FRANCIELE MARTINS SANTOS

MODELO ANIMAL DE ARTRITE E MIOSITE INDUZIDAS PELO VÍRUS MAYARO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

T

Santos, Franciele Martins, 19-
S237m Modelo animal de artrite e miosite induzidas pelo vírus Mayaro : . /
2017 Franciele Martins Santos. - Viçosa, MG, 2017.
x; 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Alfavírus. 2. Modelo animal. 3. Dano musculoesquelético.
4. Resposta pró-inflamatória. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Mestrado em Biologia Celular e
Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08

FRANCIELE MARTINS SANTOS

MODELO ANIMAL DE ARTRITE E MIOSITE INDUZIDAS PELO VÍRUS MAYARO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 04 de agosto de 2017.

Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Sérgio Luis Pinto da Matta

Sérgio Oliveira de Paula
(Orientador)

A dedico a Deus e minha família, em especial
Minha mãe Neuza, meu pai José e minha irmã Marina.

‘‘Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si

É sobre saber que em algum lugar, alguém zela por ti (...).

(....) Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu

É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu

É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações

E assim ter amigos contigo em todas as situações (...). ’’

Música: Trem bala

Ana Vilela.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo seu amor e por cuidar de mim e da minha família. Foi graças aos planos Dele que vim para Viçosa e hoje conquisto esee sonho. Foi o Seu amor que tornou tudo mais fácil diante dos obstáculos, pois mesmo nas minhas misérias e fraquezas Ele me amou.

"Por isso não temas, porque estou contigo; não te assustes, porque sou o teu Deus; Eu te fortaleço, ajudo e sustento com a mão direita da minha justiça".

Isaias 41:10

Agradeço também a Nossa Senhora pela sua intercessão e o seu cuidado de mãe diariamente.

Agradeço a minha mãe Neuza, pelo seu amor e incentivo. Obrigada mãe por sempre me apoiar e por nunca ter medido esforços para me ajudar na conquista dos meus sonhos. Você é o meu maior exemplo de mulher e mãe. Te amo muito.

Agradeço a meu pai José, pelo seu amor e apoio. Obrigada pai por sempre está presente, por me ensinar a ver vida de uma forma mais simples e sempre persistir mesmo quando tudo está contra você. Te amo muito.

Agradeço a minha irmã Marina pelo seu amor e cumplicidade. Todos esses anos em Viçosa e longe de casa não teriam sido fáceis sem você Mama. Juntas ajudamos uma a outra a superar as dificuldades e medos da vida. Você é meu maior exemplo de humildade e bondade.

Agradeço a meu namorado Rafael pelo seu amor e paciência. Obrigada por esses 10 anos de amizade, cumplicidade e dedicação. Te amo.

Agradeço aos meus avós (Dete, Irani e em memória Vó Maria), tios (Tevaldo, Vani, Anne, Cida) padrinhos (Luciana e Zé Maria) e primos (Ruth, Angélica, Paulo e Zé Filho, o Bê) pelo carinho, cuidado e atenção. Amo todos vocês.

Agradeço aos amigos pelas conversas, cafés, os momentos de diversão.

Ao laboratório de Imunovirologia por todo aprendizado e oportunidade, em especial ao meu orientador Sérgio e meus co-orientadores Michelle e Roberto.

Aos professores Maria Aparecida e Sérgio da Matta por aceitarem fazer parte da banca.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

Resumo.....vii
Abstract.....ix
INRODUÇÃO GERAL.....1
1.Alfavírus.....1
2.Composição do genoma e estrutura viral.....2
3.Vírus Mayaro: Aspectos epidemiológicos e Febre Mayaro.....3
4. Modelo animal.....9
5. Fatores imunes envolvidos na patogênese.....10
6. Referências bibliográficas.....13
7. Objetivos.....19

ARTIGO: Modelo animal de artrite e miosite induzidas pelo Vírus Mayaro.....20
RESUMO.....20
ABSTRACT.....21
INTRODUÇÃO.....22
RESULTADOS.....23
Avaliação dos sinais clínicos da doença nos animais infectados.....23
Perda de força física.....24
Miosite e artrite induzidas pelo Vírus Mayaro.....25
Avaliação do perfil de citocinas.....31
Imunofenotipagem.....32
Avaliação da dor.....33
DISCUSSÃO 34
MATERIAIS E MÉTODOS.....40
REFERÊNCIAS.....44
MATERIAL SUPLEMENTAR.....48

RESUMO

SANTOS, Franciele Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2017. **Modelo animal de artrite e miosite induzidas pelo vírus Mayaro.** Orientador: Sérgio Oliveira de Paula. Coorientadores: Michelle Dias de Oliveira Teixeira e Roberto Sousa Dias.

O Vírus Mayaro (MAYV) pertence ao gênero *Alphavirus* e a família *Togaviridae*. Ele está incluído no grupo dos alfavírus artritogênicos, que tambem compreende o Vírus Ross River (RRV), Vírus Chicungunya (CHIKV) Vírus Sindbis (SINV), Vírus O'nyong-nyong (ONNV), os quais são responsáveis por causar surtos de poliartralgia ou poliartrite muitas vezes crônicas e debilitantes. O MAYV é responsável por surtos esporádicos de doença febril aguda em comunidades rurais de países da América do Sul. A febre Mayaro é uma doença autolimitante que pode variar de leve a moderadamente severa. Os sinais clínicos incluem dor de cabeça, febre, erupção cutânea, fotofobia, mialgia e artralgia, que pode ser persistente. Os casos de febre Mayaro afetam principalmente pessoas que trabalham ou residem próximas as áreas de florestas, pois o MAYV é um patógeno zoonótico, mantido na natureza em ciclos silvestres e rurais. Esses ciclos envolvem o mosquito *Haemogogus janthinomys* como vetor e vertebrados como hospedeiros. No Brasil os casos de febre Mayaro são comumente relatados em áreas rurais das Regiões Norte e Centro Oeste do país, embora, casos recentes têm sido descritos em áreas urbanas de Manaus e Mato Grosso. Esses relatos destacam a preocupação com o potencial de emergência e urbanização do MAYV no Brasil e outros países, uma vez que a artritre e miosite induzidas pelo MAYV podem ser debilitantes e com consideravel impacto na qualidade de vida das pessoas sendo, além disso, pouco compreendida. Por isso, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo animal para estudo da patogênese induzida pelo MAYV. No experimento foram utilizados camundongos Balb/c com 15 dias de idade, os quais foram infectados por duas vias distintas: abaixo do membro torácico e na almofada da pata do membro pélvico. Os animais foram avaliados em intervalos de 24 horas por 21 dias, para aparecimento de sinais clinicos, quanto ao ganho de peso, e perda de forca pelo teste fisico Wire-hang. Também foram realizadas analises histológicas do músculo e articulação do tornozelo. A resposta imune foi acessada pela quantificação de citocinas no soro e tecido por citometria de fluxo, e além disso também

foi realizado o teste de dor. Os resultados demonstraram que o MAYV induziu doença aguda nos animais, os quais apresentaram piloereção, postura encurvada, irritação no olho e leve alteração da marcha. No teste físico ambos os grupos tiveram perda de resistência, o que estava associado aos danos histopatológicos, que incluiu miosite, artrite, tenossinovite e periostite. A resposta imune foi caracterizada por uma forte resposta inflamatória mediada pelas citocinas TNF-α, IL-6 e INF-γ e quimiocina MCP-1, seguida pela ação das citocinas IL-10 e IL-4. Portanto, os camundongos Balb/c representam um modelo promissor para estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese, resposta imune e futuramente como plataformas para testes de antivirais e vacinas.

ABSTRACT

SANTOS, Franciele Martins, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2017. **Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus.** Adviser: Sérgio Oliveira de Paula. Co-advisers: Michelle Dias de Oliveira Teixeira and Roberto Sousa Dias.

Virus Mayaro (MAYV) belongs to the genus *Alphavirus* and the *Togaviridae* family. It is included in the arthritogenic alphavirus group, which also comprises Ross River Virus (RRV), Chicungunya Virus (CHIKV), Sindbis Virus (SINV), O'nyong-nyong Virus (ONNV), which are responsible for causing polyarthralgia or polyarthritis outbreaks often chronic and debilitating. The MAYV is responsible for sporadic outbreaks of acute febrile illness in rural communities in South American. Mayaro fever is a self-limiting disease that can range from mild to moderately severe. Clinical signs include headache, fever, rash, photophobia, myalgia, and arthralgia that may be persistent. Cases of Mayaro fever mainly affect people who work or reside near to forest areas, because the zoonotic pathogen MAYV is maintained in nature in wild and rural cycles. These cycles involve the mosquito *Haemogogus janthinomys* as vector and vertebrates as hosts. In Brazil cases of Mayaro fever are commonly reported in rural areas of North and Midwest regions of the country, however, recent cases have been described in urban areas of Manaus and Mato Grosso. These reports highlight the concern about the potential for emergency and urbanization of the MAYV in Brazil and other countries, since the arthritis and myositis induced by the MAYV can be debilitating and have considerable impact on the quality of life of people, and it is not well understood. Therefore, the objective of this work was to establish an animal model to study the pathogenesis induced by the MAYV. In the experiment, 15-day-old Balb / c mice were infected by two distinct pathways, below forelimb and in the in the rear footpad. The animals were evaluated at 24-hour intervals for 21 days, for appearance of clinical signs, regarding weight gain, and loss of strength by the physical test Wire-hang. Histological analyzes of muscle and ankle join were also performed. The immune response was accessed by the quantification of cytokines in serum and tissue by flow cytometry, and the pain test was also performed. The results demonstrated that the MAYV induced acute disease in the animals, which showed ruffled fur, hunched posture, eye irritation and slight gait alteration. In the physical test, both

groups had loss of resistance, which was associated with histopathological damage, including myositis, arthritis, tenosynovitis and periostitis. The immune response was characterized by a strong inflammatory response mediated by cytokines TNF-α, IL-6 and INF-γ and chemokine MCP-1, followed by the action of IL-10 and IL-4 cytokines. The results show that Balb / c mice represent a promising model for studying the mechanisms involved in the pathogenesis and for future tests of antivirals and vaccines.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Alfavírus

O gênero *Alphavirus* pertence à família *Togaviridae* e está atualmente distribuído em todo o mundo. Este gênero compreende aproximadamente 31 espécies, as quais são tipicamente transmitidas por mosquitos para hospedeiros vertebrados. Muitos alfavírus são patógenos de importância médica, veterinária e econômica (CHATTOPADHYAY et al., 2013; ATKINS et al., 2013; ICTV, 2017), sendo subdivididos de acordo com a prevalência dos sintomas clínicos que eles causam em humanos, como alfavírus encefalíticos e artritogênicos. Entretanto, eles também podem ser classificados de acordo com a localização geográfica de onde foram originalmente isolados, assim referidos como alfavírus do Novo e Velho Mundo (LEUNG et al., 2011; IRANAIA ASSUNÇÃO-MIRANDA et al. 2013).

Os alfavírus encefalíticos ocorrem nas Américas e estão associados com encefalite severa ou letal em humanos e outros mamíferos. Este grupo inclui o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (*Venezuelan Equine Encephalitis Virus* - VEEV), Vírus da Encefalite Equina do Leste (*Eastern Equine Encephalitis Virus* - EEEV) e Vírus da Encefalite Equina do Oeste (*Western Equine Encephalitis Virus* - WEEV) (IRANAIA ASSUNÇÃO-MIRANDA et al. 2013). Os vírus artritogênicos compreendem o Vírus Ross River (*Ross River Virus* - RRV), Vírus Chicungunya (*Chikungunya Virus* - CHIKV), Vírus Mayaro (*Mayaro Virus* - MAYV), Vírus Sindbis (*Sindbis Virus* - SINV), Vírus O'nyong-nyong (*O'nyong-nyong Virus* -ONNV), que são responsáveis por causar surtos de poliartralgia ou poliartrite muitas vezes crônicas e debilitantes. Eles são primariamente encontrados no Velho Mundo, com exceção do Vírus Mayaro que ocorre na América do Sul (SUHRBIER et al., 2012; COFFEY et al., 2013).

