primeira associação do CCR5 com doenças causadas por vírus foi com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Ele atua como principal receptor envolvido na adsorção e multiplicação do vírus nas células do hospedeiro. Seu papel central na patogênese da doença é ilustrado pela resistência à infecção pelo HIV de indivíduos homocigotos para o alelo *ccr5*Δ32, que possui uma deleção de 32 pares de bases na região codificadora da proteína, expressando um CCR5 não funcional. Esses indivíduos são resistentes à infecção pelo HIV, mesmo quando expostos frequentemente ao vírus (ZAJAC, V., 2018). Esta característica foi amplamente estudada resultando no desenvolvimento de tratamentos para a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) baseados em compostos com atividade inibidora e/ou antagonista de CCR5 (BRELOT, A.; CHAKRABARTI, L. A., 2018). A expressão de CCR5 em linfócitos T também está relacionada à maior replicação do vírus *Vaccinia*. A fosforilação de uma cascata de tirosinas no CCR5 é necessária para organização e sinalização de proteínas virais e posterior replicação deste vírus

(RAHBAR, R., et al., 2006). Em um modelo animal em camundongos, também foi observada a maior replicação do *Vaccinia virus* e essa foi acompanhada pela disseminação do vírus no hospedeiro, onde as células CCR5<sup>+</sup> infiltraram-se em órgãos-alvo carregando a progênie viral (RAHBAR, R., et al., 2009).

Mais recentemente, foi demonstrado que o receptor CCR5 está associado à replicação do DENV em macrófagos murinos e que camundongos CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram um controle da resposta inflamatória e foram mais resistentes a doses letais do vírus quando comparados aos animais selvagens (MARQUES, R. E., et al., 2015). De maneira oposta, alguns trabalhos demonstraram que o receptor CCR5, que está associado ao recrutamento de células do sistema imune, pode desempenhar papel no controle da doença. No caso do vírus da encefalite do oeste do Nilo (West Nile Virus – WNV), foi demonstrado em modelo murino que os animais deficientes para o CCR5 são mais susceptíveis à infecção. Neste modelo, o CCR5 é essencial para que linfócitos T, células NK e macrófagos migrem para o sistema nervoso central, controlando a replicação do WNV e prevenindo a mortalidade decorrente da infecção (LIM, J. K. et al., 2011). Outro exemplo são casos de infecção pelo vírus da encefalite (Tick-borne Encephalitis Virus - TBEV) onde também foi demonstrado que a presença do alelo *ccr5Δ32* é associada com a ocorrência de meningoencefalite grave, portanto, portar o alelo *ccr5Δ32* pode ser muitas vezes um fator de risco em casos de infecções (GRYGORCZUK, S., et al., 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA

A artralgia causada pelo CHIKV é um problema de saúde público global, associado ao desenvolvimento de dor incapacitante nas articulações, perda de dias de trabalho e qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Além disso, essa condição clínica tem impacto direto na economia do país, resultando em elevados custos com o tratamento destes pacientes que podem permanecer incapacitados por meses ou até anos, impactando diretamente a população economicamente ativa.

Apesar de sua alta prevalência, os mecanismos envolvidos na patogênese alfaviral ainda permanecem mal compreendidos. Sabe-se que a resposta inflamatória tem participação importante no desenvolvimento da doença, visto que na fase inicial e crônica da doença são observados produção de diversos mediadores inflamatórios. Dentre os mediadores observados, as quimiocinas e seus receptores têm sido alvo de estudos, devido aos seus altos níveis durante a infecção. Estudos recentes demonstraram que a inibição farmacológica da quimiocina CCL2, em camundongos infectados por CHIKV e RRV, altera o curso da infecção, resultando em uma doença significativamente menor, enquanto estudos com animais deficientes para o receptor CCR2 mostram que a ausência do receptor causa uma piora do quadro de doença durante a infecção por CHIKV. Estes estudos sugerem um papel importante para quimiocinas produzidas durante a infecção por CHIKV, na fisiopatologia da doença. Entretanto, são necessários estudos aprofundados para entender os mecanismos associados a relação das quimiocina e seus receptores durante o desenvolvimento da doença.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o papel dos receptores de quimiocina, CCR2 e CCR5, no curso da infecção pelo vírus Chikungunya *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar os subtipos celulares e o perfil de expressão dos receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5 em animais selvagens (WT) durante cinética de infecção pelo CHIKV.
- 2) Avaliar carga viral, parâmetros clínicos e inflamatórios durante cinética de infecção pelo CHIKV em animais WT e deficientes para o receptor CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>). Para isso serão analisados:
  - a) Os parâmetros clínicos (hipernocicepção) e o perfil hematológico (contagem de leucócitos total e diferencial) associado à infecção pelo CHIKV;
  - b) A carga viral em diversos órgãos alvo para a infecção;
  - c) O perfil de resposta inflamatória através da medida indireta do recrutamento de leucócitos para os tecidos (MPO e NAG) e a produção de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas);
  - d) A análise histopatológica da articulação do tornozelo;



- 3) Avaliar os parâmetros clínicos, carga viral e inflamatórios durante cinética de infecção pelo CHIKV em animais WT e deficientes para o receptor CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>). Para isso serão analisados os mesmos parâmetros descritos no item anterior.
  
- 4) Padronizar um modelo de infecção in vitro de macrófagos primários obtidos a partir de camundongos WT e deficientes para os receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5. Para isso serão analisados:
  - a) A viabilidade celular após a infecção pelo CHIKV;
  
  - b) A carga viral nos sobrenadante das culturas após a infecção pelo CHIKV;
  
  - c) A produção de mediadores inflamatórios no sobrenadante das culturas após a infecção pelo CHIKV;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos selvagens (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 os receptores de quimiocina CCR2 (CCR2<sup>-/-</sup>) e CCR5 (CCR5<sup>-/-</sup>) os quais foram adquiridos do Biotério de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Todos os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG sob condições controladas de temperatura (28°C a 30°C), umidade (50%), ventilação, ciclos de iluminação claro e escuro de 12 horas, ração e água sem restrições. Todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG, sob o protocolo 78/2018.

### 4.2. VÍRUS E CÉLULAS

Neste trabalho foi utilizada uma linhagem Asiática do CHIKV isolada a partir do sangue de um paciente virêmico e 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.

Foram utilizadas células C6/36 derivadas de *Aedes albopictus* (clone C6/36) provenientes do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ) sob número de acesso 0343. Células Vero (células derivadas de rim do macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*) também provenientes do BCRJ sob número de acesso

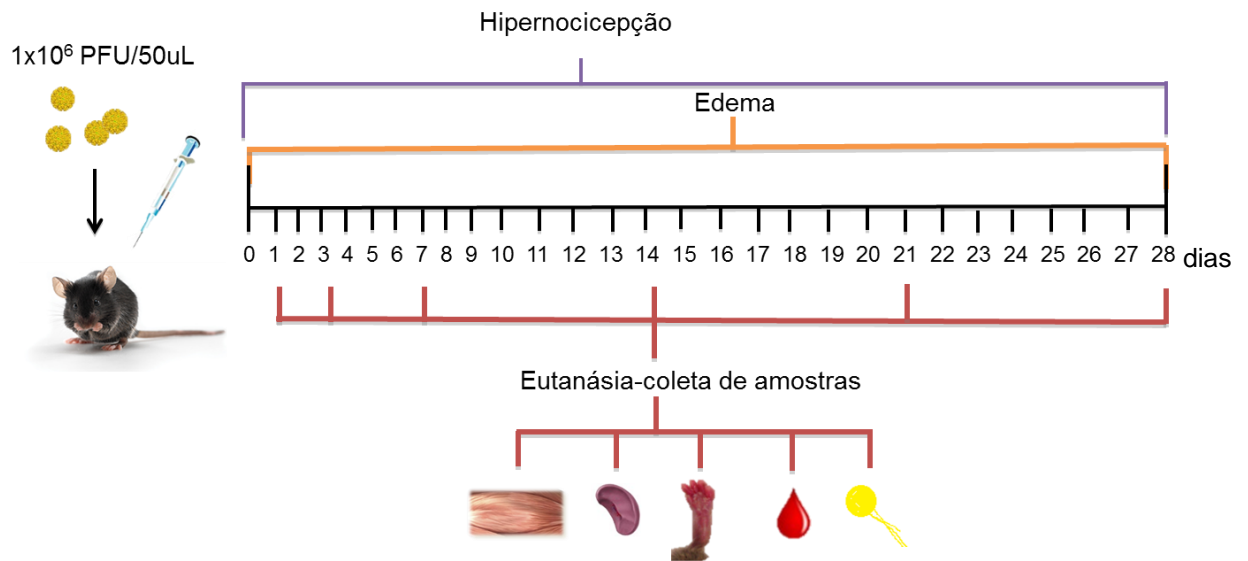
0245 e células L929 (fibroblastos derivados de camundongo) provenientes do BCRJ sob o número de acesso 0188.

#### 4.3. PROPAGAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO CHIKV

O CHIKV foi propagado em células da linhagem C6/36. A cultura foi realizada na presença de meio de cultivo Leibowitz L-15 suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais e 2% Soro Fetal Bovino. As células foram mantidas em estufa incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), com atmosfera umidificada a 28°C e ausência de CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiram 80% de confluência, o meio de cultura da garrafa foi descartado e essas foram infectadas com o CHIKV (MOI=0.1) em um volume final de 5mL de vírus por garrafa pelo período de 1h. As garrafas foram gentilmente agitadas a cada 15min e após 1h mais 10mL do meio L15 suplementado foi adicionada a cada garrafa. As células foram então incubadas por um período de 5-7 dias para o aparecimento dos efeitos citopáticos observados através da formação dos sincícios virais. Para a concentração dos estoques, 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) assim como recomendado pelo fabricante. 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.

#### 4.4. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Os experimentos *in vivo* foram realizados segundo o esquema representado na .



**Figura 5: Esquema representativo dos experimentos in vivo.**

Camundongos WT,  $CCR2^{-/-}$  ou  $CCR5^{-/-}$  foram injetados via intraplantar com  $1 \times 10^6$  PFU de CHIKV. Os animais foram eutanasiados nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 pós-infecção (p.i.), para obtenção de amostras (baço, pata, sangue, músculo e linfonodo poplíteo). As medidas de hipernocicepção serão medidos antes da infecção e nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 dias p.i.

#### 4.5. DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL

Para determinar a carga viral nos estoques virais e nas amostras de soro e tecidos dos camundongos infectados e no sobrenadante das culturas primária, foi empregada a técnica de titulação viral por ensaio de formação de placas de lise como descrito por COSTA et al., 2014.

Brevemente, células da linhagem VERO foram crescidas em meio RPMI 1X, suplementado com 1,5% HEPES, 1% antibióticos, 1% L-Glutamina, 1% aminoácidos não essenciais, 10% Soro Fetal Bovino. As células foram tripsinizadas, homogeneizadas e implantadas em placas de 6 ou 12 poços a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço e  $5 \times 10^5$  células/poço, respectivamente. As placas foram incubadas em uma estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por cerca de 24 horas, quando seus poços apresentavam uma monocamada de células com uma confluência de 85 a 90%.

Os estoques virais e as amostras de soro obtidas dos camundongos infectados ou o sobrenadante das culturas primárias de macrófagos foram diluídos serialmente em meio RPMI. As amostras de baço, coxim plantar e quadríceps 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 na ausência de SFB. As amostras de linfonodo poplíteo foram maceradas entre lâminas estéreis e diluídas em um volume final de 500 $\mu$ L de meio RPMI. A cada poço de uma placa foi adicionado 400 $\mu$ L (para placa de 6 poços) ou 300 $\mu$ L (para placa de 12 poços) de cada uma das diluições ( $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ ) de uma dada amostra (tecido) ou diluições de ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ) para o soro ou sobrenadante de cultura. O controle de células foi um poço não inoculado, ao qual foi acrescentado apenas o meio RPMI com antibióticos na ausência de SFB nos mesmos volumes. As placas foram incubadas por um período de uma hora a 37°C (período de adsorção viral) durante o qual foram gentilmente movimentadas de quinze em quinze minutos para garantir uma distribuição homogênea das partículas virais sobre a monocamada de células. Terminado o período de adsorção, o meio foi retirado dos poços e desprezado, e as células lavadas com meio RPMI. Em seguida, foi adicionado meio DMEM contendo 1.6% de carboximetilcelulose, antibióticos e 2% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por quatro dias, período no qual os efeitos citopáticos podem ser observados ao microscópio invertido. Após este período, as mesmas foram fixadas com formol tamponado a 10% por no mínimo 30 minutos e, posteriormente, coradas com solução 1% p/v de cristal violeta em 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).

#### 4.6. MEDIDA DA HIPERNOCICEPÇÃO ARTICULAR INFLAMATÓRIA

A avaliação de hipernocicepção, ou medida de dor em animais de experimentação, foi realizada por teste de medida de pressão eletrônica modificado em camundongos, como descrito por (SACHS et al., 2011). Resumidamente, os camundongos foram colocados em caixas de acrílico sobre uma tela de suporte metálica pelo período de 15 a 30 minutos (período de adaptação). Neste experimento foi utilizado um medidor de pressão eletrônica que visa avaliar a transmissão do estímulo através de um sensor (INSIGHT Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O teste consistiu na aplicação de uma ponteira romba de 0,5mm<sup>2</sup> na parte posterior da pata dos animais infectados pelo CHIKV ou nos animais controle (PBS), onde a força perpendicular aplicada na área central da superfície plantar induziu a flexão da articulação do joelho seguido da resposta de retirada da pata pelo animal. A intensidade da pressão foi automaticamente recordada pelo sensor e os valores para a resposta foram obtidos após três medidas, antes e após a infecção de cada animal individualmente. A hipernocicepção articular inflamatória foi avaliada diariamente após a inoculação do CHIKV. Os resultados foram expressos em média e calculados subtraindo-se o tempo zero da medida (antes da infecção/medida basal) e as medidas nos intervalos de tempos após a infecção, e expressos como  $\Delta$  da hipernocicepção, como descrito por Cunha e colaboradores, 2004.

#### 4.7. ANÁLISE HEMATOLÓGICA

Inicialmente os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intraperitoneal. Assim que a anestesia geral surtiu efeito, foi realizada uma laparotomia mediana nos animais e o sangue periférico coletado através da punção da veia cava inferior com o uso de uma agulha de 20G e seringa de 3mL heparinizada. As amostras de sangue obtidas foram

separadas para contagem total e diferencial de leucócitos e coleta do plasma. Para contagem total, as amostras de sangue foram diluídas em solução de Turk a uma proporção de 1:40, contadas em câmara de Neubauer e o resultado foi expresso em número total de leucócitos/mL de sangue. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em lâminas contendo esfregaço sanguíneo, coradas com Kit Panótico, e o resultado expresso em % do número total de cada tipo celular (mononucleares, neutrófilos e linfócitos), corrigido proporcionalmente ao resultado de contagem total da amostra.