Estes vírus são mantidos na natureza em um contínuo ciclo silvestre de transmissão, em que mosquitos atuam como vetores e vertebrados selvagens como reservatórios. Mas muitos arbovírus, assim como o DENV e o CHIKV perderam a exigência de amplificação enzoótica (mosquito-primatas-mosquito) e agora apresentam um ciclo endêmico permanente em áreas urbanas (mosquito-homem-mosquito), onde produzem epidemias extensas envolvendo o *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* como vetores. Outros vírus como o VEEV e o MAYV possuem o potencial risco de urbanização (WEAVER et al., 2010; SUHRBIER, et al., 2012; BATISTA PM et al., 2013; ZUCHI et

al., 2014). Por outro lado, o CHIKV e o MAYV são capazes de sofrer mutação e se adaptar a novos ciclos zoonóticos e assim adquirir um alto potencial de emergência. Estes alfavírus podem emergir como resultado da degradação ambiental, problemas sócio-econômicos, tráfego internacional, alterações genéticas e mudanças climáticas (FIGUEIREDO, M LG e FIGUEIREDO, LTM., 2014).

Os alfavírus artritogênicos são particularmente preocupantes devido a sua capacidade de causar epidemias extensas de poliartrite e artralgia, muitas vezes associadas a sintomas crônicos e problemas de saúde em curso, tornando a infecção por estes vírus uma doença de grande importância sócio-econômica. Estes vírus circulam em ambos os padrões endêmicos e epidêmicos, causando surtos que frequentemente envolvem dezenas de milhares a milhões de casos. Dentre os grandes surtos causados por alfavírus tem-se o surto de 1979-1980 causado pelo RRV, no Pacífico Sul, que resultou em mais de 60.000 casos relatados; o CHIKV é responsável por epidemias no Oceano Índico, Índia e Sudeste Asiático, com estimativas de até 5 milhões casos reportados desde 2006; na Índia em 2007 o CHIKV causou mais de 1 milhão de infecções com 1.200 mortes (HERRERO et al, 2011a; HERRERO et al, 2013*;* FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM. , 2014).

No Brasil têm sido relatados surtos esporádicos de MAYV nas regiões Norte e Centro-Oeste do país. Em 2014 foram registrados os primeiros casos autóctones de CHIKV no Brasil, nos municípios de Feira de Santana (BA) e Oiapoque (AP). Desde então o CHIKV tem se espalhado pelo Brasil, onde foi responsável por cerca de 20.662 em 2015 e 271.824 casos ditribuídos em 2.829 municípios brasileiros no ano 2016. Neste ano já foram notificados 3.754 casos de febre chikungunya. A ocorrência desses dois vírus no Brasil em uma mesma região, demonstra a necessidade de estudar a patologia causada por eles, para o desenvolvimento de tratamentos específicos e eficientes (FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM., 2014; ZUCHI et al., 2014; Ministério da Saúde, 2016 e 2017).

2. Composição do genoma e estrutura viral

O genoma desses vírus consiste em uma fita simples de RNA, com polaridade positiva e aproximadamente 12 Kb de comprimento. A sequência de codificação é constituída por dois grandes quadros de leitura aberta (ORFs). A ORF N-terminal codifica

a poliproteína não estrutural, que contém 2.474 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada para produzir as proteínas nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4, bem como seus intermediários de clivagem. As quatro proteínas não estruturais e os seus intermediários de clivagem estão envolvidos na replicação do RNA viral. A poliproteína estrutural tem 1.244 aminoácidos e é codificada pela ORF C-terminal, que corresponde ao RNA subgenômico. Esta poliproteína é processada para produzir as proteínas estruturais E1, E2, C, E3 e 6k, que são necessárias para a encapsidação e brotamento viral (Figura 1) (LEUNG et al., 2011; FIGUEIREDO, MLG. e FIGUEIREDO, LTM., 2014).

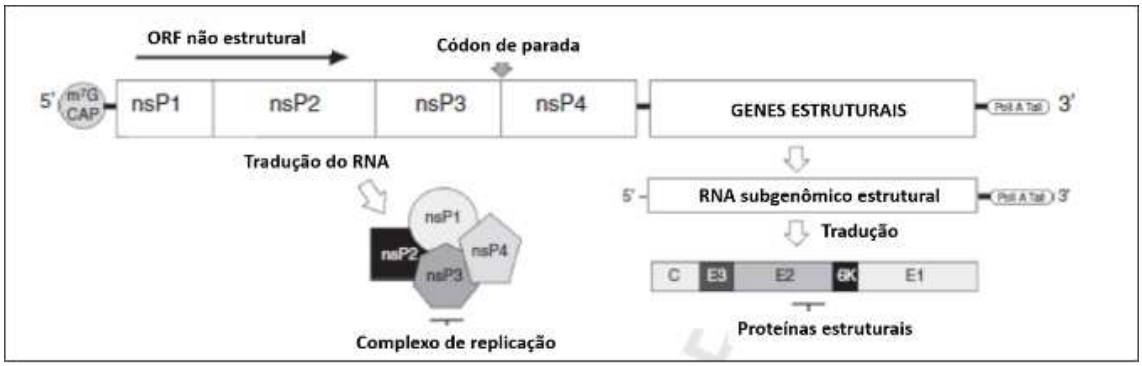


Figura 1. Organização do genoma do Vírus Mayaro, incluindo suas proteínas não-estruturais (nsP1-nsP4) formando o complexo de replicação e as proteínas estruturais C, E1, E2, 6K e E3. A figura foi adaptada de (Esposito e Fonseca, 2017).

As proteínas estruturais irão formar um capsídeo icosaédrico, envolto por envelope e aproximadamente 70 nm de diâmetro. O envelope consiste em uma bicamada lipídica onde são incorporadas 80 espículas. Esta bicamada é derivada da membrana plasmática do hospedeiro (STRAUSS e STRAUSS, 1996; LEUNG et al., 2011).

O nucleocapsídeo é formado pelo RNA genômico envolto por múltiplas cópias da proteína C. Esta proteína se liga ao RNA através do seu domínio N-terminal (Arg, Lys e Pro). No domínio C-terminal tem um bolso hidrofóbico, onde as glicoproteínas do envelope se ligam. As glicoproteínas E1 e E2 são proteínas transmembrana tipo I e estão ancoradas no envelope pelo domínio C-terminal. Elas formam um heterodímero estável, sendo que três heterodímeros de E1-E2 interagem para formar as espículas que se encontram sobre superfície do vírus (Figura 2). Existem 240 heterodímeros na superfície do vírus, montados em 80 espículas (STRAUSS e STRAUSS, 1996; LEUNG et al., 2011; FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM., 2014).

E2 e E1 são responsáveis pelo reconhecimento do receptor e entrada do vírus nas células alvo por fusão de membrana, respectivamente. E2 é formado como um precursor

chamado PE2 ou p62, que é clivado em E2 e uma pequena proteína chamada E3. A função de E3 ainda não está definida, e pode variar entre os diferentes alfavírus, uma vez que E3 pode ficar associado com os virions em alguns casos (*Semliki Forest virus* - SFV) e outros não (CHIKV, SINV e WEEV). Ainda há o 6k, um pequeno peptídeo hidrofóbico que está incorporado aos virions em pequenas quantidades, e é essencial para a montagem das partículas de alfavírus (STRAUSS e STRAUSS, 1996; LEUNG et al., 2011).

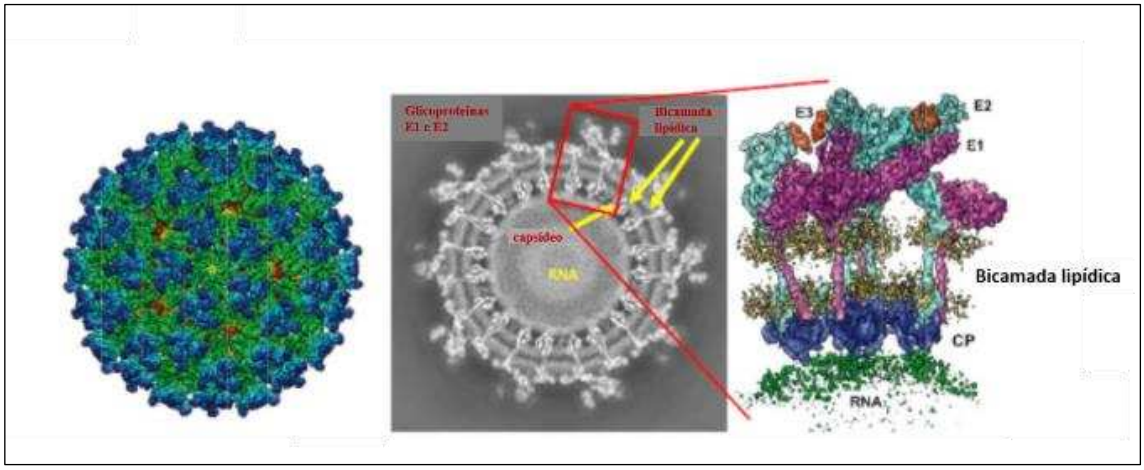


Figura 2. Estrutura do vírion de alfavírus. Esquerda. Visão da superfície viral. Direita. Corte transversal mostrando a organização do capsídeo, da bicamada lipídica e das glicoproteínas. Quadro vermelho. Imagem ampliada mostrando as interações das glicoproteínas E1 e E2 entre elas e com a bicamada lipídica e o capsídeo. A figura foi daptada de (Weaver et al., 2012).

3. Vírus Mayaro: Aspectos epidemiológicos e Febre Mayaro

O vírus Mayaro foi isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago em 1954 de trabalhadores rurais com doença febril aguda. Desde então, surtos esporádicos de febre Mayaro têm sido relatados em comunidades rurais de países da América do Sul, como Peru, Bolívia, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname e Brasil. No entanto, dados sorológicos têm demonstrado a circulação do MAYV em países da América Central, como Guatemala, Costa Rica, Panamá e mais recentemente no Haiti, onde uma nova cepa foi isolada a partir de uma criança febril (MOURÃO et al., 2012; NEUMAYR et al., 2012 HALSEY et al., 2013;; LEDNICKY et al., 2016).

Com base na sequência de nucleotídeos dos genes E1 e E2 tem sido demonstrada a existência de dois clados filogenéticos para o MAYV, os genótipos D e L. Neste estudo realizado por Powers e colaboradores (2006), foi observado que há uma divergência genética entre os dois genótipos de 15-18% e que dentro de cada grupo a divergência genética entre os membros é muito pequena. Os membros do genótipo D têm uma ampla

distribuição geográfica, ocorrendo no Brasil no Planalto Central e na região Amazônica, além de outros países como Guiana Francesa, Bolívia, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Argentina, Colômbia e Venezuela. O genótipo L tem uma distribuição limitada e todas as suas ocorrências até recentemente haviam sido descritas na região Norte do Brasil (Estado do Pará), mas um estudo recente realizado no Mato Grosso demonstrou que o genótipo L está circulando também na região central (POWERS et al., 2006; FIGUEIREDO, M LG e FIGUEIREDO, LTM., 2014; VIEIRA et al., 2015).

O MAYV é um patógeno zoonótico que circula em ciclos silvestres e rurais na América do Sul tropical, envolvendo o mosquito *Haemogogus janthinomys* como vetor, primatas não-humanos e aves como hospedeiros primários e secundários, respectivamente (Figura 3). A maioria dos casos de infecções em seres humanos são esporádicas e acidentais, afetando principalmente pessoas que trabalham ou residem próximas a florestas tropicais úmidas (LAVERGNE et al., 2006; WEISE *et al.*, 2014; ZUCHI et al., 2014;).