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

#### 4.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

Para dosagem dos mediadores inflamatórios, as citocinas (TNF $\alpha$  e IL-6) e as quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1 e CXCL2) foram quantificadas no coxim plantar direito dos camundongos. O tecido foi coletado e homogeneizado em solução de PBS contendo inibidor de proteases (0,1mM phenylmethanesulfonyl fluoride; 0,1mM benzethonium chloride; 10mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween 20, na proporção de 0,1g de tecido para cada mL de solução; utilizou-se um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, USA). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, USA) e os sobrenadantes recolhidos e estocados em microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) a -20°C, para posterior análise. Para os ensaios foram utilizados kits comerciais de anticorpos (R&D Systems, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (C96 MicroWell™ Plates, Nunc, Thermo Fisher Scientific, EUA). Brevemente, os anticorpos de captura foram diluídos em PBS (pH 7,4) e as placas foram sensibilizadas com uma pipeta repetidora (50  $\mu$ l/poço) e armazenadas por 18h na geladeira a 4°C. No dia seguinte, a reação foi bloqueada com PBS acrescido de 1% de albumina bovina (Sigma-Aldrich, 25

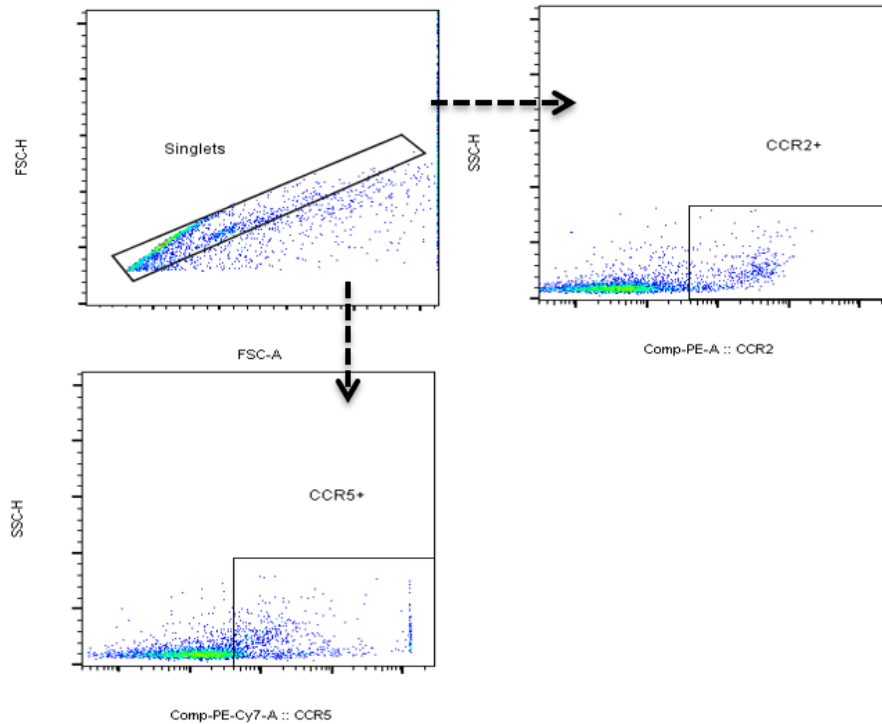
EUA) e incubadas pelo período de 1h no agitador magnético (TS-2000A VDRL SHAKER BIOMIXER). As placas foram lavadas 4X com solução de PBS + tween 20 (0.1%) utilizando o lavador Elx50 Bio-Tek Instruments INC. Em seguida, as amostras, os padrões e o branco (albumina 0,1%) foram adicionados aos poços e incubados por mais 18h na geladeira a 4°C. Os poços foram novamente lavados e o anticorpo de detecção (50µl/poço) 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 50µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura foi feita em espectrofotometro (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil) em comprimento de onda de 492nm. Os ensaios apresentaram uma sensibilidade de 8-16pg/ml.

#### 4.9. AVALIAÇÃO DOS SUBTIPOS CELULARES E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS RECEPTORES DE QUIMIOCINAS CCR2 E CCR5

A expressão dos receptores de quimiocina CCR2/CCR5 assim como os subtipos celulares expressando estes receptores durante a infecção pelo CHIKV foi avaliada através da técnica de citometria de fluxo. Foram utilizados animais WT de 4-5 semanas infectados com  $1 \times 10^6$  PFU do vírus e foram coletados o baço nos tempos de 7, 14 e 21 dias e o linfonodo poplíteo nos dias 1, 3, 7, 14 e 21 dias para as análises. As amostras foram coletadas e homogeneizadas usando maceradores de vidro temperado. A suspensão de células do baço foi submetida à lise de hemácias por choque osmótico utilizando o tampão de lise ACK (Merck). As células do baço e linfonodo, foram então contadas em câmara de Neubauer e em seguida plaqueadas em placa de 96 poços para marcação com anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos. Os seguintes anticorpos foram utilizados: anti-CD4 (FITC), CD8 (V450), CD3 (PerCPy5), CCR2 (PE), CCR5 (Biotina), Ly6G (APC), CD11c (V510), F4/80 (APC/Cy7), controles de isótipo e estreptavidina conjugada a PE-Cy7 foram comprados 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

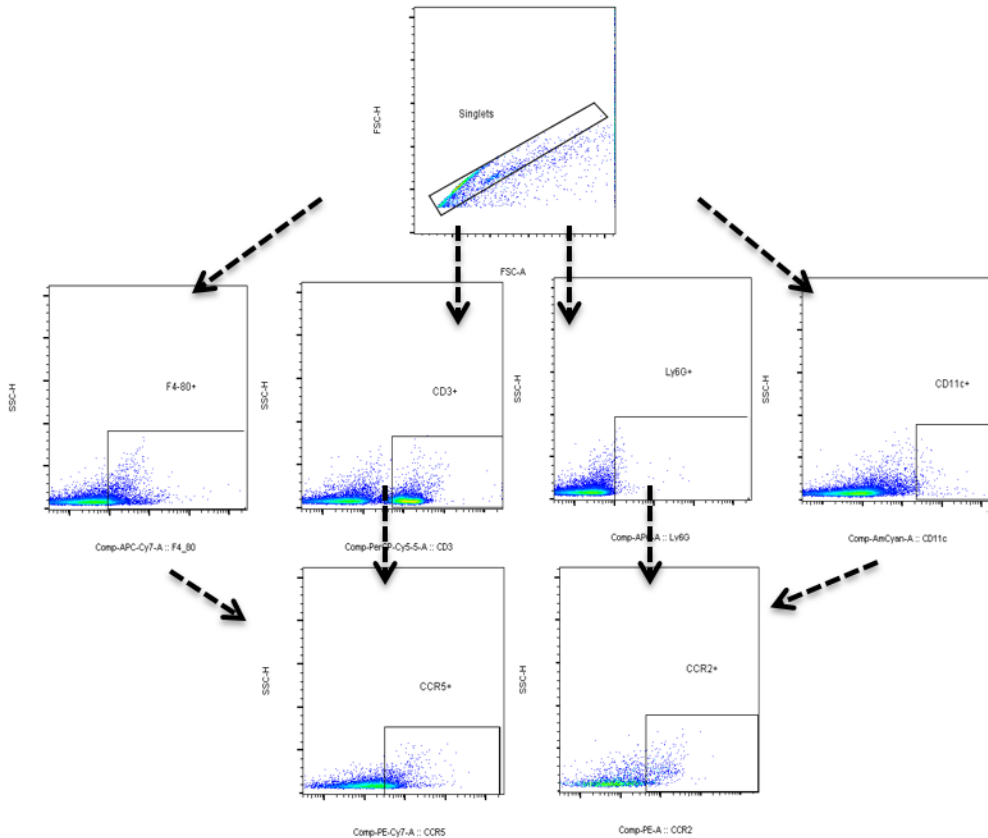


minutos, outra lavagem e fixação em formaldeído 4% v/v. As células marcadas com anticorpos foram adquiridas no citômetro FACSCanto II e analisadas no software FlowJo (Tree Star). As seguintes estratégias de gate foram utilizadas:



**Figura 6: Estratégia para análise de células CCR2<sup>+</sup> ou CCR5<sup>+</sup>.**

Amostras de linfonodo e baço, preparadas conforme a descrição em 3.9, foram adquiridas em citômetro FACSCanto II e analisadas no programa Flow Jo. Para isso, eventos únicos (*Singlets*) foram estratificados em células CCR2<sup>+</sup> ou CCR5<sup>+</sup> pela marcação com PE ou PE-Cy7, respectivamente.



**Figura 7: Estratégia para análise de leucócitos CCR2<sup>+</sup> ou CCR5<sup>+</sup>.**

Amostras de linfonodo e baço, preparadas conforme a descrição em 3.9, foram adquiridas em citômetro FACSCanto II e analisadas no programa Flow Jo. Para isso, eventos únicos (Singlets) foram estratificados em células CD3, F4-80, CD11c e Ly6G pela marcação com Percp-Cy5, APC-Cy7, V510 e APC, respectivamente, em seguida para cada grupo de células foi feita a separação em CCR2 ou CCR5<sup>+</sup>, pela marcação com PE ou PE-Cy7.

#### 4.10. DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILOS (MPO)

O recrutamento de neutrófilos para os tecidos foi avaliado pelo ensaio indireto através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Fragmentos do baço, coxim plantar e quadríceps dos animais controles ou infectados nos diferentes tempos de interesse foram coletados e congelados a -20 °C. Após o descongelamento, 100mg do tecido foi homogeneizado em 2mL de tampão (pH 4,7) (0,1M NaCl; 0,02M NaPO<sub>4</sub>; 0,015M NaEDTA), utilizando-se um homogeneizador elétrico de tecidos (Power Gen 125 - – Fisher Scientific International, EUA). Após centrifugação a 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise

osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em tampão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) 0,5% p/v e re-homogeneizado. Alíquotas de 1mL da suspensão foram transferidas para microtubos (Tubo 3810, eppendorf do Brasil) de 1,5 mL e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Essas amostras foram novamente centrifugadas por 15 min a 3000g e os sobrenadantes coletados.

A atividade da mieloperoxidase (MPO) das amostras foi determinada através de leitor de ELISA (450nm) usando tetramethylbenzidine (1.6mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5mM) para a medição das alterações da densidade óptica (OD). Os resultados foram expressos como unidade relativa comparados com neutrófilos de camundongos não infectados. Uma curva padrão do número de neutrófilos versus OD foi previamente obtida pelo processamento de neutrófilos purificados do peritônio de camundongos com padronizado anteriormente por Souza e colaboradores., 2004.

#### 4.11. DETECÇÃO INDIRETA DE MACRÓFAGOS (NAG)

O acúmulo de macrófagos foi avaliado pelo ensaio da quantificação da atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG). Fragmentos do baço, coxim plantar e quadríceps dos animais infectados ou controles foram coletados e congelados a -20 °C. Após o descongelamento, 100mg 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 3000g, por 10 min, a 4°C (Centrífuga BR4 – Jouan, EUA), o sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido à lise osmótica pela adição de NaCl 0,2% gelada (para 100mg de tecido, 1,5mL de solução) seguido (após 30 segundos) da adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5% gelada. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em solução salina 0,9%/Triton x-100 0,1% v/v e re-homogeneizado. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000g e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Alíquotas de

100µL da suspensão foram transferidas para placas de 96 poços, em duplicata e 100 µL do substrato (p-nitrofenil-N- acetil-β-D-glicosiminida) e mantidas a 37°C. Após 10 minutos, adicionou-se a solução 100µL de tampão glicina 0,2 M e a atividade da NAG foi determinada através de leitor de ELISA (400nm). Os resultados foram expressos como densidade óptica (OD)

#### 4.12. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A articulação do tornozelo dos camundongos foi coletada ao longo da cinética da infecção e fixada em formol 10%v/v por no mínimo 2 dias. Em seguida, o tecido foi lavado em água corrente por 5 minutos e embebido em uma solução de EDTA 14%p/v, durante aproximadamente 40 dias, com troca da solução a cada 3 dias, para a sua desmineralização. Uma vez desmineralizado, o tecido foi processado, incluído em parafina, cortado, montado em lâminas e corado com Hematoxilina e Eosina (H&E) como descrito por Costa e colaboradores (2015). Foram avaliados os seguintes parâmetros nos cortes: intensidade de infiltrado inflamatório (0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso; 4: generalizado) e perda da arquitetura tecidual (0: ausente; 1: leve; 2: moderado; 3: intenso). Após a análise, as pontuações foram somadas, totalizando até 7 pontos, como descrito por Queiroz-Junior e colaboradores (2011).

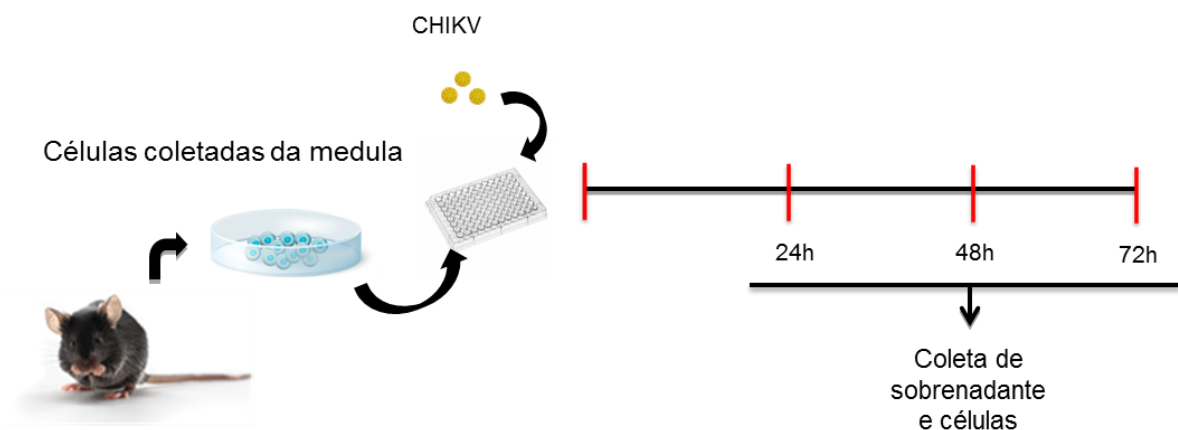
#### 4.13. CULTURA PRIMÁRIA DE MACRÓFAGOS DE MEDULA ÓSSEA

Após a eutanásia dos animais (WT, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR5<sup>-/-</sup>), com o auxílio de material cirúrgico e em condições estéreis, o fêmur e a tíbia foram separados e as células da medula óssea foram retiradas nos dois ossos através da instilação de solução PBS estéril utilizando uma seringa e agulha de 20G. Em seguida, as células foram contadas e mantidas em placas de petri por 10 dias, em meio RPMI 20%SFB e 30% de sobrenadante de célula L929, para diferenciação em macrófago. As células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após diferenciação, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na concentração de 2 x 10<sup>5</sup> células por poço, e

divididas em grupo controle, apenas célula e meio; e grupo infectado, que recebeu vírus CHIKV na MOI de 5 e 10, com 1 hora de adsorção do vírus. As células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por 24, 48, 72 ou 96 horas, quando o sobrenadante foi coletado para titulação (conforme descrito em 3.5) e análise de viabilidade pelos métodos descritos no item 4.14.1.

#### 4.13.1. VIABILIDADE CELULAR

Para o ensaio de LDH foi utilizado um kit de cinética da Bioclin seguindo a metodologia indicada com modificações, em uma placa de 96 poços foi adicionado 4 µL da amostra e 200 µL da solução de trabalho do kit, foram feitas três leituras com intervalo de 1 minuto entre as leituras para o cálculo de consumo de substrato por minuto, os valores foram expressos em absorbância. O MTT foi utilizado na concentração de 0,5mg/mL diluído em PBS, a solução foi colocada sobre a célula que foi mantida em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 2 horas, após este período o sal formado pela reação do MTT foi dissolvido com a adição de 100 µL de DMSO e foi feito a leitura em leitor de placa de elisa na O.D. de 490nm.



**Figura 8: Esquema representativo dos experimentos in vitro.**

Camundongos WT ou deficientes para os receptores CCR2 e CCR5 foram utilizados para coleta de células da medula. As células coletadas foram diferenciadas em macrófago e plaqueadas em placa de 96 poços. Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  cel/poço e a coleta e análises após 24, 48, 72 e 96h de infecção.

#### 4.13.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão médio (EPM) por grupo de 4-6 (linhagem C57BL6) animais, exceto para os dados de carga viral que foram apresentados como mediana, assim como definido no cálculo amostral aprovado no Comitê de Ética e Uso de Animais (CEUA). Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o teste t não paramétrico (MAN-WHITNEY) ou a análise de variância a um critério (ANOVA ONE-WAY/TWO-WAY), seguido de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Para a realização de todas as análises, utilizou-se o software GraphPad PRISM (GraphPad Software, EUA). Os níveis de significância foram estabelecidos em  $p < 0,05$ .

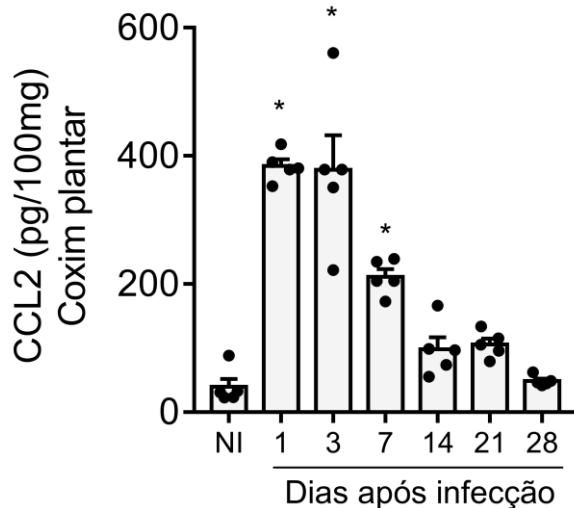
### 5. RESULTADOS

Todos os experimentos realizados abaixo foram baseados na padronização do modelo experimental de infecção pelo CHIKV descrito por P. M. THAIANE, dissertação (2017). Utilizando este modelo, foram observados níveis elevados das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5 no coxim plantar dos animais inoculados pelo CHIKV, na fase aguda da infecção. Uma vez que essas quimiocinas são importantes moléculas envolvidas na patogênese de diversas condições inflamatórias, o papel dos seus receptores CCR2 (ligante de CCL2) e CCR5 (ligante de CCL3, CCL4 e CCL5) foram avaliados durante o curso da infecção pelo CHIKV. Inicialmente, estão descritos os resultados relacionados ao receptor CCR2 e em seguida os resultados para o receptor CCR5.

## 5.1. PAPEL DO RECEPTOR CCR2 FRENTE À INFECÇÃO POR CHIKV

### 5.1.1. PERFIL DE QUIMIOCINAS E RECEPTOR

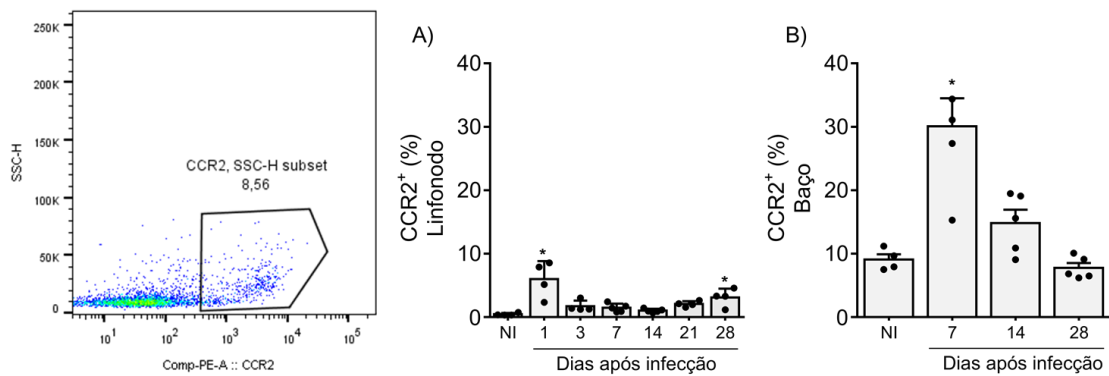
Durante avaliação dos níveis de quimiocina durante cinética de infecção pelo CHIKV, foi observado um aumento nos níveis da quimiocina CCL2 nos tempos iniciais de infecção. Nos dias 1, 3 e 7 p.i. são observados aumentos significativos de CCL2 quando comparados ao grupo de animais não infectado, com 14 dias p.i. os valores retornam aos níveis basais, como pode ser observado na Figura 9.



**Figura 9: Níveis de CCL2 durante cinética de infecção por CHIKV.**

Os camundongos WT foram infectados por via intraplantar com  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L de CHIKV. Níveis de CCL2 foram quantificados por ELISA no coxim plantar. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. NI= não infectado. n= 5, \* p< 0,05 Vs NI.

Em seguida foi realizada uma análise por citometria de fluxo no baço e no linfonodo poplíteo de camundongos WT. Os resultados demonstram que após a infecção ocorre um aumento na porcentagem total de leucócitos positivos expressando o receptor de quimiocinas CCR2 no dia 1 p.i., retornando aos níveis basais a partir do dia 3 e com um aumento no dia 28 p.i., quando avaliados no linfonodo (Figura 10-A). Células CCR2<sup>+</sup> apresentaram aumento no baço no dia 7 p.i. retornando a níveis basais nos dias 14 e 28 p.i. (Figura 10-B).



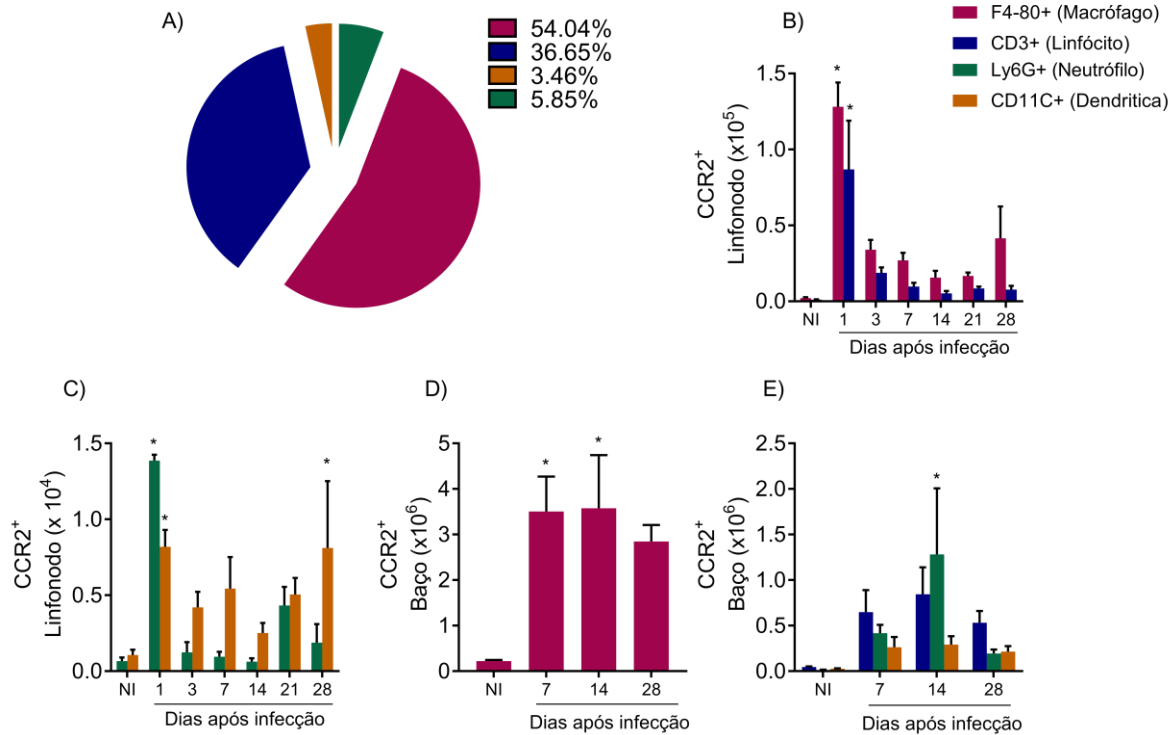
**Figura 10: Expressão do receptor CCR2 em leucócitos do linfonodo e baço durante cinética de infecção pelo CHIKV em camundongos WT.**

Os camundongos WT foram infectados com  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L de CHIKV. (A) leucócitos positivos para CCR2 no linfonodo, nos tempos de 1 a 28 dias p.i., (B) leucócitos positivos para CCR2 no baço, nos dias 7, 14 e 28 dias p.i.. Os resultados são expressos em frequência (%) e foram obtidos por marcação do receptor e leitura em citometria de fluxo. NI= não infectado. n=4-5 animais. \*  $p < 0,05$  Vs NI.

Em seguida, o perfil de expressão do receptor em diversas subpopulações de leucócitos foi investigado. A infecção pelo CHIKV induziu o aumento da frequência de diversas subpopulações celulares expressando o receptor CCR2 no linfonodo e baço. A Figura 11-A é representativa da porcentagem das diferentes subpopulações celulares dentro dos leucócitos totais no linfonodo. A maior parte das células CCR2<sup>+</sup> são macrófagos, com aproximadamente 54% da população seguida por linfócitos, com 36,65% com menores proporções de neutrófilos e células dendríticas, com 5,85 e 3,46%, respectivamente. Para facilitar a visualização dos dados devido à diferença da porcentagem dessas subpopulações de leucócitos, os gráficos dos diferentes tipos celulares foram representados separadamente. Mais especificamente, observamos que no primeiro dia de infecção houve um aumento na porcentagem de macrófagos e linfócitos positivos para CCR2 no linfonodo, retornando aos níveis basais no 3º dia p.i. e permanecendo sem alterações significativas até o dia 28 p.i. como pode ser observado na Figura 11-B. De maneira similar, a Figura 11-C demonstrou que os neutrófilos e as células dendríticas presentes no linfonodo, também apresentam aumento de população CCR2<sup>+</sup> no dia 1 p.i. retornando aos níveis basais no 3º dia, porém, os níveis basais são mantidos nos dias 3, 7, 14 e 21 p.i. com aumento nas células dendríticas CCR2<sup>+</sup> no dia 28 p.i.. No baço foi observado um aumento de macrófagos CCR2<sup>+</sup> nos dias 7 e 14, e de neutrófilo no dia



14, não sendo observadas alterações para linfócitos ou células dendríticas no baço (Figura 11 D-E).



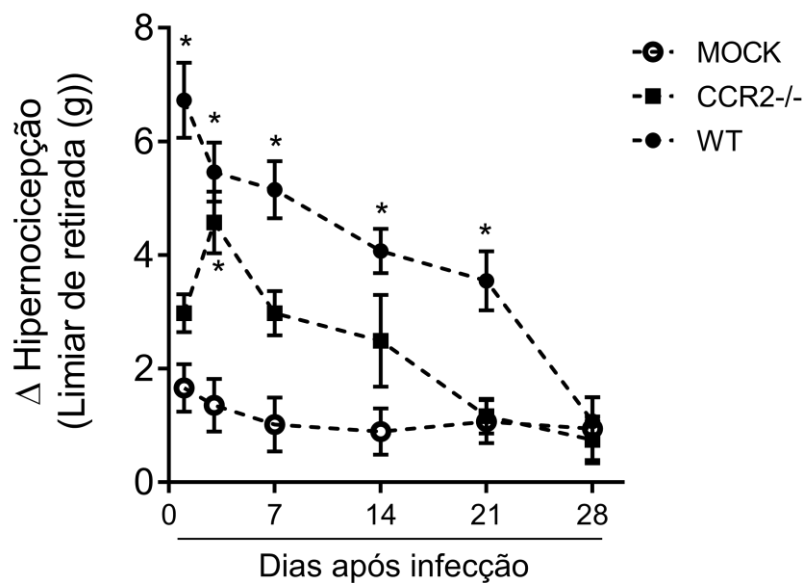
**Figura 11: Expressão de CCR2 em leucócitos do linfonodo e baço durante cinética de infecção por CHIKV em camundongos WT.**

Os camundongos WT foram infectados com o CHIKV pela injeção i.pl. de  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L. (A) Fração em porcentagem (%) da média do número de células CCR2<sup>+</sup> no dia 1p.i. no linfonodo; (B) Macrófago e linfócito CCR2<sup>+</sup> no linfonodo, (C) Neutrófilo e células dendríticas CCR2<sup>+</sup> no linfonodo, (D) Macrófagos CCR2<sup>+</sup> no baço, (E) Linfócitos, neutrófilos e células dendríticas CCR2<sup>+</sup> no baço. n=4-5 animais. \* p< 0,05 Vs NI.

### 5.1.2. MEDIDA DE HIPERNOCICEPÇÃO

Uma vez que foi observado aumento dos receptores de quimiocina, assim como dos níveis de suas quimiocinas de ligação durante a cinética de infecção pelo CHIKV, os próximos passos foram avaliar os parâmetros de doença e inflamação em camundongos deficientes para CCR2.

A hipernocicepção articular inflamatória foi avaliada para camundongos WT e CCR2<sup>-/-</sup>. Os resultados demonstram uma hipernocicepção prolongada em animais WT, com início no dia 1 até o dia 21 p.i., com retorno aos níveis basais com 28 dias p.i.. No grupo de animais CCR2<sup>-/-</sup> foram observadas alterações apenas no dia 3 p.i., quando comparado ao grupo controle (NI), como pode ser observado na Figura 12.



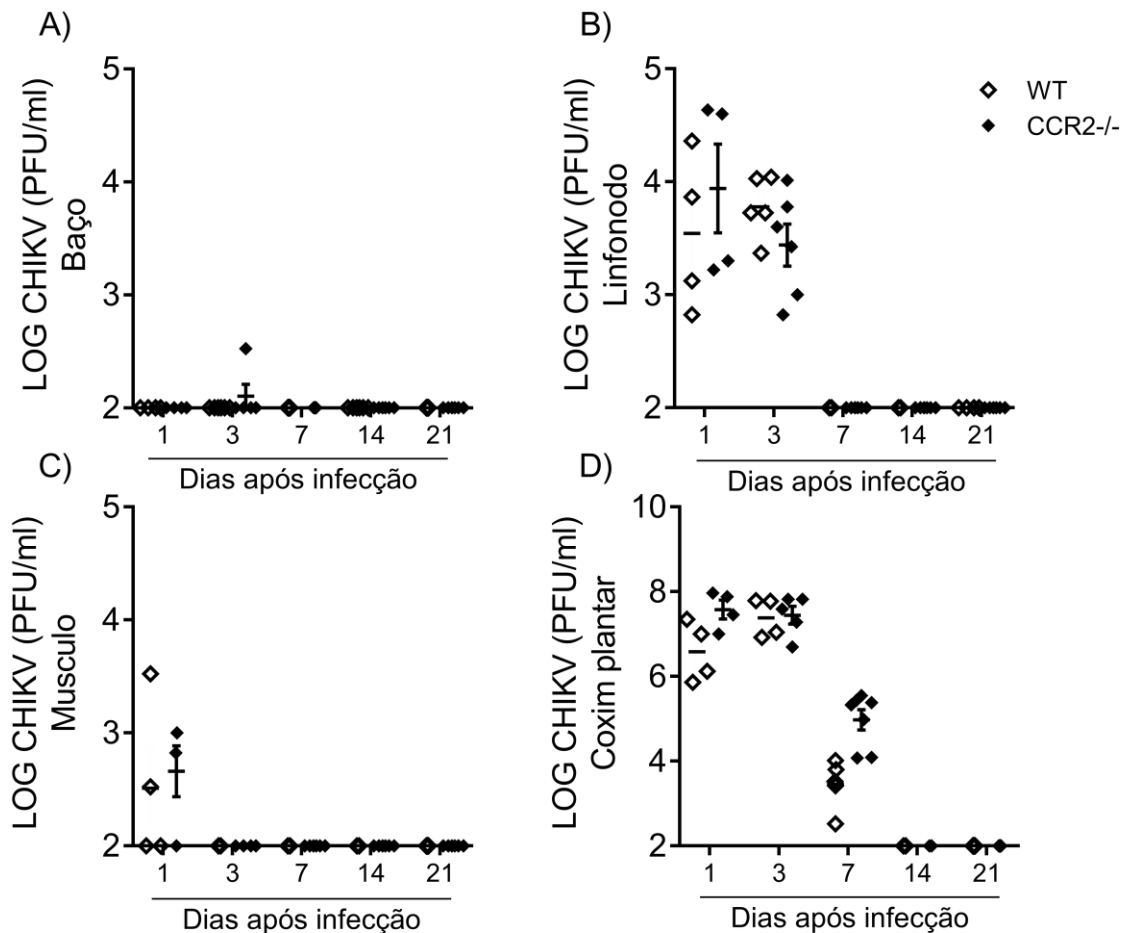
**Figura 12: Avaliação da hipernocicepção articular inflamatória em animais WT e CCR2<sup>-/-</sup>.**

Camundongos WT ou CCR2<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50μl de CHIKV e a hipernocicepção articular foi avaliada durante 28 dias. Os camundongos controle (Mock) receberam injeção de PBS e foram igualmente avaliados. n= 5-6 animais. \* p< 0,05 Vs Mock.

### 5.1.3. CARGA VIRAL

Com a finalidade de avaliar a influência do receptor CCR2 na disseminação e multiplicação do vírus, a recuperação de carga viral viável, após infecção com CHIKV, foi avaliada em diversos tecidos em animais WT e CCR2<sup>-/-</sup> através do ensaio de lise de placa, utilizando células Vero. Os resultados obtidos revelam a presença de vírus viável em diversos tecidos. Em camundongos WT, é possível observar a presença de vírus nos dias iniciais pós infecção, dias 1 e 3, no linfonodo. No

músculo, foi recuperado vírus apenas no dia 1 p.i. e no coxim plantar nos dias 1, 3 e 7, com níveis não detectáveis nos dias 14 e 21 p.i.. Em camundongos  $CCR2^{-/-}$  foi observado presença de vírus no baço, no dia 3 p.i. e no linfonodo nos dias 1 e 3. No músculo foi recuperado vírus apenas no dia 1 p.i. e no coxim plantar nos dias 1, 3 e 7 p.i., em todos os tecidos avaliados, não foram observadas diferenças significativas de quantidade de vírus em camundongos  $CCR2^{-/-}$ , quando comparados aos camundongos WT, como observado na Figura 13. Para ambos os grupos, os níveis de carga viral no baço (Figura 13-A) e plasma (dados não mostrados) foram abaixo dos níveis de detecção da técnica.