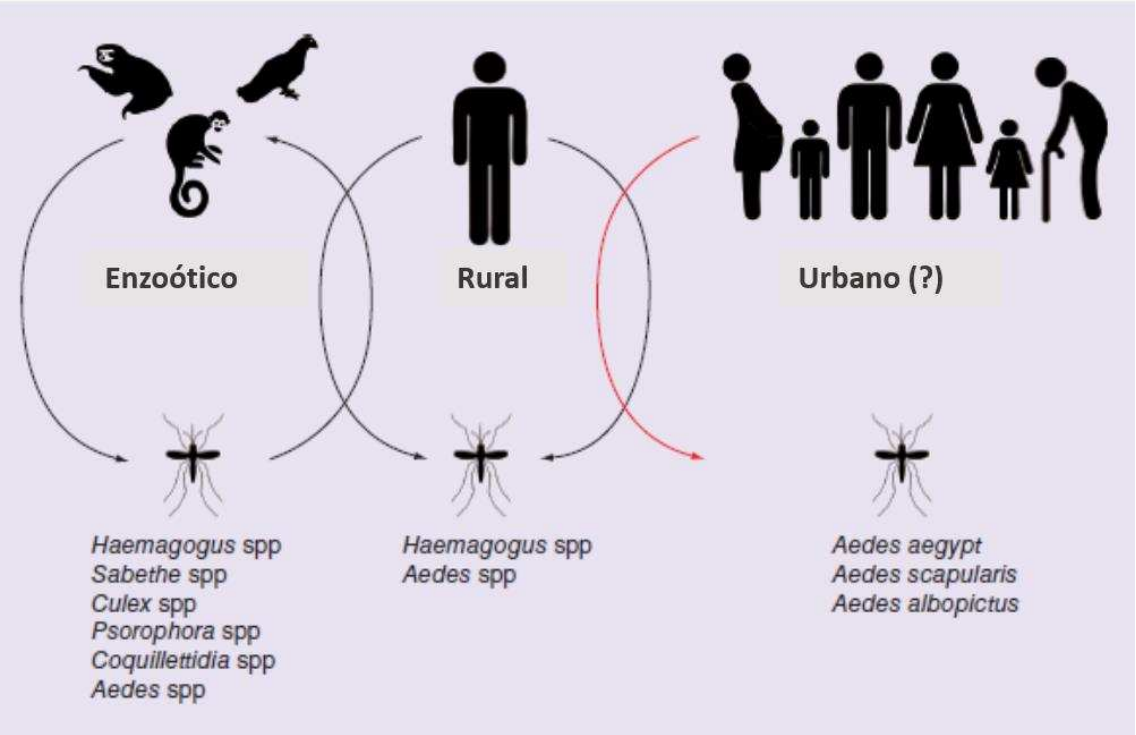


Figura 3. Ciclo de manutenção do Vírus Mayaro. O MAYV é mantido na natureza em um ciclo enzoótico, o qual envolve primatas não humanos, aves e outros vertebrados como hospedeiros e mosquitos de vários gêneros como vetores. O ciclo rural envolve pessoas que estão em contato com ambiente silvestre e podem ser infectadas. O MAYV tem um alto potencial de urbanização devido a capacidade de mosquitos antropofílicos como os do gênero *Aedes sp.* de transmiti-lo. A figura foi adaptada de (Mota et al., 2015)

No Brasil, os casos de febre Mayaro são comumente relatados na Região Norte, nos estados do Pará e Amazonas, e na Região Centro-Oeste, nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul. Contudo, evidências de migração desse vírus para outras partes do Brasil têm sido descritas. No Estado de São Paulo foram diagnosticados três pacientes com febre Mayaro que haviam retornado da região Centro-Oeste e no Estado do Rio Grande do Sul foram capturadas duas aves que apresentavam anticorpos para o MAYV. Há também relatos recentes de turistas que visitaram a região Amazônica e retornaram para seus países com sintomas característicos da febre Mayaro, como casos relatados de turistas europeus em visita ao Brasil em 2010 e na Guiana Francesa em 2013. Esses dados mostram o risco de emergência do MAYV para outras regiões do país e também para outros países e continentes (ZUCHI et al., 2014; 2014; RECEVEUR et al., 2010 apud SLEGERS et al., 2014; FIGUEIREDO, MLG. e FIGUEIREDO, LTM., 2014; FRIEDRICH-JÄNICKE et al., 2014 apud SLEGERS et al., 2014).

Um estudo realizado em Manaus no período de um ano como parte de um programa de vigilância de doença febril aguda, mostrou que na ausência de diagnósticos laboratoriais as infecções pelo MAYV podem ser facilmente confundidas com outra doença febril aguda, incluindo malária, dengue e febre Oropouche, todas altamente endêmica em Manaus (MOURÃO et al., 2012). Zuchi e colaboradoes (2014), em trabalho mais recente realizado no Mato Grosso, mostrou a ocorrência de casos de febre Mayaro durante um surto de dengue, que frequentemente seriam ignorados na ausência de diagnóstico laboratorial (ZUCHI et al., 2014). Isso ocorre porque o diagnóstico clínico dessas arboviroses é complexo devido à ausência de sintomas específicos do patógeno, particulamente no início da doença (FORSHEY et al., 2010).Nestes dois estudos também foi relatada a circulação do vírus Mayaro em áreas urbanas/periurbanas. Em Manaus foi observado que os casos febre Mayaro ocorreram durante o ano todo, com maior frequência entre os meses de novembro e março, coincidindo com a estação chuvosa como ocorre com a dengue. No Mato Grosso as amostras positivas para o vírus Mayaro foram coletadas entre os meses de janeiro e maio, indicando que esse período oferece as condições ambientas favoráveis para a proliferação do vetor e atividade arboviral. Das 15 amostras positivas para MAYV, 12 estavam co-infectadas com o DENV. O fato de todos os pacientes positivos desse estudo serem residentes urbanos e a identificação dos mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* naturalmente infectados pelo MAYV

em Cuiabá, corrobora a existência de um ciclo de transmissão em Cuiabá e nos demais municípios estudados (MOURÃO et al., 2012; ZUCHI et al., 2014; SERRA et al., 2016).

De acordo com o Ministério da Saúde 343 casos suspeitos de febre Mayaro foram registrados entre dezembro de 2014 e janeiro de 2016, nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste. No entanto, apenas 70 casos foram confirmados até o momento, sendo 60 em Goiás, 9 em Tocantins e 1 no Pará. Entre os casos confirmados a maioria eram mulheres (56,5%) e todos os casos envolveram moradores da área rural ou que estiveram expostos em áreas rurais ou silvestres (Ministério da Saúde, 2015).

Esses relatos destacam a preocupação com o potencial de urbanização da febre Mayaro no Brasil, uma vez que as infecções por estes vírus têm sido silenciadas durante surtos de outros arbovirus, como a dengue, devido à ausência de um sistema de vigilância para doenças febris agudas e testes de diagnótico laboratoriais eficientes. Além disso, estudos experimentais têm mostrado que o MAYV pode infectar e ser transmitido por espécies de *Aedes (A. aegypti* e *A. Albopictus*) e também pelos mosquitos do gênero *Culex* (LONG et al., 2011; ZUCHI et al., 2014; FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM, 2014). É importante ressaltar que o MAYV está intimamente relacionado com o CHIKV, um patógeno emergente bem-sucedido, que é responsável pela terceira doença arboviral mais importante com uma história de urbanização, atrás da febre dengue e febre amarela. O CHIKV sofreu uma mutação no seu genoma que permitiu uma melhor capacidade de transmissão pelo *Aedes albopictus,* em locais onde o *A. aegypti* está ausente ou é menos abundante. Esta mutação permitiu a sua disseminação no Oceano Índico, na Ásia e mais recentemente ele chegou à Europa e as Américas (WEAVER, 2013; SPINDOLA et al., 2014; FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM, 2014).

A emergência de alfavírus na América, principalmente no Brasil, resulta em um relevante problema de saúde pública com desafios no controle vetorial e no desenvolvimento de estratégias para prevenir e tratar as doenças causadas por esses vírus (IRANAIA ASSUNÇÃO-MIRANDA et al 2013; FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM, 2014).

A febre Mayaro, doença febril aguda semelhante a dengue e responsável por aproximadamente 1% das doenças febris associadas à arbovírus no nordeste da América do Sul (A. LAVERGNE et al., 2005; WEISE et al., 2014), é caracterizada por ser uma doença auto-limitante, que pode variar de leve a moderadamente severa, com um curto

período de viremia. A fase aguda da doença tem duração de 3-5 dias e inclui febre, dor de cabeça, dor nos olhos, erupção cutânea, mialgia e artralgia que pode se estender por vários dias ou semanas. No final desta fase é comum o aparecimento de erupção cutânea. A convalescência dessa doença pode requerer várias semanas, com o paciente sentindo fraqueza e artralgia (Figura 4) (AZEVEDO et al., 2009; ZUCHI et al., 2014; SLEGERS et al., 2014; FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM, 2014).

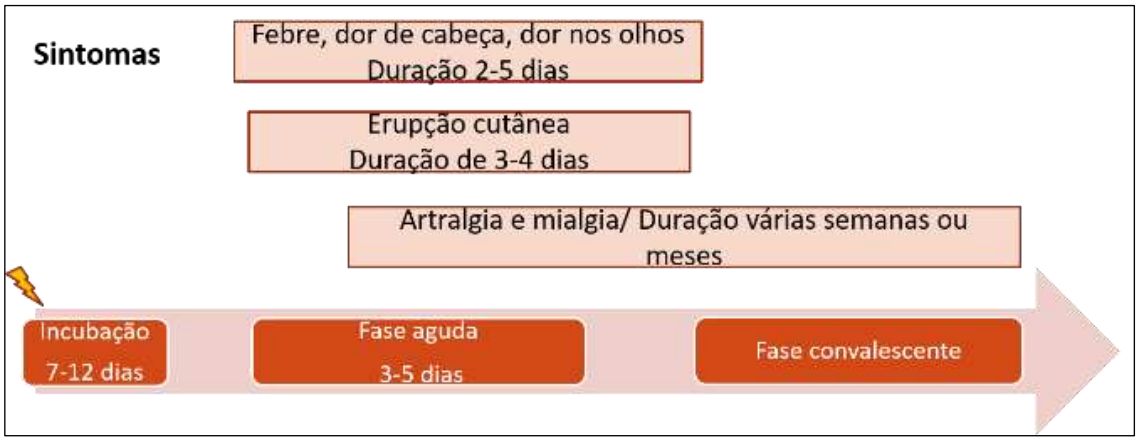


Figura 4. Curso clínico da Febre Mayaro. A fase aguda da doença é caracterizada por febre, dor de cabeça, erupção cutânea, artralgia e mialgia. Na fase convalescente a artralgia e mialgia ainda estão presentes, e podem persistir por meses ou anos. A figura foi adaptada de (Surhbier et al., 2012).

Mourão e colaboradoes, em estudo realizado em Manaus observaram que os pacientes apresentaram, além das manifestações clínicas já previamente descritas, fenômenos hemorrágicos, como petéquias, sangramento gengival e epistaxe (MOURÃO et al., 2012). Similarmente a outras doenças causadas por alfavírus, como febre Chinkungunya, pode também apresentar poliartralgia prolongada e muitas vezes incapacitante. Muitos trabalhos têm relatado a persistência de dores articulares em pacientes por vários meses ou mais de um ano, o qual frequentemente causa limitações em atividades diárias. As articulações do pulso, tornozelo e pequenas articulações das mãos e pés são predominantemente afetadas (HALSEY et al., 2013; SLEGERS et al., 2014).

Atualmente não há nenhuma droga específica ou vacina licenciada disponível contra o MAYV. O tratamento existente é basicamente sintomático por meio do uso de analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroidais para alívio da dor e febre. No entanto, recentemente foi desenvolvida uma vacina viva atenuada (MAYV/IRES) candidata contra o vírus Mayaro, a qual em testes realizados em murinos mostrou-se altamente

imunogênica e forneceu forte proteção contra o desafio letal. Além disso, um estudo realizado por Spindola e colaboradoes, mostrou que a leguminosa *Cassia australis* é uma importante fonte de derivados fenólicos com atividade antiviral contra o MAYV, sugerindo o potencial desses compostos para o desenvolvimento de drogas específicas para esse arbovírus (SPINDOLA et al., 2014; WEISE et al, 2014; FIGUEIREDO, MLG e FIGUEIREDO, LTM, 2014).