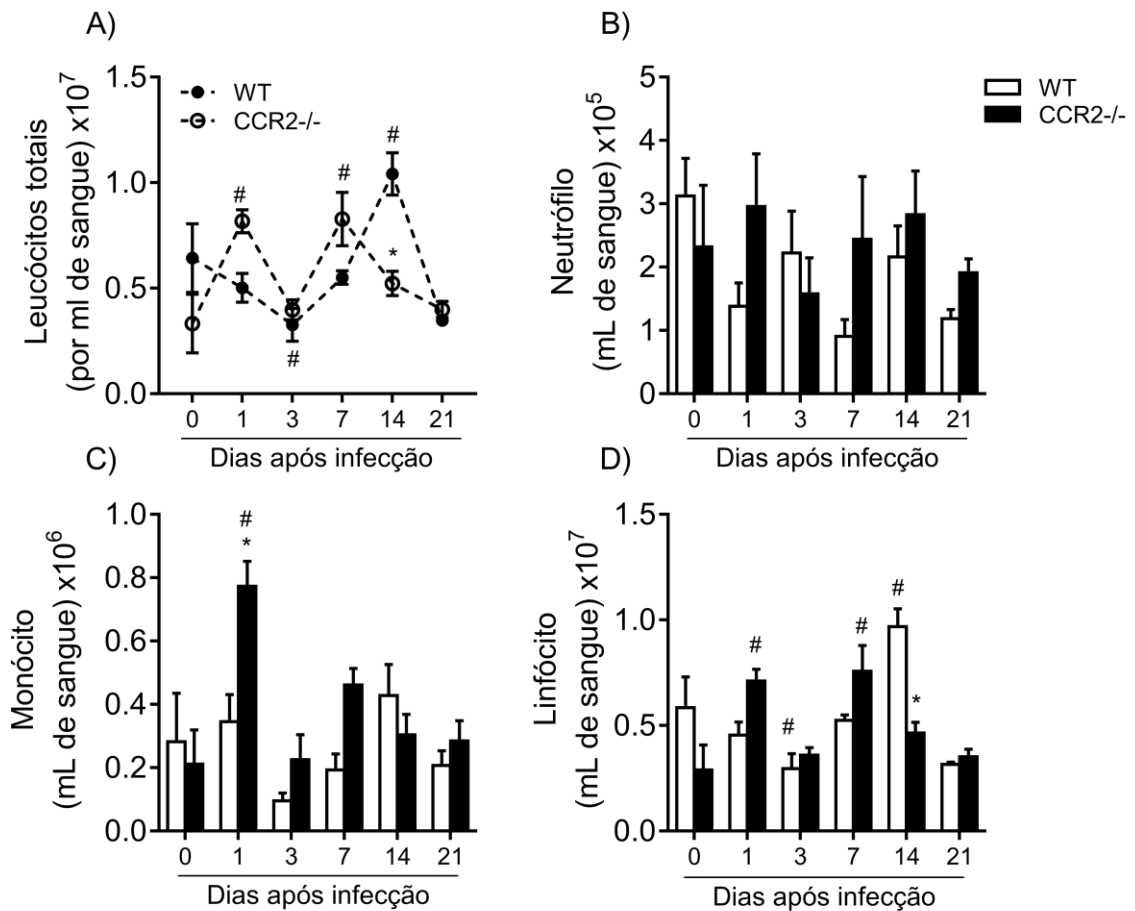


**Figura 13: Carga viral viável recuperada após infecção por CHIKV em camundongos WT e  $CCR2^{-/-}$ .**

Camundongos WT ou  $CCR2^{-/-}$  foram infectados com  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L de CHIKV, anestesiados e eutanasiados para a coleta dos órgãos nos dias citados. A quantificação do título viral foi obtida por titulação e plaqueamento das amostras usando células permissivas à infecção. Foram avaliados baço (A), linfonodo poplíteo (B), músculo (C) e coxim plantar (D). Os resultados são apresentados como PFU por ml. n= 4-6 . \* p< 0,05 Vs WT.

#### 5.1.4. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO SANGUE

A leucopenia é um parâmetro clínico normalmente associado à infecção por CHIKV. Foram feitas contagens de leucócitos totais e diferenciais, os resultados para camundongos WT demonstram uma leucopenia no dia 3 p.i. seguido de aumento do número de leucócitos no dia 14 com retorno aos níveis basais no dia 21 p.i.. A contagem diferencial de neutrófilos e monócitos não apresentou alterações significativas, quando comparado ao não infectado (tempo 0) em camundongos WT, enquanto nos linfócitos, foi observado uma diminuição da contagem com 3 dias e aumento no 7º dia p.i.. Os animais  $CCR2^{-/-}$  apresentam um perfil diferente de contagem de leucócitos, em resposta a infecção, com aumento do número de leucócitos totais após 1 e 7 dias de infecção, caracterizado por um aumento de monócitos e linfócitos no 1º dia e aumento de linfócito com 7 dias p.i., quando comparados ao tempo 0, para o grupo  $CCR2^{-/-}$  também não foram observadas alterações na contagem de neutrófilos (Figura 14 A-D).



**Figura 14: Contagem total e diferencial de leucócitos sanguíneos durante a infecção pelo CHIKV em camundongos WT e CCR2<sup>-/-</sup>.**

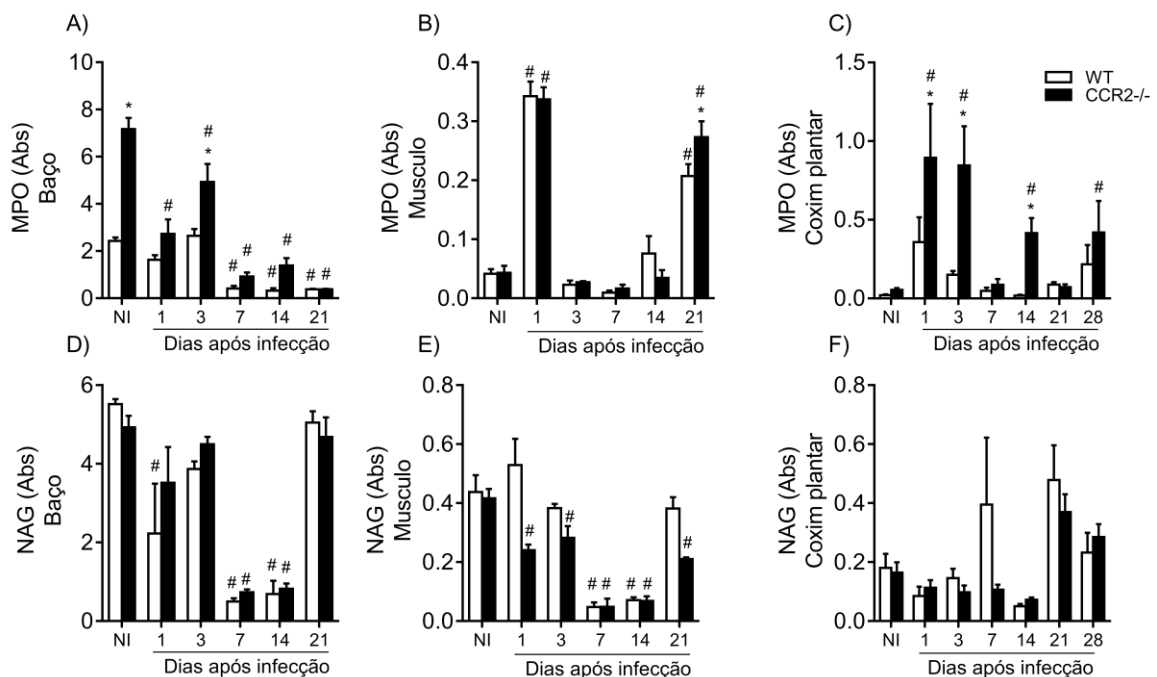
Os camundongos WT ou CCR2<sup>-/-</sup> foram infectados com o CHIKV 10<sup>6</sup> PFU/50μL em PBS. Os parâmetros hematológicos: (A) Contagem total de leucócitos e Contagem diferencial de leucócitos (B) Neutrófilo, (C) Monócito e (D) Linfócito foram avaliados no sangue dos animais por até 21 dias p.i. n=4-5 animais. \*p < 0,05 Vs WT, # p < 0,05 Vs tempo 0 (antes da infecção).

### 5.1.5. ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILO E MACRÓFAGO

Em seguida, buscamos avaliar o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para diversos tecidos alvo para a infecção pelo CHIKV através da presença das enzimas mieloperoxidase (MPO), presente em neutrófilos, e N-acetilglicosaminidase (NAG), presente principalmente em macrófagos. Para camundongos WT foi observado uma diminuição de MPO, no baço, nos tempos de 1 e 3 dias p.i.. No músculo foi observado o aumento dessa enzima nos dias 1 e 21 p.i., enquanto no coxim plantar

não foram observadas alterações. As medidas de NAG apresentaram diminuição nos dias 1, 7 e 14 no baço e nos dias 7 e 14 no músculo, enquanto no coxim plantar também não foram observadas diferenças.

Em camundongos *ccr2*<sup>-/-</sup> foi observado uma maior concentração de MPO, no baço, em animais não infectados, quando comparado a camundongos WT, com diminuição dos níveis nos tempos 7, 14 e 21 dias p.i., enquanto no músculo foi observado aumento de MPO, apenas nos dias 1 e 21 p.i., assim como observado para o grupo WT. O grupo *CCR2*<sup>-/-</sup> também apresentou aumento de MPO no coxim plantar, nos tempos 1, 3, 7 e 28 dias p.i.. As medidas de NAG para o grupo *CCR2*<sup>-/-</sup> apresentaram resultados semelhantes ao grupo WT, com diminuição de NAG no baço com 7 e 14 dias, no músculo a partir de 1 até 21 dias p.i. e sem alterações significativas no coxim plantar, como podem ser observados na Figura 15.

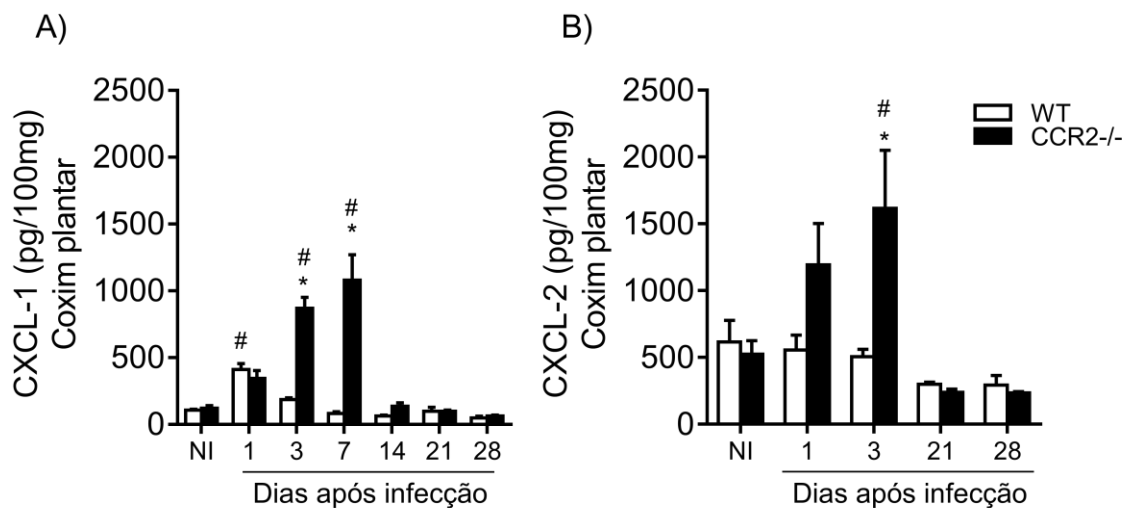


**Figura 15: Avaliação de MPO e NAG durante infecção por CHIKV em camundongos WT e *CCR2*<sup>-/-</sup>.**

Os camundongos WT e *CCR2*<sup>-/-</sup> foram infectados com  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L de CHIKV. MPO e NAG do (A, D) Baço (B, E) Músculo (C, F) Coxim plantar foram quantificadas por ensaio enzimático. Os resultados são apresentados em absorbância (Abs). n=4-6 animais. \*p < 0,05 Vs WT, # p < 0,05 Vs NI.

### 5.1.6. NÍVEIS DE QUIMIOCINAS EM CAMUNDONGOS WT E CCR2<sup>-/-</sup>

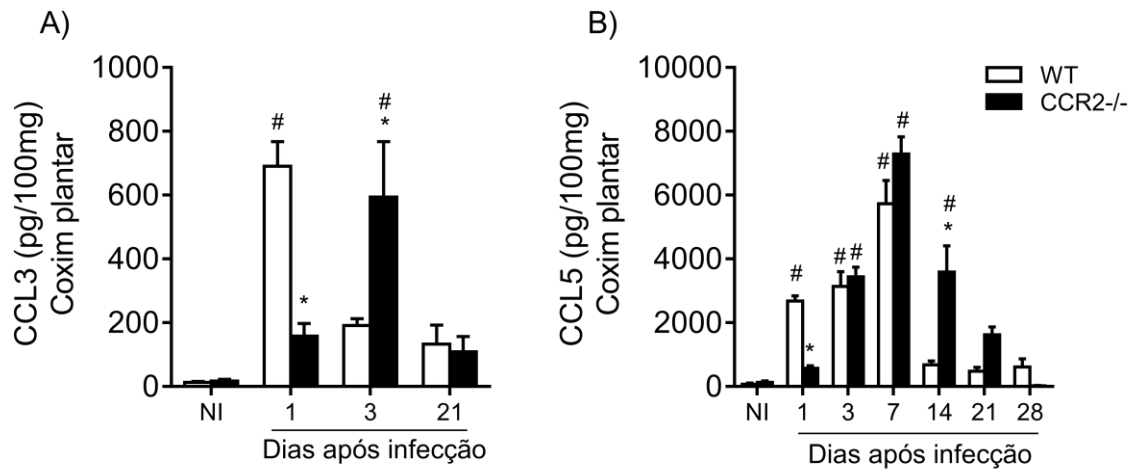
As quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 foram medidas, através de Elisa, no coxim plantar de animais WT e CCR2<sup>-/-</sup> com o objetivo de verificar se a produção destas quimiocinas está relacionada ao aumento de MPO em animais CCR2<sup>-/-</sup>. Os resultados encontrados demonstram uma produção aumentada de CXCL-1 nos animais WT no dia 1 p.i., com retorno aos níveis basais no 3º dia e sem alterações na concentração de CXCL-2, quando comparado ao seu controle, não infectado. Os animais CCR2<sup>-/-</sup>, entretanto, apresentaram um aumento mais tardio de CXCL-1 nos dias 3 e 7 p.i. e aumento de CXCL-2 no dia 3 (Figura 16).



**Figura 46: Produção de CXCL-1 e CXCL-2 no coxim plantar de animais pós infecção por CHIKV.**

Os camundongos WT e CCR2<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50µL de CHIKV, anestesiados e eutanasiados para a coleta do coxim plantar nos dias descritos. (A) CXCL-1, (B) CXCL-2 foram quantificadas por ELISA. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. n= 5-6. \* p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs NI.

Foi observado também, um aumento das quimiocinas CCL3 e CCL5 no grupo WT no dia 1 p.i., sendo que CCL5 ainda foi observada em níveis aumentados nos dias 3 e 7 p.i.. Porém, nos animais CCR2<sup>-/-</sup>, foi observado um aumento de ambas as quimiocinas em períodos mais tardios, sendo CCL3 apenas com 3 dias p.i. e CCL5 com 3, 7 e 14 dias p.i. (Figura 17).