4. Modelo animal

O uso de animais como modelos para estudo de doenças humanas tem ajudado a superar as limitações existentes com estudos em seres humanos, como por exemplo, coleta de amostras biológicas, número amostral, e principalmente questões éticas (FAGUNDES e TAHA, 2004). No entanto, a legislação que regulariza os experimentos com animais exige que o uso dos animais, assim como dano potencial que possam sofrer em algum procedimento seja justificado em termos do seu possível benefício para a sociedade (WOOD e HART, 2008; WEBSTER, 2014). Além disso, é de responsabilidade das pessoas que trabalham com animais compreender as necessidades físicas, comportamentais e emocionais da espécie, bem como ter conhecimento das técnicas realizadas, para que os experimentos sejam conduzidos com o intuito de diminuir a dor e o estresse dos animais (WEBSTER, 2014).

Russel e Burck propuseram três princípios básicos para minimizar os danos na experimentação animal, denominados “reduction, refinement and replacement”, os três R’s. Com esses príncipios eles propõem a redução do número de animais por experimento, o refinamento das técnicas e protocolos para diminuir o sofrimento, e o mais importante é a substituição dos animais por modelos alternativos, como organismos não sensíveis, estudos diretos em seres humanos ou experimentos *in vitro* (FAGUNDES e TAHA, 2004; WEBSTER, 2014).

A escolha do modelo animal adequado é uma etapa muito importante, que tem implicações no sucesso e validade da pesquisa, além de garantir dois princípios básicos, a redução e refinamento (WOOD e HART, 2008). Na virologia, os primatas não-humanos e camundongos humanizados têm sido muito utilizados como modelos para estudo de vários vírus patogênicos (SANTO e APETREI, 2017).

Como os mecanismos pelos quais os alfavírus induzem artrite, artralgia e miosite permanecem mal definidos, o uso de modelos animais murinos tem se mostrado uma ferramenta importante na compreensão dos mecanismos da patogênese da doença e no desenvolvimento de estratégias de tratamento. Mas é essencial que esses modelos reproduzam com precisão a doença humana, para que as informações fisiológicas fornecidas sejam relevantes (HERRERO et al., 2011a).

Dentre os alfavírus artritogênicos, os mais extensivamente estudados em modelos animais são o SFV, SINV e o RRV (HERRERO et al., 2011b). O modelo animal de doença induzida pelo RRV, por exemplo, tem permitido a identificação dos sítios primários de infecção e também a identificação de uma série de fatores imunes que contribuem para o desenvolvimento da doença induzida por RRV, como por exemplo, o papel dos macrófagos (MORISSON et al., 2005; HERRERO et al., 2011a).

Além do uso de camundongos selvagens, os camundongos *Knockout* ou transgênicos têm auxiliado na compreensão dos mecanismos da resposta imune, assim como na interação vírus-hospedeiro. No entanto, nenhum dos modelos atuais para alfavírus é capaz de reproduzir a artrite crônica, tornando necessário a busca por um modelo que seja capaz de replicar a doença de longa duração (TAYLOR et al., 2015). O uso de modelos animais de doença aguda induzida por alfavírus sugere que a doença causada por esses vírus seja um distúrbio inflamatório imunopatólogico, no qual além do dano direto causado pela replicação viral no tecido e célula alvo, a resposta imune tem um papel importante no dano tecidual. Logo, os fatores solúveis e células imunes contribuem para o estabelecimento e progressão da doença (HERRERO et al., 2011b; IRANAIA ASSUNÇÃO-MIRANDA et al., 2013).

Portanto, o uso de modelos animais tem permitido avanços importantes na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares sobrejacentes a doença induzida por alfavírus. E como eles são capazes de reproduzir doença semelhante a apresentada por humanos, são ferramentas importantes na identificação de alvos potenciais para o desenvolvimento de estratégias antivirais, como tratamentos específicos ou vacinas (HERRERO et al., 2011a; TAYLOR et al., 2015).

5. Fatores imunes envolvidos na patogênese

O papel de fatores imunes na patogênese da febre Mayaro ainda não é bem estabelecido, no entanto, dois estudos recentes realizados em pacientes determinaram as principais citocinas presentes na fase aguda e convalescente da doença. No primeiro estudo foi observado que na fase aguda os níveis de IL-10, RANTES, IL-12P70 e VEGF estavam significativamente elevados e os níveis de eotaxina diminuíram. Enquanto na fase de recuperação os níveis elevados foram de IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, IP-10, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, GM-CSF e INF-γ (TAPPE et al., 2016).

No segundo estudo, foi demonstrado que o MAYV semelhante ao CHIKV, também induz uma reposta imune predominantemente inflamatória, o qual é responsável pela artralgia persistente induzida por esses vírus. Mas, os mediadores produzidos em ambas as infecções são diferentes, o que também implica diferenças nas populações de células imunes que serão ativadas. A análise do soro dos pacientes com febre Mayaro mostrou que MCP-1 apresentou altos níveis na fase aguda, enquanto que os níveis IL-2 e IL-9 foram altos na fase convalescente. Eles também observaram que nos pacientes que apresentaram artralgia persistente os níveis de IL-13 foram elevados na fase convalescente e os níveis IL-7 e VEGF foram elevados em todos os pontos avaliados, destacando esses fatores como possíveis marcadores de severidade da infecção pelo MAYV. Além disso, muitas outras citocinas e quimiocinas mantiveram níveis altos em todos os pontos analisados, incluindo IL-1Ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-13, IL-17, G-CSF, IFN-γ, PDGF-BB, TNF-α, VEGF e IL-12p70 (SANTIAGO et al., 2015). Essas diferenças encontradas nos dois trabalhos quanto ao padrão de citocinas expressas podem estar relacionadas com diferenças na localização geográfica e a cepa do MAYV presente em determinada região, por isso mais estudos são necessários para validar os fatores imunes da febre Mayaro e determinar marcadores importantes da doença (SANTIAGO et al., 2015).

A citocina IL-6 e a quimiocina MCP-1 têm sido descritas por estarem envolvidas na osteoclastogênese durante a infecção alfaviral. A IL-6 e MCP-1 têm sido detectadas no líquido sinovial de pacientes infectados com RRV e CHIKV, assim como em modelo animal murino para esses dois vírus. Estudos in vitro utilizando osteoblastos humanos demonstraram que a infecção dessas células pelo RRV e CHIKV, induz a expressão de IL-6, o qual por sua vez leva ao aumento na expressão de RANKL e MCP-1. Em geral, a infecção dos osteoblastos pelos alfavírus induz a produção de IL-6 que estimula a

liberação de RANKL e inibe a osteoprotegerina (OPG), causando um aumento na razão RANKL:OPG. A MCP-1 também produzida por osteoblastos após estímulo de IL-6 é um quimioatraente de precursores monocíticos. A alta razão RANKL:OPG favorece a diferenciação dos precursores monocíticos em osteoclastos, levando para um aumento da reabsorção óssea e patologias ósseas (NORET et al., 2012; CHEN et al., 2014a; CHEN et al., 2014b).

A susceptibilidade dos osteoblastos à infecção de RRV e CHIKV indica que os osteoblastos são células alvo dos alfavírus e assim como os macrófagos podem contribuir para infecções persistentes por esses vírus (NORET et al., 2012; CHEN et al., 2014a). Isso reforça ainda mais a necessidade de determinar se a expressão elevada de IL-6 e MCP-1 na infecção pelo MAYV está relacionada com a capacidade dele infectar osteoblastos e consequentemente promover perda óssea, artralgia e artrite.

Além dos fatore solúveis, as células imunes que atuam no processo patológico também têm sido identificadas. A análise do infiltrado inflamatório do músculo em modelo animal de RRV mostrou que os macrófagos eram os principais constituintes dos infiltrados, entretanto, células NK e linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ também estavam presentes. Essas mesmas células também foram observadas no líquido sinovial e biopsia de músculos de pacientes. A partir da biopsia do músculo de dois pacientes infectados com CHIKV foi observado a presença de macrófagos, células NK, células B e populações de linfócitos T supressores ou citotóxicos. A análise do soro de pacientes durante a fase aguda da infecção pelo CHIKV mostrou que ele induz uma forte resposta pró-inflamatória, e também foi observada a participação dos linfócitos $TCD8^+$ e $TCD4^+$ nos estágios iniciais e tardios da doença, respectivamente (MORRISON et al., 2005; OZDEN et al., 2007; WAUQUIER et al., 2011).

6. Referências bibliográficas

ABAD-FRANCH, F., GRIMMER, G. H., PAULA, V. S. et al. Mayaro virus infection in amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Neglected Tropical Diseases**; v. 6, p. 1-6, 2012.

ATKINS, G. J. The Pathogenesis of Alphaviruses. **International Scholarly Research Notices Virology. Review**, p. 1-22, v. 2013, 2012.

AZEVEDO, R. S.S., SILVA, E. V.P., CARVALHO, V. L. et al. Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830-1832, 2009.

BATISTA, P. M., ANDREOTTI, R., ALMEIDA, P. S. et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 46(6), p. 684-690, 2013.

CHATTOPADHYAY**,** A.**,** WANG, E., SEYMOUR, R. et al. A Chimeric Vesiculo/Alphavirus Is an Effective Alphavirus Vaccine. **Journal of Virology**, v. 87, n. 1, p. 395-402, 2013.

CHEN, W., FOO, S., RULLI, N. E. et al. Arthritogenic alphaviral infection perturbs osteoblast function and triggers pathologic bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111(16), p. 6040–6045, 2014 a.

CHEN, W., FOO, S., SIMS, N. A. et al. Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. **Trends in Microbiology**, v. 23(1), p. 35-43, 2014b.

COFFEY, L. L., FORRESTER, N., TSETSARKIN, K. et al. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. **Future Microbiol**, v. 8(2), p. 155–176, fevereiro, 2013.

DI SANTO, J. P. , APETREI, C. Animal models for viral diseases: Non-human primate and humanized mouse models for viral infections. **Current Opinion in Virology,** v. 25, p. v-vii, 2017

ESPOSITO, D.L.A e FONSECA, B.A.L.D. Will Mayaro virus be responsible for the nextoutbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases,** 2017.

FAGUNDES, D. J. e TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira,** v. 19 (1), p. 59-65, 2004.

FIGUEIREDO, Mario Luis Garcia de; FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Review**, v. 47(6), p. 677-683, dezembro 2014.

FORSHEY, B. M., GUEVARA C., LAGUNA-TORRES, V. A. Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4 (8), p. 1-14, 2010.

HALSEY, E. S., SILES, C., GUEVARA, C. *et al.* Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1839-1842, novembro 2013.

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

HERRERO, L., NELSON, M., BETTADAPURA, J. et al. Applications of Animal Models of Infectious Arthritis in Drug Discovery: A focus on Alphaviral Disease. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 7, 2011b.

HERRERO, L. J., SHENG, Kuo-Ching, JIAN, P. et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor Receptor CD74 Mediates Alphavirus-Induced Arthritis and Myositis in Murine Models of Alphavirus Infection. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 10, p. 2724-2736, outubro 2013.

I. ASSUNÇÃO-MIRANDA, C. CRUZ-OLIVEIRA e A. T. DA POIAN. Molecular Mechanisms Involved in the Pathogenesis of Alphavirus-Induced Arthritis. **BioMed Research International. Review**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

ICVT 2016 taxonomy. Available in: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/. Access in: July 3, 2017.

LAVERGNE, A., THOISY, B., LACOSTE, V. et al. Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. **Virus Research. Short Communication**, v.117, p. 283–290, 2006.

LEDNICKY, J., DE ROCHARS, V. M. B., ELBADRY, M. *et al.* Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, No.11, novembro 2016.

LEUNG, J. Y., Ng, M. M., JANG, J., & CHU, H. Replication of Alphaviruses: A Review on the Entry Process of Alphaviruses into Cells. **Advances in Virology. Review**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

LONG, K. C., ZIEGLER, S. A., THANGAMANI, S. et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85(4), p. 750–757, 2011.

OZDEN, S., HUERRE, M., RIVIERE, J.P. et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 2 (6), p. 1-7, 2006.

Ministério da Saúde: Febre Mayaro - Situação epidemiológica - Dados. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o ministerio/1205-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/febre-do-mayaro/20950-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 02 de julho de 17.

MORRISON, T. E., WHITMORE, A. C., SHABMAN, R. S. et al. Characterization of Ross River Virus Tropism and Virus-Induced Inflammation in a Mouse Model of Viral Arthritis and Myositis. **Journal of Virology**, v. 80, n. 2, p. 737–749, 2006.

MOTA, M.T.O., RIBEIRO, M.R., VEDOVELLO, D. e NOGUEIRA, M.L. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**. **Review**. v. 10, n. 9, 2015.

MOURÃO, M. P. G., BASTOS, M. S., FIGUEIREDO R. P. et al. Mayaro Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 42-46, 2012.

NEUMAYR, A., GABRIEL, M., FRITZ, J. et al. Mayaro Virus Infection in Traveler Returning from Amazon Basin, Northern Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, No. 4, p. 695-696, abril 2012.

NORET, M., HERRERO, L., RULLI, N. et al. Interleukin 6, RANKL, and osteoprotegerin expression by chikungunya virus-infected human osteoblasts. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, p. 455-457, 2012.

POWERS, A. M., AGUILAR, P.V., CHANDLER, L.J. et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, p. 461-469, 2006.

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

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 3, 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 47, n. 6, 2016.

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 4, 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 48, n. 5, 2017.

SERRA, O. P., CARDOSO, B. F., RIBEIRO, A. L. M. *et al.* Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111(1), p. 20-29, janeiro 2016.

SLEGERS, C.A.D., KEUTERA, M., GÜNTHERB S., et al. Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: Is there a risk for attendants to the 2014 FIFA World Cup? **Journal of Clinical Virology**, v. 60 (3), p.317–319, 2014.

SPINDOLA, K. C. W., SIMAS, N. K., SALLES, T. S. *et al.* Anti-Mayaro virus activity of Cassia australis extracts (Fabaceae, Leguminosae). **Parasites & Vectors**, v.7, p.1-7, 2014.

STRAUSS, J. H. e STRAUSS, E. G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 491-562, setembro 1994.

SUHRBIER, A., JAFFAR-BANDJEE, MC., GASQUE, P. Arthritogenic alphaviruses—an overview. **Nature Review Rheumatology**, v. 8, p. 420-429, 2012.

TAPPE, D., PÉREZ-GIRÓN, J. V., JUST-NÜBLING, G. et al. Sustained Elevated Cytokine Levels during Recovery Phase of Mayaro Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, p. 750-752, N. 4, abril, 2016.

TAYLOR, A., HERRERO, L. J., RUDD, P. A., & MAHALINGAM, S. Mouse models of alphavirus-induced inflammatory disease. **Journal of general Virology**, v. 96, p. 221-238, 2015.

THEILACKER, C., HELD, J., ALLERING, L. et al. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC Infectious Diseases**, v. 13 (369), p. 1-4, 2013.

VIEIRA, C. J., SILVA, D. J., BARRETO, E. S. et al Detection of Mayaro virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. **Elsevier/Acta Tropica**, v.147, p.12-16, 2015.

WAUQUIER, N., BECQUART, P., NKOGHE, D. et al. The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. **The Journal of infectious Disease**, v. 204.1, p. 115-123, julho, 2011.

WEAVER, S. C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 360-363, Agosto, 2013.

WEAVER, S., REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral Research**, v. 85 (2), p. 328-345, fevereiro, 2010.

WEAVER, S. C., WINEGAR, R., MANGER, I. D. e FORRESTER, N.L. Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. **Antiviral Research. Review,** v. 94, p. 242-257, 2012.

WEBSTER, J. Ethical and Animal Welfare Considerations in Relation to Species Selection for Animal Experimentation. **Animals: An Open Access Journal from MDPI,** v. 4(4), p. 729–741, 2014.

WEISE, W. J., HERMANCE, M. E., FORRESTER, N. et al. A Novel Live-Attenuated Vaccine Candidate for Mayaro Fever. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. 1-9, agosto 2014.

WOOD, M. W e HART, L. A. Selecting appropriate animal models and strains: Making the best use of research, information and outreach. **AATEX**, v.14, p. 303-306, 2007.

ZIEGLER, SA, LU, L., da ROSA, AP. et al. An Animal Model for Studying the Pathogenesis of Chikungunya Virus Infection. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79 (1), p. 133–139, 2008.

ZUCHI, N, HEINEN, L B da S., dos SANTOS, MAM. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instittuto Oswaldo Cruz**, v. 109(6), p. 820-823, setembro 2014.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver um modelo animal murino de doença induzida pelo vírus Mayaro para estudo da sua patogênese.

Objetivos específicos:

- Padroniza o modelo animal, definindo a linhagem, idade e tamanho do inóculo;
- Avaliar os sinais clínicos e condições físicas dos animais pelo teste Wire-hang;
- Avaliar dor nos animais pelo método de Von frey;
- Determinar o dano histológico induzido pelo vírus Mayaro;
- Analisar o padrão de citocinas e as células imunes envolvidas na patogênese.

Modelo animal de artrite e miosite induzidas pelo Vírus Mayaro

Franciele Martins Santos[1], Roberto Sousa Dias[1], Michelle Dias de Oliveira[1], Isabella Cristina Toledo Alves Costa[1], Sérgio Luis Pinto da Matta[1], Sérgio Oliveira de Paula[1].

1. Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Imunovirologia, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus endêmico em países da América do Sul, onde é responsável por surtos esporádicos de febre Mayaro. As manifestações clínicas incluem febre, dor de cabeça, dor ocular, erupção cutânea, fotofobia, mialgia e poliartralgia debilitante e persistente. A compreensão dos mecanismos associados a artrite induzida pelo MAYV é de grande importância devido ao seu potencial de emergência e urbanização. Utilizando camundongos Balb/c com 15 dias de idade nós estabelecemos o primeiro modelo animal para estudo da fisiopatologia do MAYV. A infecção por duas vias distintas, abaixo do membro torácico e na almofada da pata, resultou no desenvolvimento de doença aguda nos animais, os quais apresentaram piloereção, postura encurvada, irritação no olho e leve alteração da marcha. No teste físico ambos os grupos tiveram perda de resistência, o que estava associado aos danos histopatológicos, que incluíram miosite, artrite, tenossinovite e periostite. A resposta imune foi caracterizada por forte resposta inflamatória mediada pelas citocinas TNF-α, IL-6 e INF-γ e quimiocina MCP-1, seguida pela ação das citocinas IL-10 e IL-4. Esses resultados demonstram que camundongos Balb/c representam um modelo promissor para estudo dos mecanismos envolvidos na patogênese e futuros testes de antivirais e vacinas para o MAYV.

Palavras chave: Alfavírus, modelo animal, dano musculoesquelético, resposta pró-inflamatória

Relevância do trabalho

O fato da fisiopatologia da febre Mayaro não ser conhecida, combinado com o risco de emergência e urbanização na América do Sul, especialmente no Brasil, torna esse vírus um importante problema de saúde pública. Portanto o estudo da patogênese do MAYV em modelo animal é de fundamental importância para a determinação de fatores virais e do hospedeiro que contribuam para a doença. Além disso, permitirá comparações com o processo de patogênese de outros alfavírus, a fim de se obter alvos em comum para o desenvolvimento de tratamentos específicos.

Animal model of arthritis and myositis induced by the Mayaro virus

Franciele Martins Santos[1], Roberto Sousa Dias[1], Michelle Dias de Oliveira[1], Isabella Cristina Toledo Alves Costa[1], Sérgio Luis Pinto da Matta[1], Sérgio Oliveira de Paula[1].

1. Departamento de Biologia Geral, Laboratório de Imunovirologia, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

Mayaro virus (MAYV) is an endemic arbovirus in countries of South America, where it is responsible for sporadic outbreaks of Mayaro fever. Clinical manifestations include fever, headache, ocular pain, rash, photophobia, myalgia and debilitating and persistent polyarthralgia. Understanding the mechanisms associated with MAYV-induced arthritis have great importance due to its potential for emergence and urbanization. Using 15 day old Balb / c mice we established the first animal model to study the pathophysiology of the MAYV. Infection by two distinct pathways, below forelimb and in the rear footpad, resulted in the development of acute disease in the animals, which showed ruffled fur, hunched posture, eye irritation and slight gait alteration. In the physical test, both groups had loss of resistance, which was associated with histopathological damage, including myositis, arthritis, tenosynovitis and periostitis. The immune response was characterized by strong inflammatory response mediated by cytokines TNF-α, IL-6 and INF-γ and chemokine MCP-1, followed by the action of IL-10 and IL-4 cytokines. The results show that Balb / c mice represent a promising model for studying the mechanisms involved in the pathogenesis and for future tests of antivirals and vaccines for MAYV.

Key words: Alfavirus, animal model, musculoskeletal damage, pro-inflammatory response

Significance

The fact that the pathophysiology of Mayaro fever is unknown, combined with the risk of emergence and urbanization in South America, especially in Brazil, make this virus an important public health problem. Therefore, the study of the pathogenesis of the MAYV in an animal model has fundamental importance for the determination of viral and host factors that contribute to the disease. In addition, it will allow comparisons with the process of pathogenesis of other alphaviruses, in order to obtain common targets for the development of specific treatments.

INTRODUÇÃO

Vírus Mayaro (MAYV, gênero *Alphavirus*, família *Togaviridae*) é um arbovírus emergente, responsável por casos esporádicos, surtos e pequenas epidemias de doença febril aguda em países da América do Sul, particularmente nas regiões da bacia Amazônica. No entanto, dados sorológicos têm demonstrado a circulação do MAYV em países da América Central, como Guatemala, Costa Rica, Panamá e mais recentemente no Haiti, onde uma nova cepa foi isolada (1, 2). As infecções pelo MAYV afetam principalmente pessoas que residem ou trabalham próximas às áreas de floresta, onde o MAYV é mantido em um ciclo enzoótico, que envolve primariamente o mosquito *Haemagogus janthinomys* como vetor e primatas não-humanos e como hospedeiros, mas outros vetores (*Culex* sp, *Sabethes* sp, *Psorophora* sp, *Coquillettidia* sp e *Aedes* sp) e vertebrados selvagens (marsupiais, roedores e aves) podem ser importantes no ciclo de transmissão e disseminação do vírus (3, 4, 5, 6, 7).

O vírus Mayaro, assim como o vírus Chikungunya, tem alto potencial para urbanização e emergência, devido à capacidade desses vírus de sofrerem mutações e se adaptarem a novos ciclos de transmissão (8). Estudos recentes realizados no Brasil já têm demonstrado a ocorrência de febre Mayaro em áreas urbanas de Manaus e Mato Grosso. Em Cuiabá um estudo de vigilância entomológica identificou as espécies de mosquitos *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* naturalmente infectadas pelo MAYV, corroborando a ocorrência de transmissão urbana em Cuiabá e possivelmente em outras cidades da região central do Brasil (9, 10, 11). Isso mostra que a febre Mayaro deve ser incluída no diagnóstico diferencial com Dengue vírus (DENV), Chikungunya vírus (CHIKV) e Zika vírus (ZIKV) em áreas onde a co-circulação desses arbovírus ocorre (12). Além disso, os relatos recentes de turistas europeus que visitaram a região Amazônica e retornaram para seus países com sintomas característicos da febre Mayaro, ressalta a preocupação do MAYV como uma potencial doença emergente na Europa, onde o *Aedes albopictus* está presente e experimentalmente foi capaz de transmitir o MAYV (13, 14, 15).