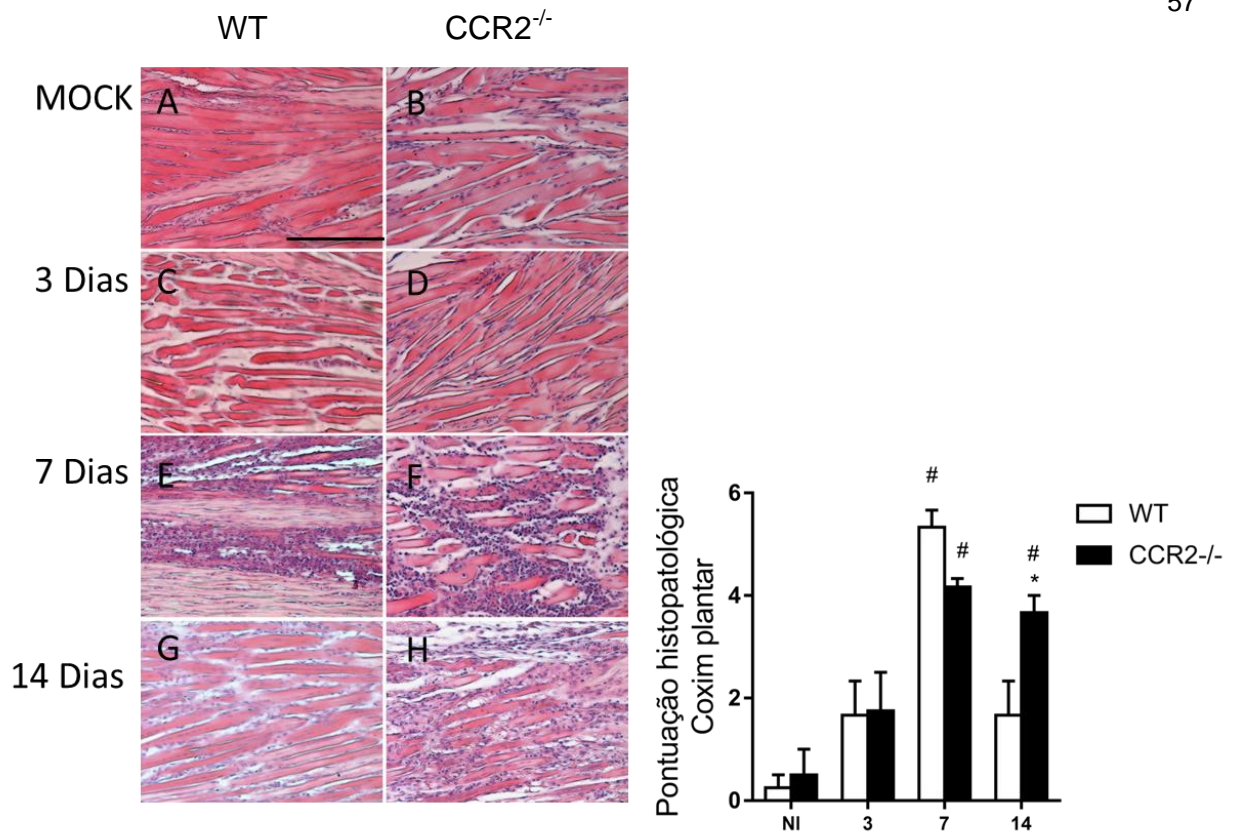
**Figura 57: Produção de CCL3 e CCL5 em coxim plantar de animais WT e CCR2<sup>-/-</sup> infectados por CHIKV.**

Os camundongos da linhagem C57BL/6j WT e CCR2<sup>-/-</sup> foram infectados com o CHIKV 10<sup>6</sup> PFU/50μL em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta do coxim plantar nos dias descritos. (A) CCL3, (B) CCL5 foram quantificadas por ELISA. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. n= 5-6. \* p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs NI.

### 5.1.7. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA PATA

Uma vez que as análises de MPO/NAG e das quimiocinas foram aumentadas em animais deficientes para CCR2, foi avaliado o infiltrado e dano tecidual na pata desses camundongos, através de análises histopatológicas. Em camundongos WT, foi encontrado dano tecidual, com aumento do score histopatológico com 7 dias p.i., retornando aos níveis basais com 14 dias, enquanto no grupo CCR2<sup>-/-</sup> houve aumento do score com 7 dias, porem este aumento permaneceu no tempo de 14 dias p.i., como pode ser observado na Figura18.



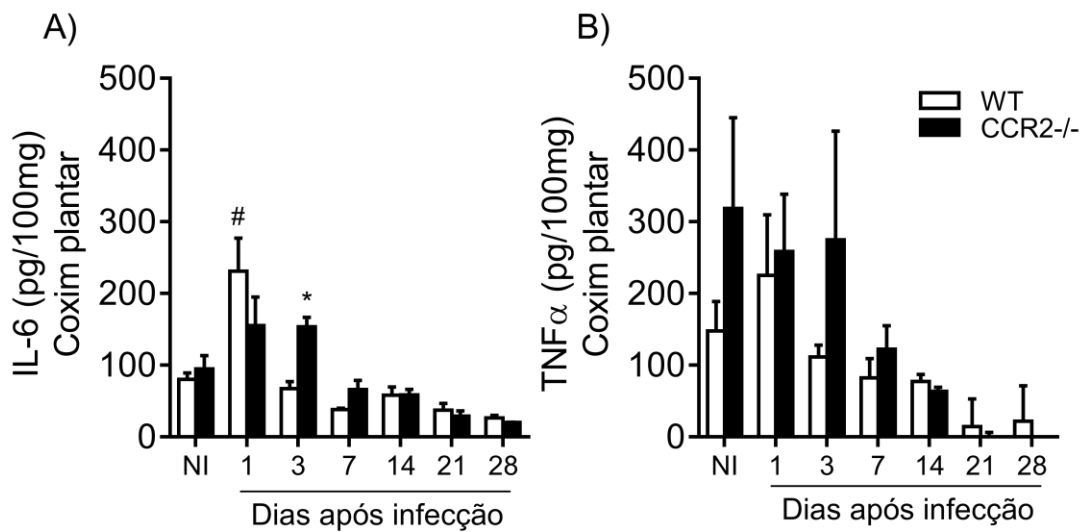


**Figura 18: Pontuação histopatológica e imagens representativas após infecção por CHIKV.**

Camundongos WT e CCR2<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50μL de CHIKV. Em (A) animais WT não infectados ou tempo 0; (B) animais CCR2<sup>-/-</sup> não infectados ou tempo 0; (C) 3 dias p.i. animais WT; (D) animais CCR2<sup>-/-</sup> 3 dias p.i.; (E) WT 7 dias pós infecção; (F) CCR2<sup>-/-</sup> 7 dias p.i.; (G) WT 14 dias p.i.; (H) CCR2<sup>-/-</sup> 14 dias. n = 3. \* p < 0,05 Vs WT, # p < 0,05 Vs 0. A barra, na prancha histológica, representa 50μm.

#### 5.1.8. NÍVEIS DE CITOCINA IL-6 E TNF

Os níveis das citocinas, IL-6 e TNF-α também foram avaliados no coxim plantar de animais WT e CCR2<sup>-/-</sup> durante a cinética de infecção por CHIKV. Houve aumento de IL-6 no grupo de animais WT, com 1 dia p.i. e não foram observadas alterações na concentração de IL-6 nos camundongos CCR2<sup>-/-</sup>, Figura 19-A. Para os níveis de TNF-α não foram observadas alterações estatisticamente significativas, nos tempos avaliados, para ambos os grupos (WT e CCR2<sup>-/-</sup>), Figura 19-B.



**Figura 19: Produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  no coxim plantar de animais WT e CCR2<sup>-/-</sup> infectados por CHIKV.**

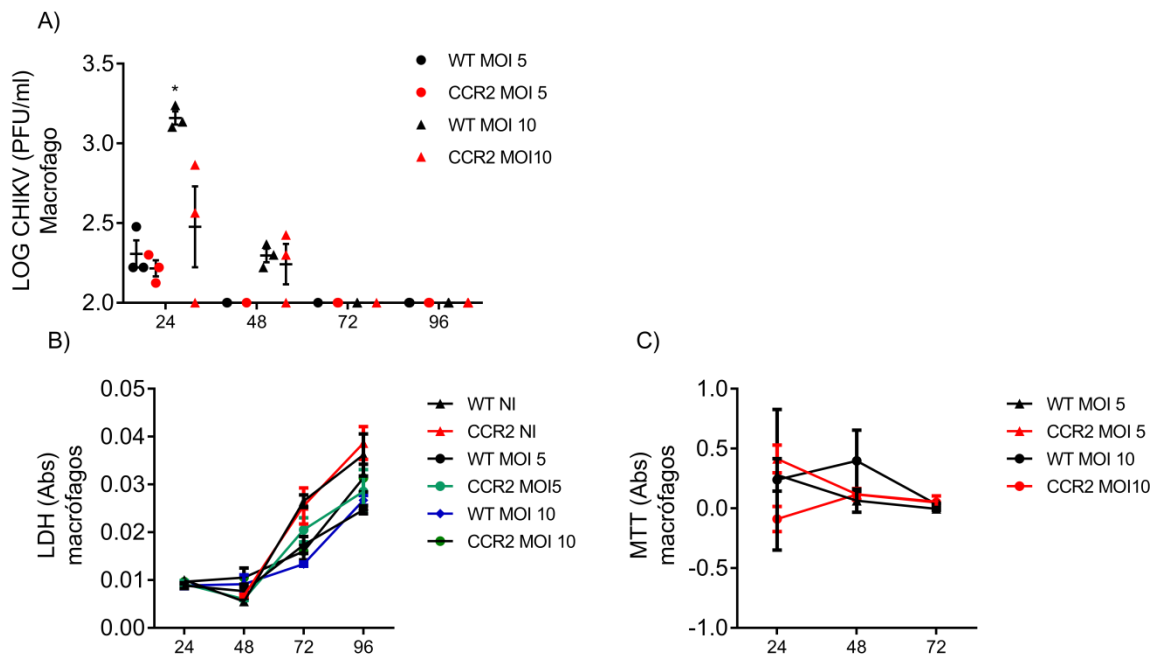
Camundongos WT e CCR2<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50 $\mu$ L de CHIKV. (A) IL-6 e (B) TNF $\alpha$  foram quantificadas, no coxim plantar, por ELISA. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. n= 5-6. \* p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs NI.

### 5.1.9. CULTURA PRIMÁRIA

Buscando entender os mecanismos associados às alterações observadas em animais deficientes para o receptor CCR2, foram feitas análises in vitro utilizando células da medula óssea de animais WT e CCR2<sup>-/-</sup>. Estas células foram diferenciadas em macrófagos para análise de carga viral e viabilidade celular.

Inicialmente, a carga viral em macrófagos primários de animais WT e CCR2<sup>-/-</sup> foi realizada. Os resultados para o grupo WT demonstram a recuperação de vírus nos tempos de 24 e 48 horas p.i, sendo a recuperação de vírus maior com MOI de 10, no tempo de 24h e com 48h apenas na MOI de 10 foi recuperado vírus. Da mesma forma, foram recuperados vírus no grupo CCR2<sup>-/-</sup> nos tempos de 24 e 48h, com maior título de vírus na MOI de 10, porem, com 24h na MOI de 10, foi observado uma menor quantidade de vírus, quando comparado ao grupo WT, como observado na Figura 20-A. Foi analisada, ainda, a medida de LDH e MTT a fim de avaliar o dano/efeito citopático causado pelo vírus nestas células. Os resultados demonstram

que não foram observadas alterações nestes ensaios para os tempos analisados, 24, 48, 72 e 96h (Figura 6 B-C).



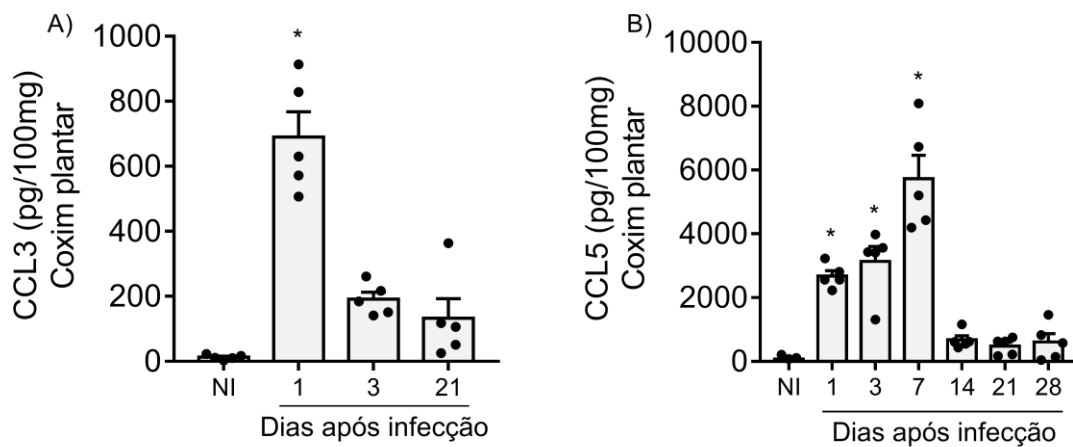
**Figura 6: Viabilidade e carga viral em macrófagos de cultura primária de animais WT e CCR2<sup>-/-</sup>.**

Os camundongos da linhagem C57BL/6 WT e CCR2<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50µL de CHIKV, anestesiados e eutanasiados para a coleta de células da medula, que foram cultivadas, diferenciadas e mantidas em cultura para as análises acima. O (A) Título viral foi obtido pela coleta do sobrenadante de células infectadas após os períodos indicados, (B) LDH e (C) MTT foram quantificadas por ensaio enzimático para avaliar viabilidade. Os resultados são apresentados como unidade formadora de placa por mL (PFU/mL). n= 5-6. \* p< 0,05 Vs WT.

## 5.2. PAPEL DO RECEPTOR CCR5 FRENTE À INFECÇÃO POR CHIKV

### 5.2.1. PERFIL DE QUIMIOCINAS E RECEPTOR

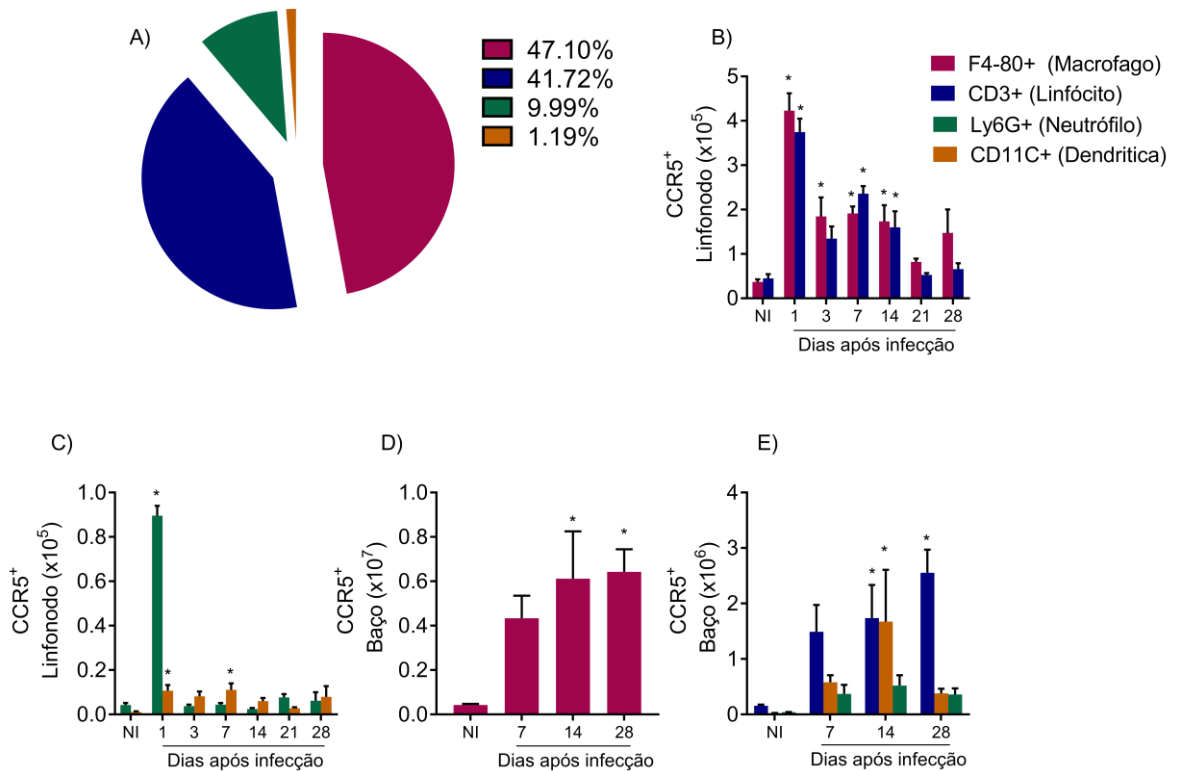
Através do ensaio imunoenzimático, ELISA, foram medidas as concentrações de quimiocinas relacionadas ao receptor CCR5. Com 1 dia p.i. é possível observar um aumento significativo nos valores de CCL3, mantendo os níveis basais com 3 e 21 dias, Figura 21-A. Nos dias 1, 3 e 7 p.i. são observados aumentos significativos de CCL5 quando comparados ao grupo de animais não infectado, Figura 21-B.



**Figura 21: Níveis de CCL3 e CCL5 durante cinética de infecção por CHIKV.**

Os camundongos WT foram infectados por via intraplantar com  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L de CHIKV. Níveis de CCL2 foram quantificadas por ELISA no coxim plantar. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. NI= não infectado. n= 5, \* p< 0,05 Vs NI.

A Figura 22-A mostra a porcentagem de CCR5<sup>+</sup> dentro de cada subpopulação estudada, é possível observar uma predominância de macrófagos e linfócitos, sendo aproximadamente 47 e 42%, respectivamente. Na Figura 22-B é observado um aumento de macrófagos CCR5<sup>+</sup>, no linfonodo, no dia 1 p.i., quando comparado ao grupo controle (NI), e este aumento foi mantido até o dia 14 p.i., retornando aos níveis basais no dia 21 p.i. Os linfócitos apresentaram perfil semelhante, com células CCR5<sup>+</sup> nos dias 1, 7 e 14 p.i.. Os neutrófilos apresentaram aumento de população CCR5<sup>+</sup> no dia 1 p.i., enquanto células dendríticas apresentaram nos dias 1 e 7 p.i., no linfonodo (Figura 22-C). Já no baço, houve aumento da porcentagem de macrófagos, assim como linfócitos, expressando CCR5 nos dias 14 e 21 p.i., enquanto nas células dendríticas houve um aumento apenas com 14 dias p.i. e não foi observada alteração de neutrófilos CCR5<sup>+</sup> neste órgão (Figura 22 D-E).