A febre Mayaro é caracteriza por ser uma doença autolimitante, que pode variar de leve a moderadamente severa. As manifestações clínicas incluem febre, dor de cabeça, dor ocular, erupção cutânea, fotofobia, edema articular, mialgia e artralgia. Também já

foram observados fenômenos hemorrágicos, como petéquias, sangramento gengival e epistaxe (9, 10, 16). Assim como outros alfavírus artritogênicos, o MAYV também induz poliartralgias incapacitantes e de longa duração, sendo as articulações do pulso, tornozelo e pequenas articulações das mãos e pés, predominantemente afetadas (14, 17).

Como a fisiopatologia do MAYV não é completamente elucidada e ele representa um importante problema de saúde pública, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo animal para o estudo da patogênese induzida pelo MAYV. Os resultados demonstraram que os camundongos Balb/c com 15 dias desenvolveram doença aguda com dano musculoesquelético, que incluiu miosite, artrite, tenossinovite e periostite. Uma forte resposta inflamatória foi induzida nos dias iniciais a infecção, a qual foi controlada pela ação de IL-10. Esses resultados mostram o estabelecimento de modelo animal para estudo da patogênese do vírus Mayaro.

RESULTADOS

Avaliação dos sinais clínicos da doença nos animais infectados

A inoculação dos animais foi realizada por duas vias distintas, abaixo do membro torácico e na almofada da pata posterior pélvica, determinados como grupo 1 e grupo 2, respectivamente. Os sinais clínicos como piloereção, postura encurvada e irritação do olho foram observados nos dois grupos (TABELA 1).

Tabela 1. Sinais clínicos observados em camundongos Balb/c durante infecção pelo Vírus Mayaro.

	Infectado abaixo do membro torácico	Infectado na almofada da pata pélvica
*Piloereção	(2-21)	(2-20)
*Postura encurvada	(2-19)	(2-19)
*Irritação no olho	(variável)	(variável)
*Alteração da marcha	(6-21)	—
Tremores	(7,20-21)	—
Moribundo	(5-16)	—
Caindo e circulando espontaneamente	(7)	—
Morte	(6,8, 13-14)	—

* Sinais clínicos comuns na infecção. — Ausência de sinal clínico. Os números entre parênteses correspondem os dias em que o sinal foi observado.

A irritação no olho foi caracterizada por fotofobia, lacrimejamento, blefaroespasmo, podendo apresentar-se unilateral ou bilateralmente (FIG 1).

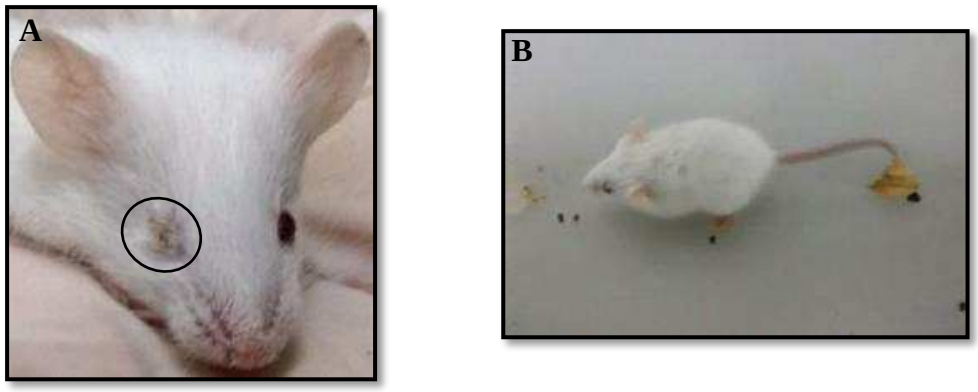


Figura 1. Camundongo Balb/c infectado com MAYV abaixo do membro torácico. A) Animal apresentando irritação do olho e piloereção com 8 dias pós-infecção. A irritação no olho mostra-se unilateralmente, com fotofobia e lacrimejamento. B) Animal com postura curvada.

Apenas os animais do grupo 1 apresentaram perda de peso nos dias iniciais pós-infecção (PI), do dia 1 ao dia 4 PI, e alteração na marcha (FIG. 2). Alguns sinais como arrastar de membros posteriores, tremores e animais caindo e circulando espontaneamente foram observados em um único experimento nos animais do grupo 1. A alteração na marcha dos animais foi mais severa a partir do 10º dia PI. Os tremores foram observados somente em três animais e apenas um único animal apresentou o sinal caindo e circulando espontaneamente. Além disso, 33% dos animais sucumbiram à infecção nesse mesmo experimento (FIG. 3). A análise de tecidos e órgãos desses animais por PCR e Nested-PCR mostrou a presença do RNA viral no baço, coração, fígado, músculo, articulação, sistema nervoso central, olho, intestino e língua *(material suplementar)*.

Perda de força física

A partir do teste físico verificou-se que ambos os grupos infectados apresentaram, em relação aos controles, médias de tempo significativamente menores, mas não entre eles (FIG.4A, B e C). Pelo gráfico observa-se que nos cinco primeiros dias os quatro grupos apresentaram médias de tempo bem próximas e também baixas (FIG.4D). Até o décimo dia pós-infecção foi observado um aumento do tempo dos quatro grupos. Porém, a partir do décimo dia foi observada diferença significativa entre os grupos infectados e

os grupos não infectados. No 16º dia o grupo 2 começou a aumentar o tempo de permanência, enquanto nos animais do grupo 1 esse aumento ocorreu a partir do 17º dia.

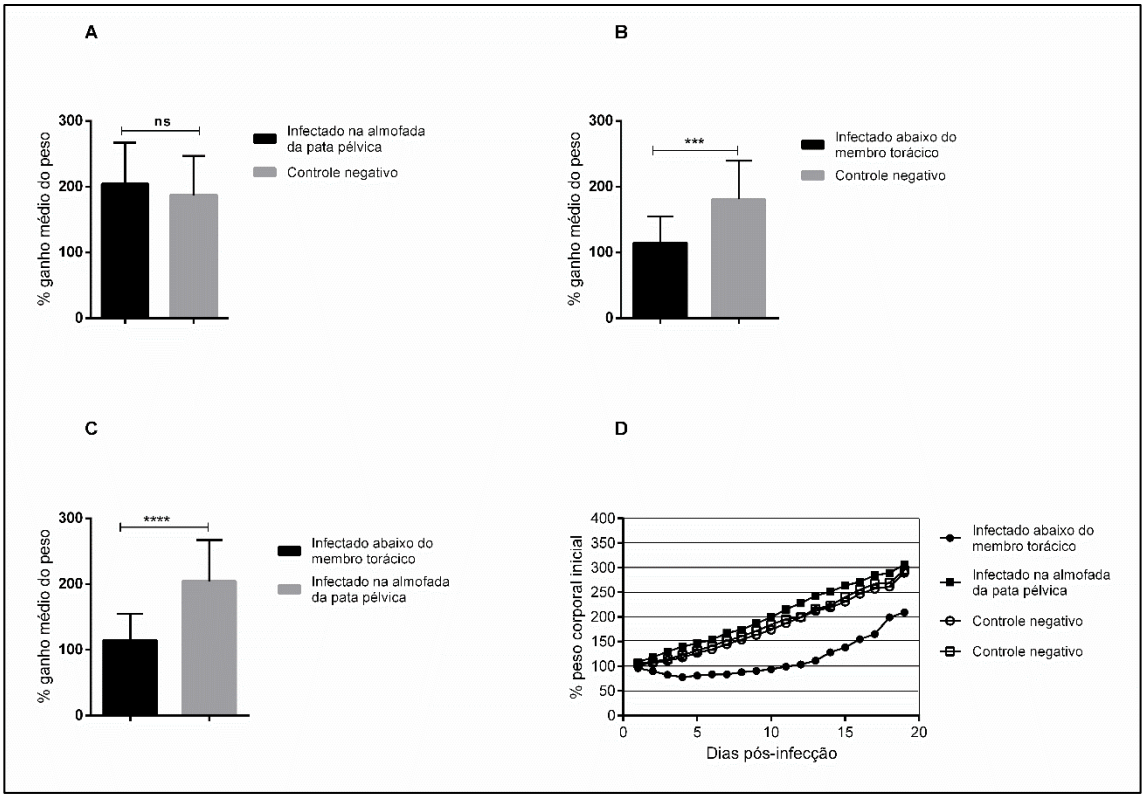


Figura 2. Vírus Mayaro induz perda de peso em camundongos Balb/c com 15 dias de idade. Camundongos Balb/c com 15 dias de idade foram infectados com 2,57 x 10^6 PFU na almofada da pata pélvica e com 1,25x10^7 PFU abaixo do membro torácico por injeção subcutânea. Os grupos controle receberam somente PBS1X. (A) O ganho médio de peso dos animais infectados na almofada da pata posterior não foi significativo em relação ao controle. (B) O ganho médio de peso dos animais infectados abaixo do membro anterior foi significativamente menor que o grupo controle. (C) Os animais infectados abaixo do membro anterior apresentaram um ganho médio significativamente menor que o grupo infectado na almofada da pata posterior. (D) Os animais foram monitorados em intervalos de 24 horas quanto ao ganho e perda de peso. (*** P value < 0.0002; **** P value < 0.0001). N=12 animais/grupo.

Miosite e artrite induzidas pelo vírus Mayaro

A análise das alterações morfológicas induzidas pelo MAYV foi realizada no músculo esquelético e articulação, nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 PI. Nas duas vias de infecção a miosite ocorreu de forma simétrica, afetando o músculo esquelético dos membros pélvicos de maneira semelhante. Porém, no membro contralateral (direito) da via de infecção na almofada da pata o dano foi mais moderado.

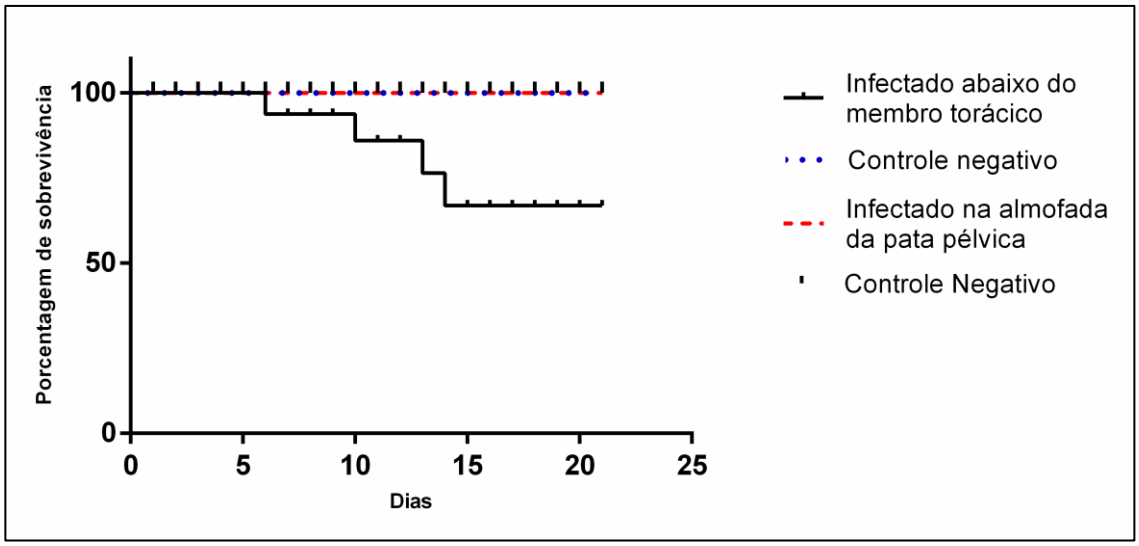


Figura 3. Sobrevivência de camundongos Balb/c com 15 dias de idade infectados abaixo do membro anterior por via subcutânea. (N=12/grupo).