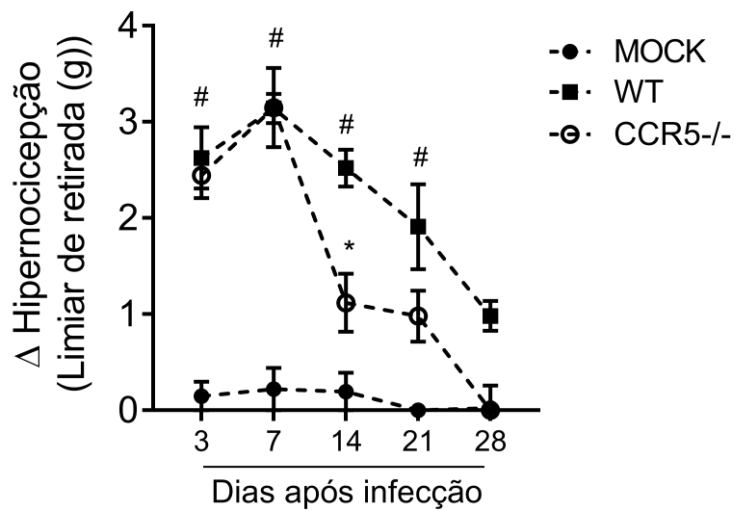


**Figura 22: Expressão de CCR5 em leucócitos do linfonodo e baço durante cinética de infecção por CHIKV.**

Os camundongos WT foram infectados com o CHIKV pela injeção i.pl. de  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L. (A) Fração em porcentagem (%) da média do número de células CCR5<sup>+</sup> no dia 1 p.i. no linfonodo; (B) Macrófago e linfócito CCR5<sup>+</sup> no linfonodo, (C) Neutrófilo e células dendríticas CCR5<sup>+</sup> no linfonodo, (D) Macrófagos CCR5<sup>+</sup> no baço, (E) Linfócitos, neutrófilos e células dendríticas CCR5<sup>+</sup> no baço. n=4-5 animais. \* p < 0,05 Vs NI.

### 5.2.2. MEDIDA DE HIPERNOCICEPÇÃO

Uma vez que houve o aumento da expressão do receptor CCR5 e de suas quimiocinas ligantes (CCL3 e CCL5) durante a infecção pelo CHIKV, o próximo passo foi avaliar a participação do receptor CCR5 na patogênese da infecção por CHIKV. Os resultados mostrados na Figura 23 foram obtido através da medida de hipernocicepção de animais WT e CCR5<sup>-/-</sup> durante a cinética de infecção pelo CHIKV. É possível observar que os animais WT mantêm o perfil de hipernocicepção até 21 dias, enquanto os animais CCR5<sup>-/-</sup> apresentam alteração, com resposta hipernociceptiva apenas nos tempos iniciais de infecção, com 3 e 7 dias p.i

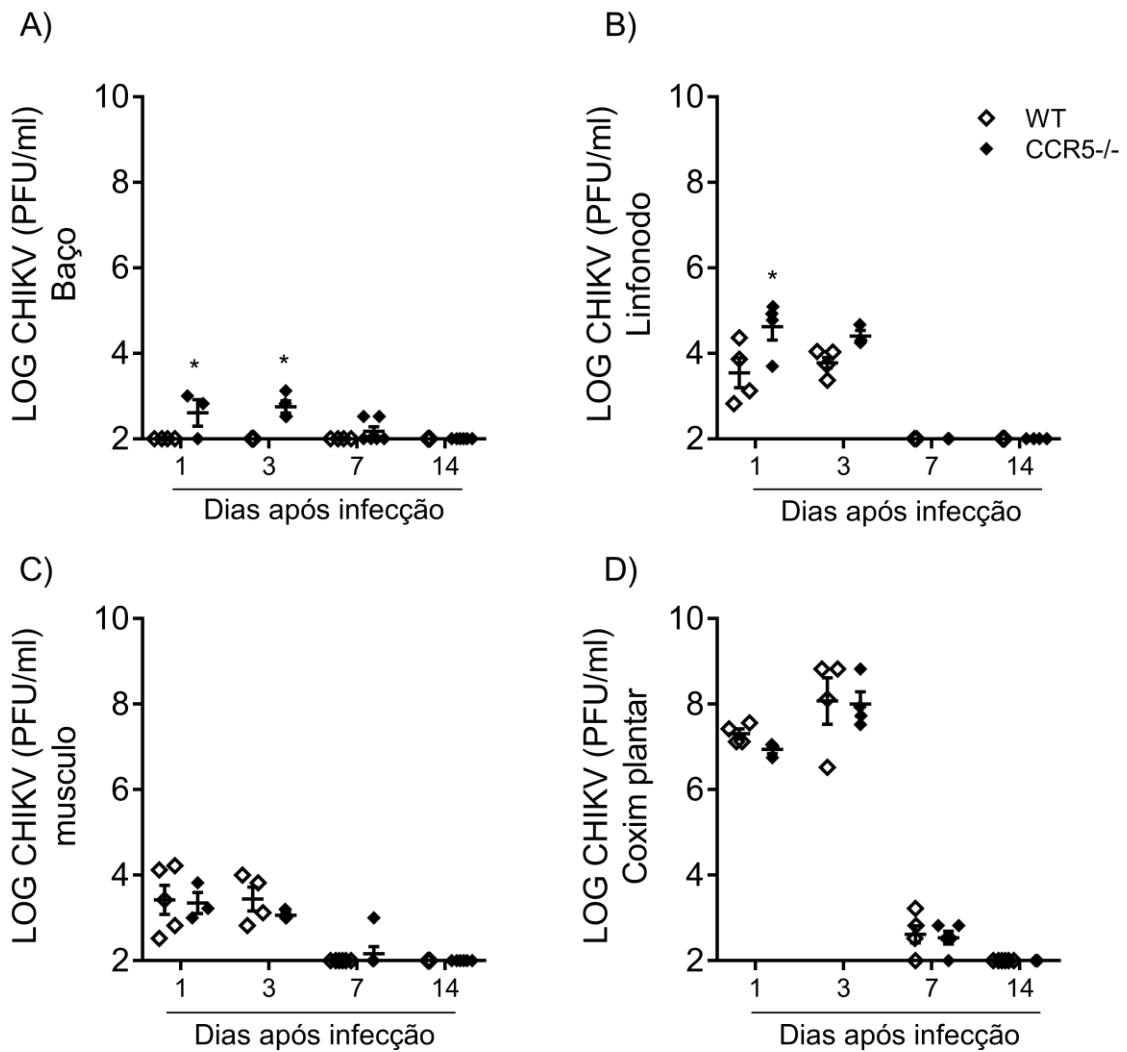


**Figura 23: Avaliação da hipernociceção articular inflamatória em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup>.**

Camundongos WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50MI de CHIKV e a hipernociceção articular foi avaliada durante 28 dias. Os camundongos controle (Mock) receberam injeção de PBS e foram igualmente avaliados. n= 5-6 animais. \* p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs Mock

### 5.2.3. CARGA VIRAL

A carga viral viável foi recuperada por ensaio de placa de lise pode-se observar a recuperação de vírus em diversos tecidos, sendo eles baço, músculo, linfonodo e pata. Os animais CCR5 apresentaram um aumento na carga viral no baço e linfonodo, quando comparados ao grupo WT, no baço, foram observados aumento de título viral, nos dias 1 e 3 p.i. e no linfonodo no dia 1 p.i.. Não houve alteração da carga viral no músculo e pata entre os grupos avaliados, como pode ser observado na Figura 24.

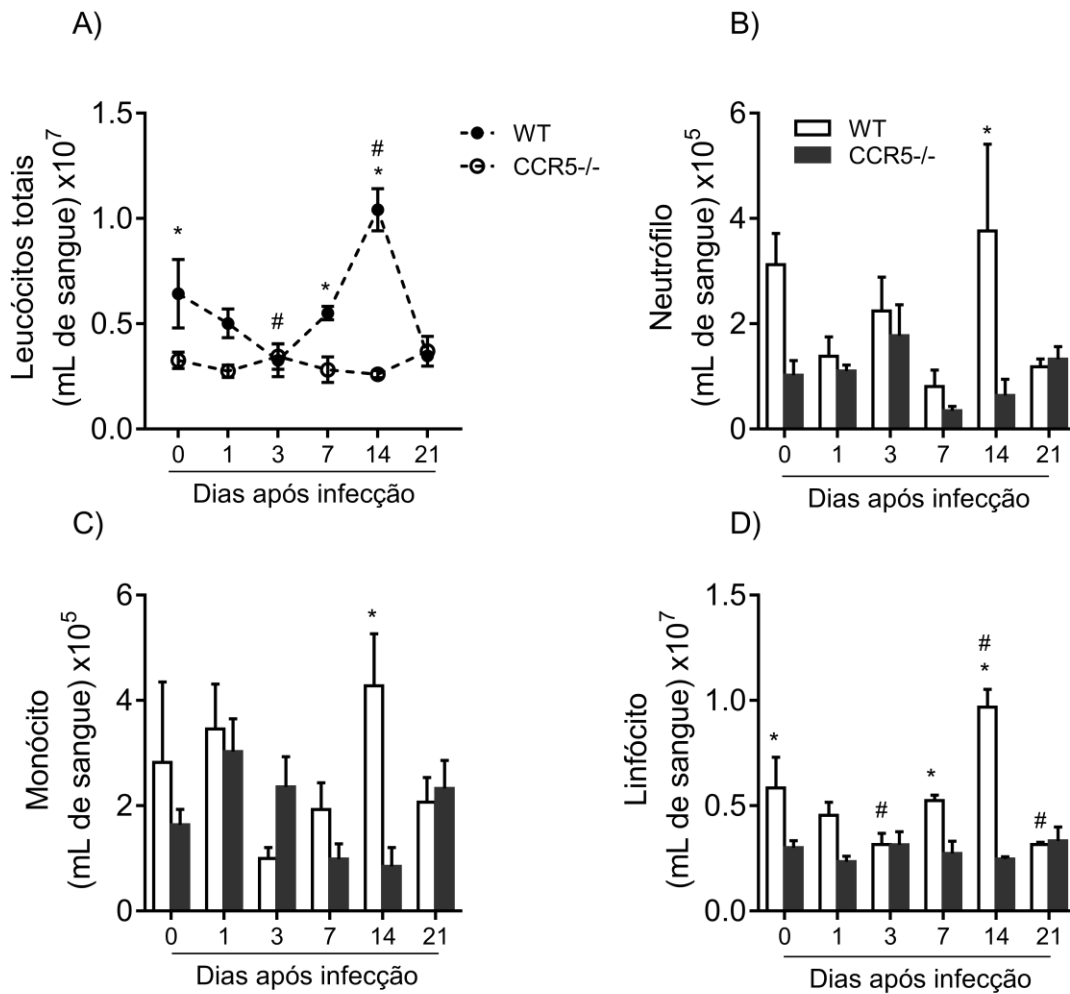


**Figura 24: Carga viral viável após infecção pelo CHIKV em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup>.**

Camundongos WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados pela injeção i.pl. de 10<sup>6</sup> PFU/50μL com CHIKV. A quantificação do título viral foi obtida por titulação e plaqueamento das amostras usando células permissivas à infecção. Os resultados são apresentados como PFU por mg de tecido. n= 4-6 . \* p< 0,05 Vs WT.

#### 5.2.4. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO SANGUE

Camundongos CCR5<sup>-/-</sup> não apresentaram alteração da contagem de leucócitos totais sanguíneos ou de contagem diferencial, quando comparados ao tempo 0, diferente do grupo WT, que apresenta linfocitopenia com 3 dias p.i., Figura 25.



**Figura 25: Contagem total e diferencial de células sanguíneas em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup> após infecção pelo CHIKV.**

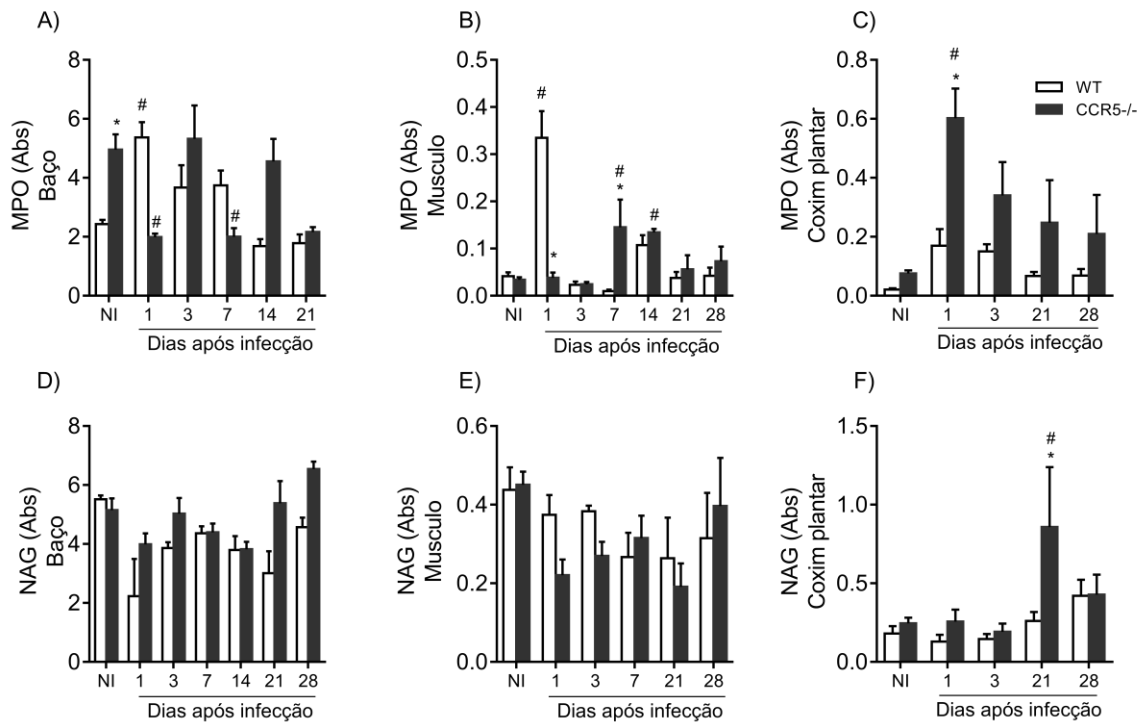
Camundongos C57BL/6 WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50MI de CHIKV e o sangue coletado durante 21 dias para análises hematológicas. Os parâmetros hematológicos: (A) Contagem total de leucócitos e Contagem diferencial de leucócitos (B) Neutrófilo, (C) Monócito e (D) Linfócito foram avaliados no sangue dos animais por até 21 dias p.i. n=4-5 animais. \*p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs tempo 0 (antes da infecção).

### 5.2.5. ENSAIOS ENZIMÁTICOS PARA DETECÇÃO INDIRETA DE NEUTRÓFILO E MACRÓFAGO

Através de ensaios enzimáticos, foram realizadas medidas de MPO e NAG em camundongos WT e CCR5<sup>-/-</sup>. Foi observado um aumento de MPO no baço de animais CCR5<sup>-/-</sup> não infectados, quando comparados ao grupo WT, os níveis da enzima diminuíram após infecção, nos tempos de 1 e 7 dias p.i. (Figura 26-A). No



músculo, foi observado o aumento da enzima no dia 7 e 14 p.i., enquanto que no coxim plantar foi observado aumento de MPO apenas para o grupo  $CCR5^{-/-}$  com 1 dia p.i. (Figura 26 B-C). O aumento de NAG foi observado no coxim plantar dos animais  $CCR5^{-/-}$  apenas com 21 dia p.i. (Figura 726 D-F).