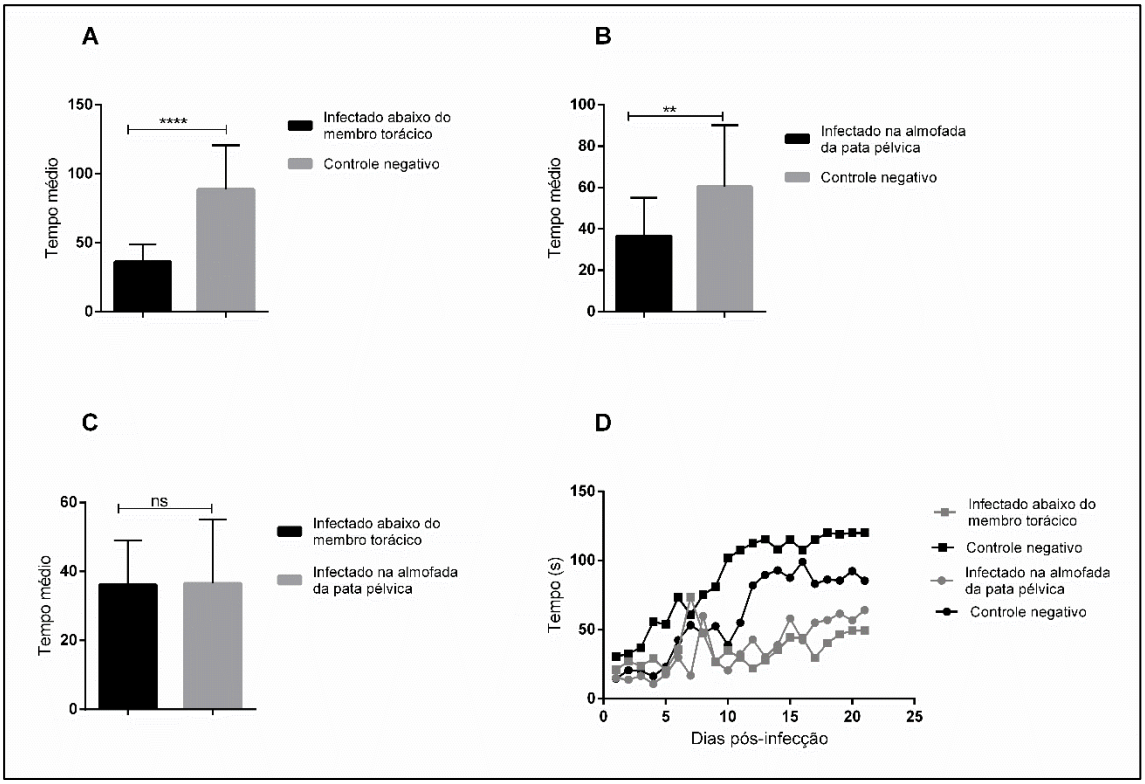


Figura 4. Avaliação de fraqueza muscular em camundongos Balb/c com 15 dias de idade. Camundongos Balb/c com 15 dias de idade foram infectados com 2,57 x 10^6 PFU na almofada da pata pélvica; com 1,25x10^7 PFU abaixo do membro torácico por injeção subcutânea. (A e B) Os grupos infectados apresentaram médias de tempo significativamente menores que o controle. (C) Os grupos infectados não apresentaram diferença no tempo médio em que se mantiveram agarrado. (D) Os camundongos foram submetidos ao teste físico Wire-hang em intervalos de 24 horas. (** P value < 0.0034; **** P value < 0.0001). N=12 animais/grupo.

No grupo 1, pouca ou nenhuma inflamação foi observada no dia 3 PI, estando o tecido com aspecto muito similar ao controle (FIG. 5B e 6B). Porém, nos dias 7 e 10 PI o processo inflamatório atingiu seu pico (FIG.5 C e D; FIG.6 C e D), com evidente presença de fibras em degeneração (FIG.5 C, D, G e H; FIG.6 C e H), as quais são caracterizadas por coloração pálida e aspecto intumescido. Foi observado também deposição de colágeno (FIG.5C) e presença de vasculite (FIG.5 I). Com 15 e 20 dias PI ainda havia a presença de pequenos focos de infiltrado inflamatório, mas a característica marcante foi o aumento no número de núcleos no tecido. Nas articulações e ossos do pé, assim como aconteceu no músculo, não foi observada inflamação no dia 3 PI, mas a partir do dia 7 PI observou-se a presença de células inflamatórias na membrana sinovial, tendão, ligamento, periósteo e extensa inflamação e destruição do músculo associado (FIG.7).

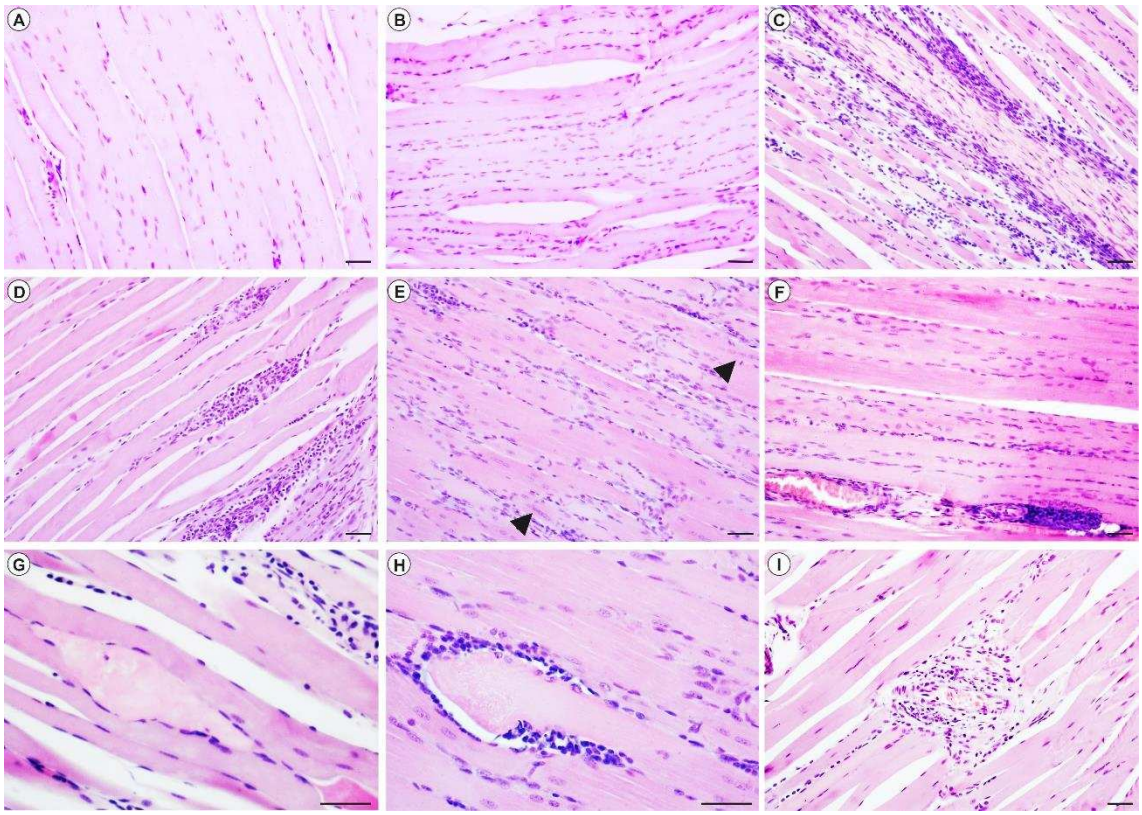


Figura 5. Miosite induzida pelo vírus Mayaro no músculo ipsilateral, em camundongos infectados abaixo do membro torácico direito com 1,25x10^7 PFU. Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 p.i. para análise do dano tecidual. O tecido muscular foi fixado em Karnovsky, incluído em parafina, e seções de 5µm foram feitas e corada com HE. (A) Controle negativo. (B) Infecção pelo MAYV a 3dias PI. (C) Infecção pelo MAYV a 7 dias PI (D) Infecção pelo MAYV a 10 dias PI (E) Infecção pelo MAYV a 15 dias PI. Fibras com núcleos centralizados (ponta da seta). (F) Infecção pelo MAYV a 20 dias PI (G) Fibra em degeneração, com aspecto pálido e inchado. (H) Região de fibra em degeneração sofrendo fagocitose. (I) Vasculite. Imagens A, B, C, D, E, F e I (aumento 200X, barra de 40 µm); imagens G E H (aumento de 400X, barra de 40 µm). *N*=3 animais/grupo.

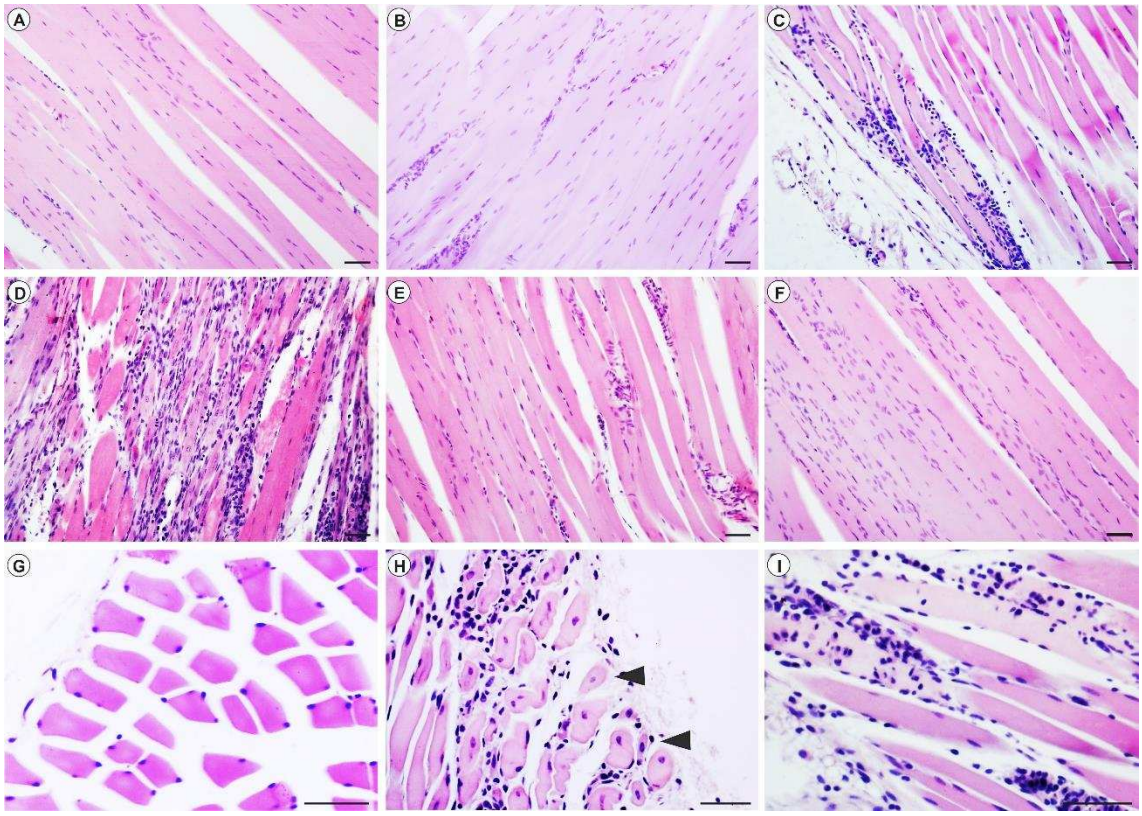


Figura 6. Miosite induzida pelo vírus Mayaro no músculo contralateral, em camundongos infectados abaixo do membro torácico direito ($1{,}25x10^7$ PFU). Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 p.i. para análise do dano tecidual. O tecido muscular foi fixado em Karnovsky, incluído em parafina, e seções de 5µm foram feitas e corada com HE. (A) Controle negativo. (B) Infecção pelo MAYV a 3dias PI. (C) Infecção pelo MAYV a 7 dias p.i. (D) Infecção pelo MAYV a 10dias PI. (E) Infecção pelo MAYV a 15dias PI. (F) Infecção pelo MAYV a 20dias PI. (G) Controle negativo, fibras em corte transversal. (H) Fibras em corte transversal apresentando núcleos centralizados (setas). (I) Fibras sofrendo fagocitose. Imagens A, B, C, D, E, F (aumento 200X), imagens G, H e I (aumento de 400X). Barra 40µm. N=3 animais/grupo.