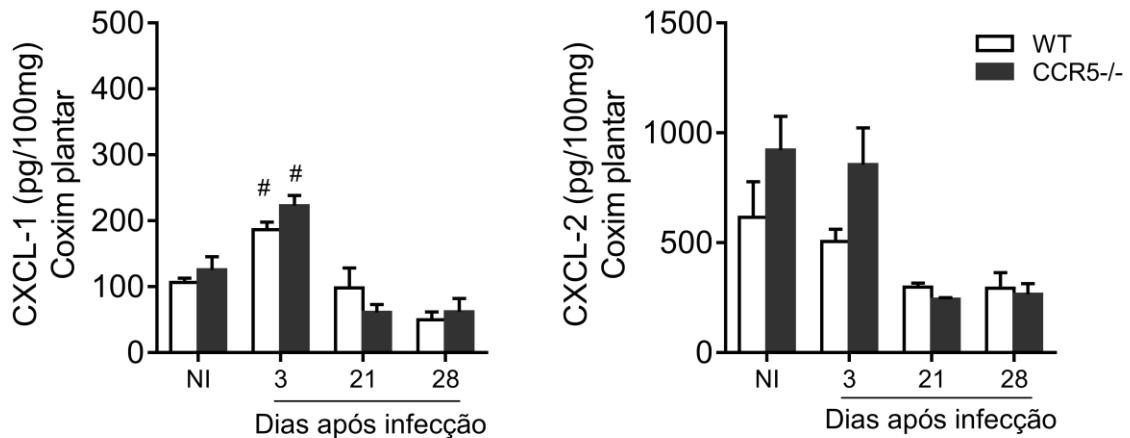


**Figura 76: Níveis de MPO e NAG em animais WT e  $CCR5^{-/-}$ .**

Os camundongos WT e  $CCR5^{-/-}$  foram infectados com  $10^6$  PFU/50 $\mu$ L de CHIKV. MPO e NAG do (A, D) Baço (B, E) Músculo (C, F) Coxim plantar foram quantificadas por ensaio enzimático. Os resultados são apresentados em absorvância (Abs). n=4-6 animais. \*p < 0,05 Vs WT, # p < 0,05 Vs NI.

### 5.2.6. NÍVEIS DE QUIMIOCINAS EM CAMUNDONGOS WT E $CCR5^{-/-}$

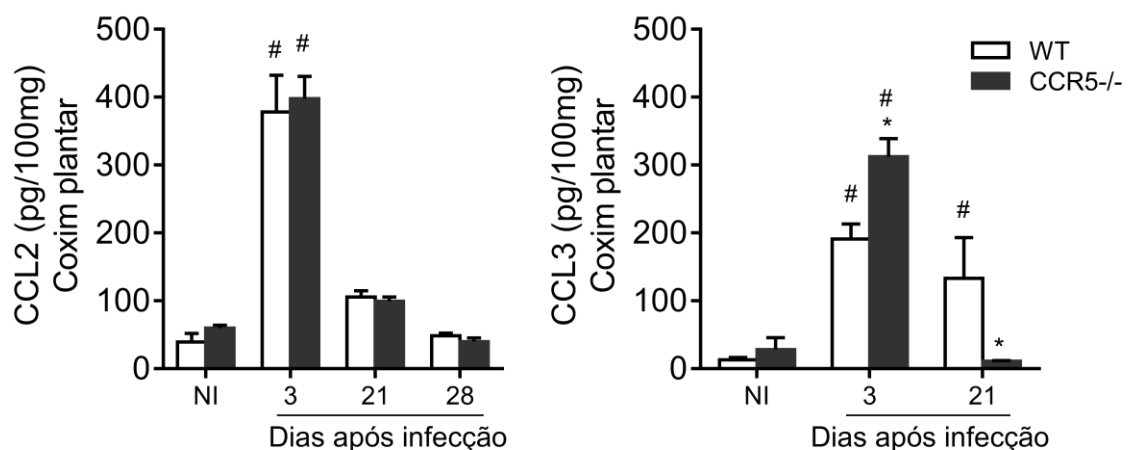
A produção de CXCL-1 e CXCL-2 também foram avaliadas para animais WT e  $CCR5^{-/-}$ . Com 3 dias p.i. foi observado um aumento nos valores de CXCL-1 no coxim plantar de ambos os grupos avaliados. Para CXCL-2 não foram observadas alterações como pode ser observado na Figura 27.



**Figura 27: Níveis de CXCL-1 e CXCL-2 em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup>.**

Os camundongos da linhagem C57BL/6 WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50μL de CHIKV, anestesiados e eutanasiados para a coleta do coxim plantar nos dias descritos. (A) CXCL-1, (B) CXCL-2 foram quantificadas por ELISA. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. n= 5-6. \* p < 0,05 Vs WT, # p < 0,05 Vs NI.

A infecção pelo CHIKV induziu aumento das quimiocinas CCL2 e CCL3. Com 3 dias p.i. foi observado aumento da quimiocina CCL2 para ambos os grupos, WT e CCR5<sup>-/-</sup>. Após infecção também foi observado aumento de CCL3 em camundongos WT com 3 e 21 dias, enquanto o grupo CCR5<sup>-/-</sup> não apresenta aumento no tempo 21 p.i., Figura 28.



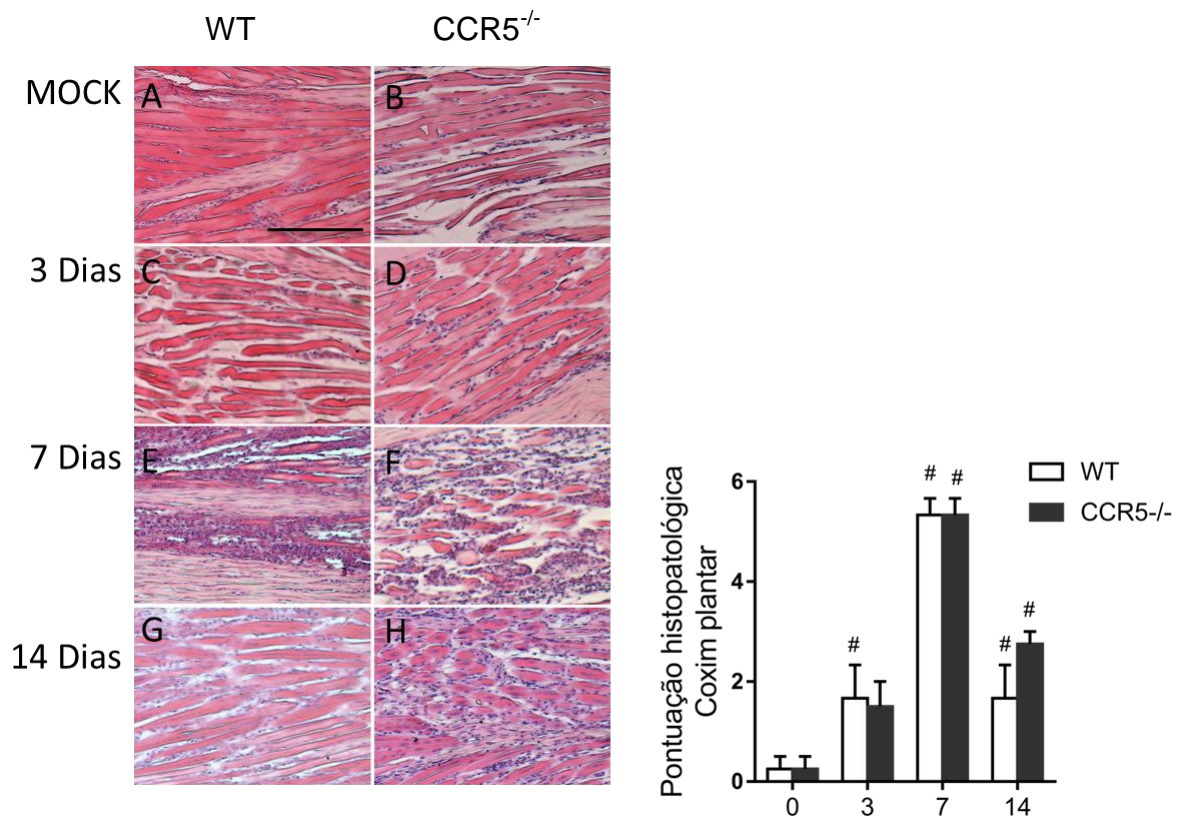
**Figura 28: Níveis de CCL2 e CCL3 em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup> após infecção pelo CHIKV.**

Os camundongos WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados com o CHIKV 10<sup>6</sup> PFU/50μL em PBS, anestesiados e eutanasiados para a coleta do coxim plantar nos dias descritos. (A) CCL3, (B) CCL5 foram

quantificadas por ELISA. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. n= 5-6. \* p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs NI.

### 5.2.7. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA PATA

A análise histopatológica foi feita para avaliar o infiltrado e dano tecidual na pata de animais WT e CCR5<sup>-/-</sup>, foi observado aumento no infiltrado e presença de dano tecidual nos animais WT com 3, 7 e 14 dias p.i., enquanto animais CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram aumento do score histopatológico com 7 e 14 dias p.i., não havendo diferença entre os grupos WT e CCR5<sup>-/-</sup>, Figura 29.

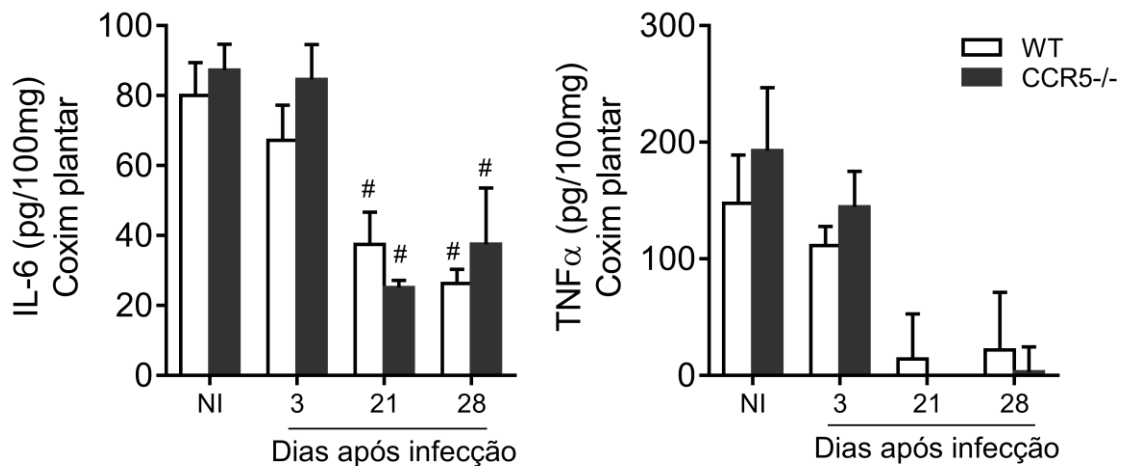


**Figura 89: Escore e imagens representativas da análise histopatológica após infecção por CHIKV em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup>.**

Camundongos C57BL/6 WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50μL de CHIKV, anestesiados e eutanasiados para a coleta da pata. Em (A) animais WT não infectados ou tempo 0; (B) animais CCR5<sup>-/-</sup> não infectados ou tempo 0; (C) 3 dias p.i. animais WT; (D) animais CCR5<sup>-/-</sup> 3 dias p.i.; (E) WT 7 dias pós infecção; (F) CCR5<sup>-/-</sup> 7 dias p.i.; (G) WT 14 dias p.i.; (H) CCR5<sup>-/-</sup> 14 dias. n= 3. \* p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs 0. A barra, na prancha histológica, representa 50μm.

### 5.2.8. NÍVEIS DE CITOCINA IL-6 E TNF

A Figura 30 demonstra que não foi observado aumento nos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  para animais WT e CCR5<sup>-/-</sup> nos tempos avaliados, de 3, 21 e 28 dias após a infecção pelo CHIKV.

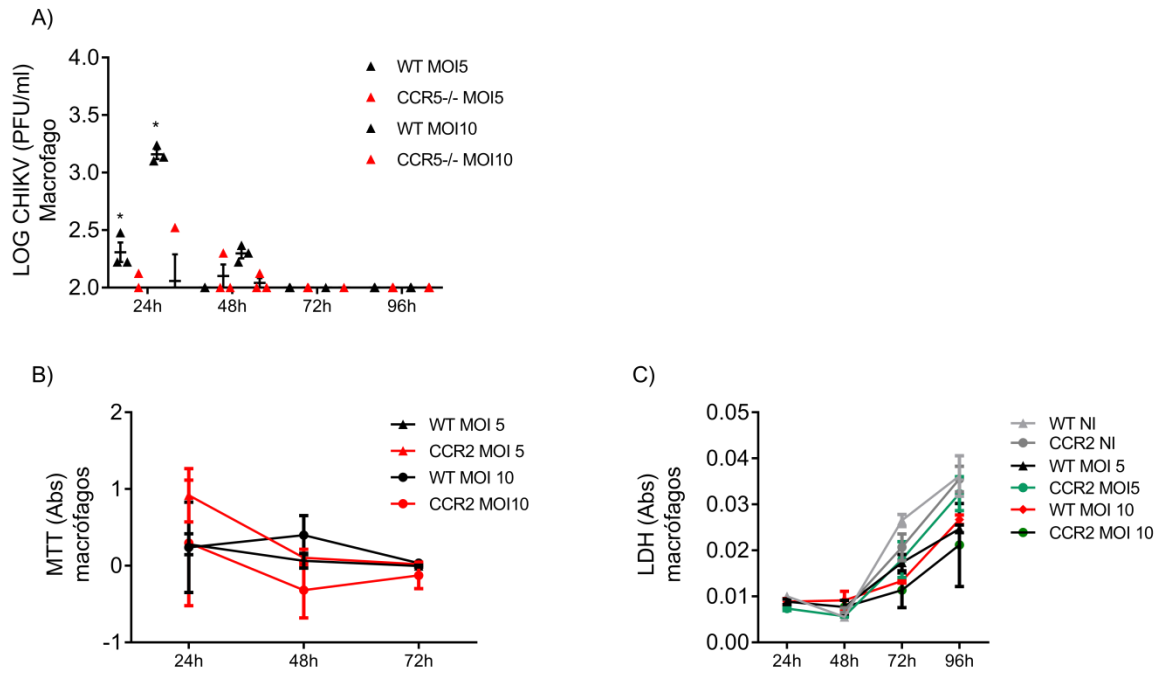


**Figura 30: Níveis de IL-6 e TNF $\alpha$  em animais WT e CCR5<sup>-/-</sup> após infecção pelo CHIKV.**

Camundongos C57BL/6 WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50 $\mu$ L de CHIKV, anestesiados e eutanasiados para a coleta do coxim plantar nos dias descritos. (A) IL-6 e (B) TNF $\alpha$  foram quantificadas por ELISA. Os resultados são apresentados como pg por 100mg de tecido. n= 5-6. \* p< 0,05 Vs WT, # p< 0,05 Vs NI.

### 5.2.9. CULTURA PRIMÁRIA

Os resultados mostram uma recuperação de carga viral viável para o grupo CCR5<sup>-/-</sup> nos tempos 24 e 48 horas, com valores menores que o observado para o grupo WT no tempo de 24h na MOI de 5 e de 10. Foi analisada, ainda, a viabilidade celular por medida de LDH e MTT. Os resultados demonstram que não houve alterações nestes ensaios para os tempos analisados, 24, 48, 72 e 96h, Figura 31.



**Figura 9: Viabilidade celular e carga viral em macrófagos de cultura primária de animais WT e CCR5<sup>-/-</sup>.**

Os camundongos WT e CCR5<sup>-/-</sup> foram infectados com 10<sup>6</sup> PFU/50µL de CHIKV, anestesiados e eutanasiados para a coleta de células da medula, que foram cultivadas, diferenciadas e mantidas em cultura para as análises acima. O (A) Título viral foi obtido pela coleta do sobrenadante de células infectadas após os períodos indicados, (B) LDH e (C) MTT foram quantificadas por ensaio enzimático para avaliar viabilidade. Os resultados são apresentados como unidade formadora de placa por mL (PFU/mL). n= 5-6. \* p< 0,05 Vs WT.

## 6. DISCUSSÃO

O vírus Chikungunya é considerado endêmico no Brasil, abrangendo todo o território nacional. A doença causada pelo CHIKV possui sinais semelhantes aos de outras arboviroses de importância clínica, como a dengue, porém, a febre chikungunya possui como principal fator patogênomico uma artralgia debilitante que pode durar de meses a anos, o que a coloca, juntamente com a dengue, como uma das arboviroses de maior importância clínica do país. Porém, ainda, pouco se sabe sobre os mecanismos celulares e moleculares 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.

A CHIKF é uma doença febril composta por uma fase aguda e uma crônica. Na fase aguda da doença os sintomas incluem febre, náuseas, dor nas costas, edema e artralgia simétrica, com achados laboratoriais como elevação de proteína C-reativa e leucopenia com linfopenia (Ministério da Saúde, 2017), que foram associados à viremia e a elevados níveis de citocinas com atividade pro-inflamatória, tais como IFN- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-15, e quimiocinas, como CCL2 (CHOW, A. et al., 2011). Enquanto a fase crônica da doença é caracterizada principalmente por dores articulares, que persistem por meses ou anos. O modelo experimental desenvolvido mimetiza vários aspectos da doença, incluindo linfopenia, aumento de quimiocinas e uma hipernocicepção prolongada, assim como recuperação de vírus em diversos tecidos. Estes achados também foram associados a um aumento de atividade pró-inflamatória, com intenso infiltrado de leucócitos e dano tecidual, observado no músculo de camundongos infectados.

A migração de leucócitos para o tecido inflamado é um fator importante do processo inflamatório e as quimiocinas tem papel chave neste processo. As quimiocinas são expressas por células residentes e leucócitos ativados e se ligam a receptores específicos expressos, principalmente, em leucócitos (LE, Y., et al., 2004). Os receptores de quimiocina abordados neste trabalho tem expressão predominante em monócitos e linfócitos T ativados (CCR2); monócitos, linfócitos T de memória e

células dendríticas imaturas (CCR5). Ainda, os receptores estudados podem se ligar e ser ativados por diversas quimiocinas liberadas durante o processo inflamatório, entre elas CCL2, CCL7, CCL8 e CCL12, que podem ligar e ativar o receptor CCR2, enquanto CCL3, CCL4, CCL5 e CCL8 podem se ligar ao receptor CCR5.

Durante a padronização do modelo de infecção pelo CHIKV foi observado um aumento expressivo das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5, relacionadas ao recrutamento de macrófagos e linfócitos (P.M. THAIANE, 2018 dissertação). No presente trabalho, além do aumento dessas quimiocinas, foi observado o aumento da expressão dos seus receptores relacionados: CCR2 e CCR5, especialmente durante a fase aguda da infecção. Mais especificamente, as análises de citometria de fluxo permitiram identificar as principais células expressando os receptores CCR2 e CCR5, que foram: macrófagos, linfócitos e em menor proporção neutrófilos e células dendríticas. Dados semelhantes foram observados por Matthias Mack e colaboradores 2001 onde, utilizando um modelo de nefrite demonstraram que o receptor CCR2 está presente principalmente em monócitos e linfócitos T de camundongos.

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; Messaoudi et al., 2013). 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, W. et al., 2015). De acordo, a doença músculoesquelética induzida por CHIKV foi mais grave em camundongos CCR2<sup>-/-</sup> (POO, Y. S. 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 artríticas por alfavirus.

No presente trabalho foram utilizados camundongos deficientes para os receptores de quimiocinas CCR2 e CCR5. Os resultados obtidos demonstram que a ativação destes receptores pode exercer um papel protetor durante o desenvolvimento da doença, uma vez que parâmetros inflamatórios, como produção de quimiocinas e o recrutamento de neutrófilos, foi aumentado em ambos os grupos de animais, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR5<sup>-/-</sup>.

A ausência do receptor, CCR2, foi associada a um maior recrutamento de neutrófilos, que pode ser observado pelos ensaios de MPO e reforçado pelo aumento da expressão de quimiocinas importantes no recrutamento destas células, como CXCL-1 e CXCL-2. Estes achados estão associados a um maior dano histopatológico observado nos animais CCR2<sup>-/-</sup> no sítio da infecção (pata) 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 (SHI, C., et al., 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.

Recentemente, foi demonstrado, que o receptor CCR5 está associado à replicação do DENV em macrófagos murinos e que camundongos CCR5<sup>-/-</sup> foram resistentes a doses letais do vírus (MARQUES, R. E. et al., 2015). No entanto, até o momento, não há estudos associando CCR5 à infecção pelo CHIKV. No presente trabalho, os animais CCR5<sup>-/-</sup>, apresentaram maior replicação viral em diversos órgãos, este achado pode estar associado à sinalização do receptor ou a falha no recrutamento de células e montagem do processo inflamatório, relacionado a este receptor, sendo necessários estudos aprofundados.



Apesar da resposta inflamatória exacerbada e aparentemente com falhas na resolução, foi observado, nos grupos de camundongos CCR2<sup>-/-</sup> e CCR5<sup>-/-</sup> diminuída hipernocicepção, quando comparados ao grupo WT. Enquanto animais WT apresentam hipernocicepção articular inflamatória prolongada, os camundongos CCR2<sup>-/-</sup> e CCR5<sup>-/-</sup> apresentaram hipernocicepção apenas nos dias iniciais de infecção, quando comparados ao grupo não infectado. Na literatura, pouco se discute sobre os mecanismos associados a gênese da dor causada pelo CHIKV, e o papel dos receptores CCR2<sup>-/-</sup> ou CCR5<sup>-/-</sup> e suas quimiocinas ligantes na hipernocicepção induzida pelo CHIKV ainda permanece por ser elucidado. Entretanto, sabe-se que a resposta dolorosa (noxica) está direta ou indiretamente relacionada à resposta inflamatória, visto que a migração de leucócitos associados à inflamação é responsável por secretar mediadores que produzem o estímulo que leva a dor (SHAVIT, Y. et al., 2006). Evidências têm sugerido que a função da resposta inflamatória na geração de dor não é limitada apenas a efeitos produzidos pela migração de leucócitos, acreditando-se que as 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 que essas moléculas podem desencadear efeitos em curto e longo prazo, com hiperexcitabilidade crônica e alterações na expressão fenotípica dos nociceptores, processamento anormal dos sinais nócicos e exacerbação dos processos de dor (WATKINS, L. R., et al., 2002; OBATA H. et al., 2006). Algumas quimiocinas e seus receptores têm sido implicadas neste aspecto, entre elas CCL2/CCR2 e CCL5. Alguns trabalhos mostram que o aumento da expressão de CCL2 ou CCR2 foi relacionado a modelos de dor neuropática (WU, X. B., et al., 2018), dor inflamatória e osteoartrite (HARTH, M.; NIELSON, W. R., 2019), visto que CCL2 está distribuída principalmente nos neurônios do gânglio da raiz dorsal e do corno dorsal da medula espinhal. 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 nócica. A quimiocina CCL5 por outro lado, está associada a neuropatias periféricas dolorosas associadas ao HIV-1, aumentando a entrada de cálcio nos neurônios sensitivos através do receptor CCR5 (BHANGOO, S. et al., 2007).

Os receptores de quimiocina frequentemente são associados à adsorção e replicação viral, sendo o CCR5 um exemplo de coreceptor de adsorção para o vírus HIV e no trabalho de Rafael E. Marques e colaboradores, 2015, ele mostra que este receptor está associado à replicação do vírus da Dengue. No presente trabalho foram utilizados macrófagos isolados e diferenciados de camundongos WT, CCR2<sup>-/-</sup> e CCR5<sup>-/-</sup> para avaliar eventuais alterações na infecção e replicação do CHIKV e apesar de não haver diferenças significativas nos testes de viabilidade celular após infecção, os grupos de células provenientes dos animais deficientes para ambos os receptores apresentaram menor carga viral recuperada do sobrenadante, no tempo de 24h, indicando que o receptor pode interferir nos tempos iniciais de replicação viral, sendo necessário avaliar tempos anteriores à 24h.

Por fim, o estudo dos mecanismos e mediadores envolvidos na resposta do hospedeiro durante a infecção pelo CHIKV se mostra extremamente necessário, visto que possibilitará a identificação de novos potenciais alvos terapêuticos. Este trabalho trouxe uma contribuição sobre a interação do vírus com o sistema imune do hospedeiro, colocando as quimiocinas como fatores importantes associados aos processos iniciais pós-infecção. Os receptores CCR2 e CCR5 mostraram desempenhar um papel protetor durante a patogênese da infecção pelo CHIKV, ao auxiliar na formação de uma resposta imune adequada, porém com ausência de hipernocicepção em camundongos deficientes, o que indica que o receptor pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento da hipernocicepção prolongada observada durante infecção por CHIKV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

ABDELNABI, R.; NEYTS, J.; DELANG, L. Towards antivirals against *Chikungunya virus*. **Antiviral Research**, v. 121, p. 59–68, 2015.

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. 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*. v. 12, n. 3, p. 38, 2007.

BRELOT, A.; CHAKRABARTI, L. A., CCR5 Revisited: How Mechanisms of HIV Entry Govern AIDS Pathogenesis. **J Mol Biol**. v. 17, n. 430(17), p. 2557-2589, 2018

BURT, F. J.; CHEN, W.; MINER, J. J.; LENSCHOW, D. J.; MERITS, A.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A.; RUDD, P. A.; TAYLOR, A.; HERRERO, L. J.; ZAID, A.; NG, L. F. P.; MAHALINGAM, S. *Chikungunya virus*: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. 107–117, 2017.

CASTRO, A. P. C. R.; LIMA, R. A.; NASCIMENTO, J. D. S. Chikungunya: vision of the pain clinician. **Revista Dor**, v. 17, n. 4, p. 299–302, 2016.

CHEN, K.; BAO, Z.; TANG, P.; GONG, W.; YOSHIMURA, T.; WANG, J. M. Chemokines in homeostasis and diseases. **Cellular and Molecular Immunology**, v.14, p. 1-11, 2017.

CHEN, W.; FOO, S.; TAYLOR, A.; LULLA, A.; MERITS, A.; HUESTON, L.; FORWOOD, M. R.; WALSH, N. C.; SIMS, N. A.; HERRERO, L. J.; MAHALINGAM, S. Bindarit an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein Synthesis, Protects against Bone Loss Induced by *Chikungunya virus* Infection. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 581–593, 2015.

CHOW, A.; HER, Z; ONG, E. K. S.; CHEN, J. M.; DIMATATAC, F.; KWEK, D. J. C.; BARKHAM, T.; YANG, H.; RÉNIA, L.; LEO, Y. S.; NG, L. F. P. Persistent Arthralgia

Induced by *Chikungunya virus* Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 2, p. 149–157, 2011.

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

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

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

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

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

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

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

GRYGORCZUK, S.; OSADA, J.; PARCZEWSKI, M.; MONIUSZKO, A.; ŚWIERBINSKA, R.; KONDRUSIK, M.; CZUPRYNA, P.; DUNAJ, J.; DABROWSKA, M.; PANCEWICZ, S. The expression of the chemokine receptor CCR5 in tick-borne encephalitis. **J Neuroinflammation**. v. 22, n. 13, p. 45, 2016.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q., AZEVEDO-PEREIRA, J. M. The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. 4, p. 967-76, 2011.

HARTH, M.; NIELSON, W. R. Pain and affective distress in arthritis: relationship to immunity and inflammation. **Expert Review of Clinical Immunology**. p. 1744-8409, 2019

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

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

HOORNWEG, T. E., et al., Dynamics of *Chikungunya Virus* Cell Entry Unraveled by Single-Virus Tracking in Living Cells. *Journal of Virology*, v. 90, n. 9, 2016.

HUSSAIN, K. M., et al., Establishment of a Novel Primary Human Skeletal Myoblast Cellular Model for *Chikungunya Virus* Infection and Pathogenesis, *Nature Reports*, 6:21406, 2016.

KHALID, A.; WOLFRAM, J.; FERRARI, I.; UM, C.; MAU, J.; YANG, Z.; ZHAO, Y.; FERRARI, M.; MA, X.; SHEN, H. Recent Advances in Discovering the Role of CCL5 in Metastatic Breast Cancer. **Mini Rev Med Chem**. v. 15, n. 13, p. 1063-72, 2015.

LABADIE, K.; LARCHER, T.; JOUBERT, C.; MANNIOUI, A.; DELACHE, B.; BROCHARD, P.; GUIGAND, L.; DUBREIL, L.; LEBON, P.; VERRIER, B.; et al., Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest.* v. 120, n. 3, p. 894-906, 2010.

LE, Y.; ZHOU, Y.; IRIBARREN, P.; WANG, J. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. ***Cell Mol Immunol.*** v. 1, n. 2, p. 95-104, 2004.

LIM, J. K.; MURPHY, P. M. Chemokine control of West Nile virus infection. ***Exp Cell Res.*** v. 10, n. 317(5), p. 569-74, 2011.

MARQUES, R. E.; GUABIRABA, R.; DEL SARTO, J. L.; ROCHA, R. F.; QUEIROZ, A. L.; CISALPINO, D.; MARQUES, P. E.; PACCA, C. C.; FAGUNDES, C. T.; MENEZES, G. B.; NOGUEIRA, M. L.; SOUZA, D. G.; TEIXEIRA, M. M. Dengue virus requires the CC-chemokine receptor CCR5 for replication and infection development. ***Immunology.*** v. 145, n. 4, p. 583-96, 2015.

MATTHIAS, M.; et al., Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. ***J Immunol.*** v. 1, n. 166(7), p. 4697-704, 2001.

MESSAOUDI, I.; VOMASKE, J.; TOTONCHY, T.; KREKLYWICH, C. N.; HABERTHUR, K.; SPRINGGAY, L.; BRIEN, J. D.; DIAMOND, M. S.; DEFILIPPIS, V. R.; STREBLOW, D. N. Chikungunya virus infection results in higher and persistent viral replication in aged rhesus macaques due to defects in anti-viral immunity. ***PLoS Negl Trop Dis.*** v. 25, n. 7(7), p. e2343, 2013.

MORRISON, T. E.; OKO, L.; MONTGOMERY, S. A.; et al. A mouse model of *Chikungunya virus*-induced musculoskeletal inflammatory disease: evidence of arthritis, tenosynovitis, myositis, and persistence. ***Am J Pathol,*** v. 178, p. 32–40, 2011.

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

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

OBATA, H.; EISENACH, J. C.; HUSSAIN, H.; BYNUM, T.; VINCLER, M. Spinal glial activation contributes to postoperative mechanical hypersensitivity in the rat. **The Journal of Pain**. v. 7, n. 11, p. 816-22, 2006.

OPPERMANN, M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. **Cell signal**, v. 16, n. 11, p. 1201-10, 2004.

PALOMINO, D. C.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein**, v.13, n. 3, p. 469-73, 2015.

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

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

RAHBAR, R.; MUROOKA, T. T.; HINEK, A. A.; GALLIGAN, C. L.; SASSANO, A.; YU, C.; SRIVASTAVA, K.; PLATANIAS, L. C.; FISH, E. N. Vaccinia virus activation of CCR5 invokes tyrosine phosphorylation signaling events that support virus replication. **Journal of Virology**. v. 80, n. 14, p. 7245-59, 2006.

RAHBAR, R.; MUROOKA, T. T.; FISH, E. N. Role for CCR5 in dissemination of vaccinia virus in vivo. **Journal of Virology**. v. 83, n. 5, p. 2226-36, 2009.

RENAULT, P., et al., A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, p. 727-31, 2007.

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

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

RULLI, N. E.; ROLPH, M. S.; SRIKIATKHACHORN, A.; ANANTAPREECHA, S.; GUGLIELMOTTI, A.; MAHALINGAM, S. Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute *Chikungunya virus* disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1026–1030, 2011.

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

SHAVIT, Y.; FRIDEL, K.; BEILIN, B. Postoperative pain management and proinflammatory cytokines: animal and human studies. **J Neuroimmune Pharmacol**. v. 1, n. 4, p. 443-51, 2006.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nat Rev Immunol**. v. 10, n. 11(11), p. 762-74, 2011.

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

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



Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica (SE) 53, 2014. **Boletim Epidemiológico**, v. 46, n. 3, 2015. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/19/2015-002---BE-at---SE-53.pdf>>

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 3, 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>>

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 35, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 45, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/10/2017-046-Publicacao.pdf>

Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 48, 2018. **Boletim Epidemiológico**, v. 49, n.57, 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/18/2018-064.pdf>

SILVA, L. A. and DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737–749, 2017.

SOLIGNAT, M.; GAY, B.; HIGGS, S.; BRIANT, L.; DELAVAUUX, C. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, v.25, n.393(2), p. 183-97, 2009.

SOURISSEAU, M.; SCHILTE, C.; CASARTELLI, N.; TROUILLET, C.; GUIVEL-BENHASSINE, F.; RUDNICKA, D.; SOL-FOULON, N.; LEROUX, K.; PREVOST, M. C.; FSIHI, H.; FRENKIELS, M. P.; BLANCHET, F.; AFONSO, P. V.; CECCALDI, P. E.; OZDEN, S. GESSAIN, A.; SCHUFFERNECKER, I.; VERHASSELT, B.; ZAMBORLINI, A.; SAIB, A.; REY, F. A.; ARENZANA- SEISDEDOS, F.; DESPRE, P.;

MICHAULT, A.; ALBERT, M. L.; SCHWARTZ, O. Characterization of reemerging *Chikungunya virus*. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0804–0817, 2007.

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

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

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiol Rev.** v. 82, n. 4, p. 981-1011, 2002.

WU, X. B.; JING, P. B.; ZHANG, Z. J.; CAO, D. L.; GAO, M. H.; 1, JIANG, B. C.; GAO, Y. J. 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**. p.1-11, 2018.

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

ZAJAC, V. Evolutionary view of the AIDS process. **J Int Med Res.** v. 46, n. 10, p. 4032-4038, 2018.

ZWEEMER, A. J. Discovery and mapping of an intracellular antagonist binding site at the chemokine receptor CCR2. **Mol Pharmacol.** v. 86, n. 4, p. 358-68, 2014.