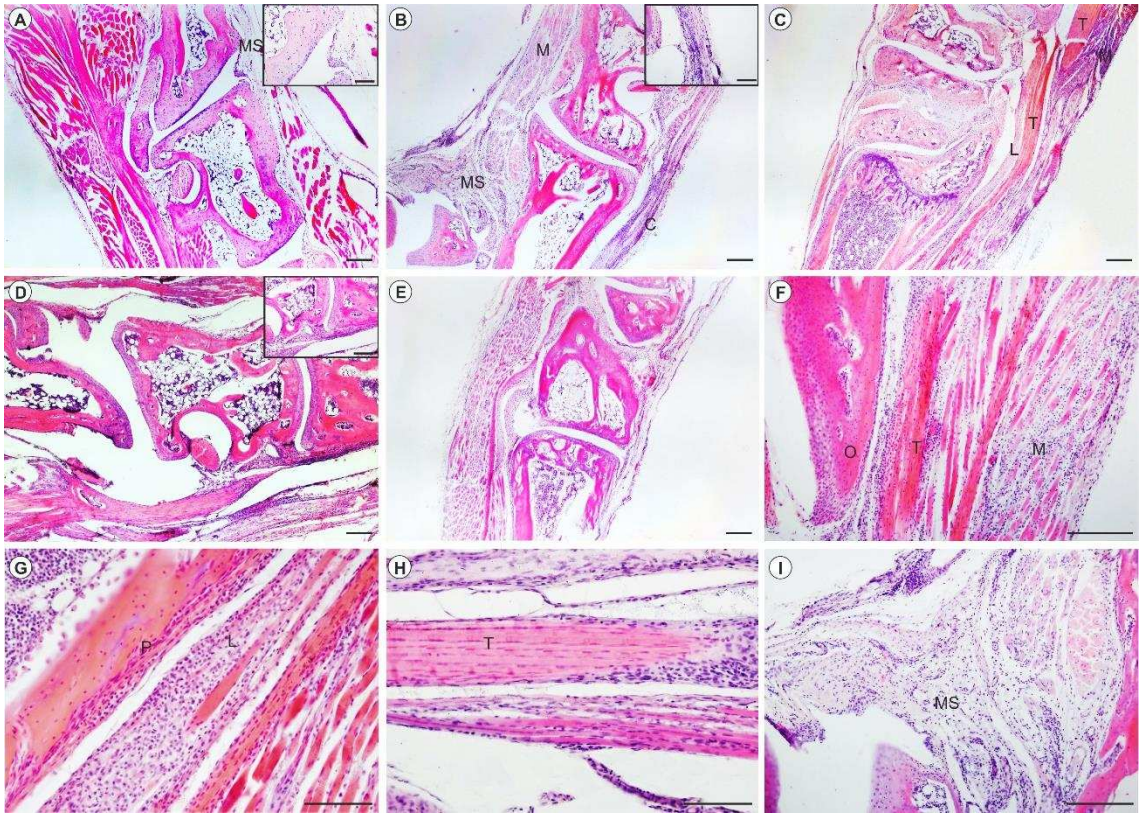


Figura 7. Artrite induzida pelo vírus Mayaro em camundongos infectados abaixo do membro torácico direito com 1,25x10^7 PFU. Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 p.i. para análise do dano tecidual. A articulaçãodo tornozelo foi fixada em Karnovsky, descalcificada em EDTA 10%, incluída em parafina, e seções de 5µm foram feitas e corada com HE. (A) Controle negativo. (B) Infiltrado na capsula, músculo e membrana sinovial com 7dias PI. (C) Infiltrado no ligamento, tendão e músculo com 10dias PI. (D) Infiltrado na membrana sinovial com 15dias PI. (E) Infecção pelo MAYV com 20dias PI. (F) Tendinite e miosite com 7 dias PI. (G) Periostite com 10 dias PI. (H) Tenossinovite com 15 dias PI. (I) Sinovite com 7 dias PI. M: músculo; T: tendão; L: ligamento; O: osso; P: periósteo; MS: Membrana sinovial. Imagens A, B, C, D, E (aumento 40X, barra de 200 µm); imagens Fe I (aumento de 100X), Imagens G e H (aumento 200X) Barra de 100 µm. N=3 animais/grupo.

No grupo 2, diferentemente do Grupo1, a inflamação no músculo teve início no dia 3PI, com a apresentou fibras em degeneração e aumento no número de núcleos no tecido (FIG.8B e 9B). Os dias 7 e 10 foram acompanhados por aumento do processo inflamatório no músculo ipsilateral, no qual se observou também pequena deposição de colágeno (FIG.8 C e D; 9 C e D). A presença de grande quantidade de núcleos no tecido foi observada até o dia 15 PI (FIG.8 E; 9 E), com total recuperação no dia 20 PI (FIG.8 F e 9F). Nos dois grupos a recuperação tecidual ocorreu entre 15 e 20 dias PI, o que é indicado pela presença de fibras com núcleos centralizados (FIG. 5E, 6H e 8F).

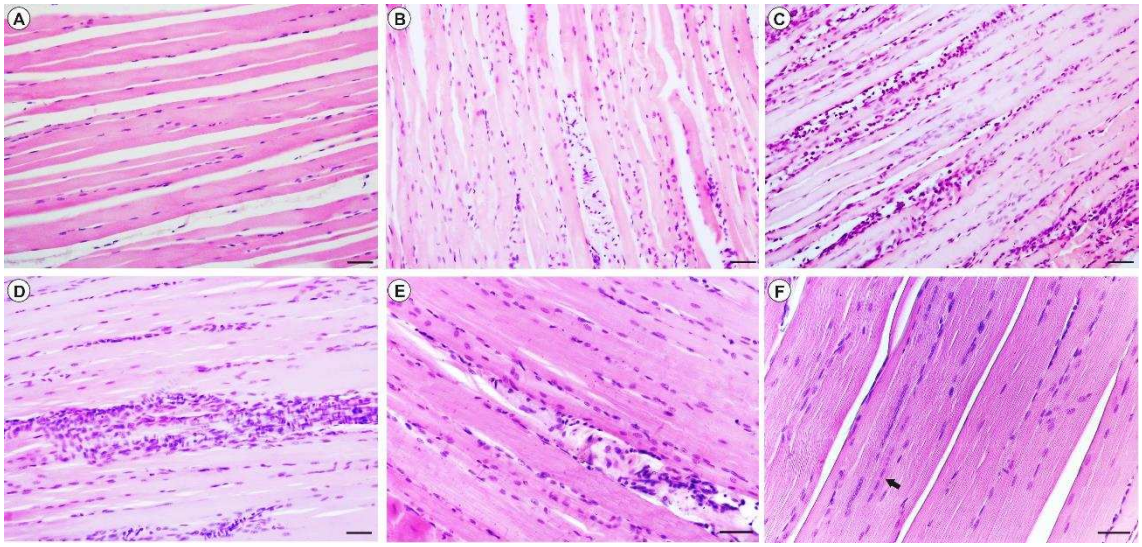


Figura 8. Miosite induzida pelo vírus Mayaro no músculo ipsilateral, em camundongos infectados na almofada da pata pélvia esquerda com 2,57 x 10^6 PFU. Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 p.i. para análise do dano tecidual. O tecido muscular foi fixado em Karnovsky, incluído em parafina, e seções de 5µm foram feitas e corada com HE. (A) Controle negativo. (B Infecção pelo MAYV a 3dias PI. (C) Infecção pelo MAYV a 7 dias PI. (D) Infecção pelo MAYV a 10dias PI. (E) Infecção pelo MAYV a 15dias PI. (F) Infecção pelo MAYV a 20dias PI, a seta indica núcleos centralizados. Imagens (aumento 200X, barra de 40 µm). N=3 animais/grupo.

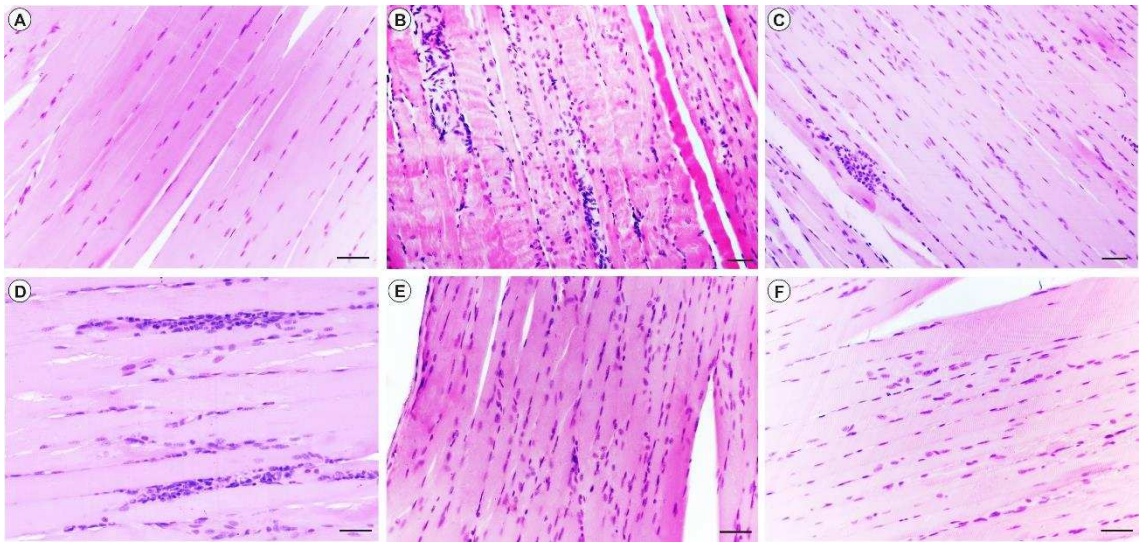


Figura 9. Miosite induzida pelo vírus Mayaro no músculo contralateral, em camundongos infectados na almofada da pata pélvica esquerda com 2,57 x 10^6 PFU. Os animais foram sacrificados nos dias 3, 7, 10, 15 e 20 p.i. para análise do dano tecidual. O tecido muscular foi fixado em Karnovsky, incluído em parafina, e seções de 5µm foram feitas e corada com HE. (A) Controle negativo. (B) Infecção pelo MAYV a 3dias PI. (C) Infecção pelo MAYV a 7 dias p.i. (D) Infecção pelo MAYV a 10dias PI. (E) Infecção pelo MAYV a 15dias PI. (F) Infecção pelo MAYV a 20dias PI. Imagens (aumento 200X, barra de 40 µm). N=3 animais/grupo.

Avaliação do perfil de citocinas

A infecção pelo MAYV ativa inicialmente o padrão Th1, induzindo uma forte resposta inflamatória, que é seguida pela indução de citocinas da resposta Th2. Os dois grupos apresentaram perfil de citocinas semelhantes no soro. No terceiro dia pós-infecção foi detectado altos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF, INF-γ e IL-6 e da quimiocina MCP-1, no soro de ambos os grupos infectados. Os níveis de TNF e INF-γ permaneceram alto até o dia 10 PI, quando também foi observado aumento da citocina anti-inflamatória IL-10. No grupo 2 com 30 dias PI foi detectado IL-4 e novamente TNF. No grupo 1 a citocina IL-4 estava presente no dia 10 PI e no dia 30 PI não foi detectada qualquer citocina (FIG. 10 e 11). No tecido muscular, MCP-1 foi detectada com altos níveis no dia 3 PI no grupo 1 (FIG.12 A), enquanto no grupo 2 estava presente nos dias 7 e 10 PI (FIG.12 B). As citocinas IL-9, IL-13 e IL-12p70 não foram encontradas no soro e tecido muscular.

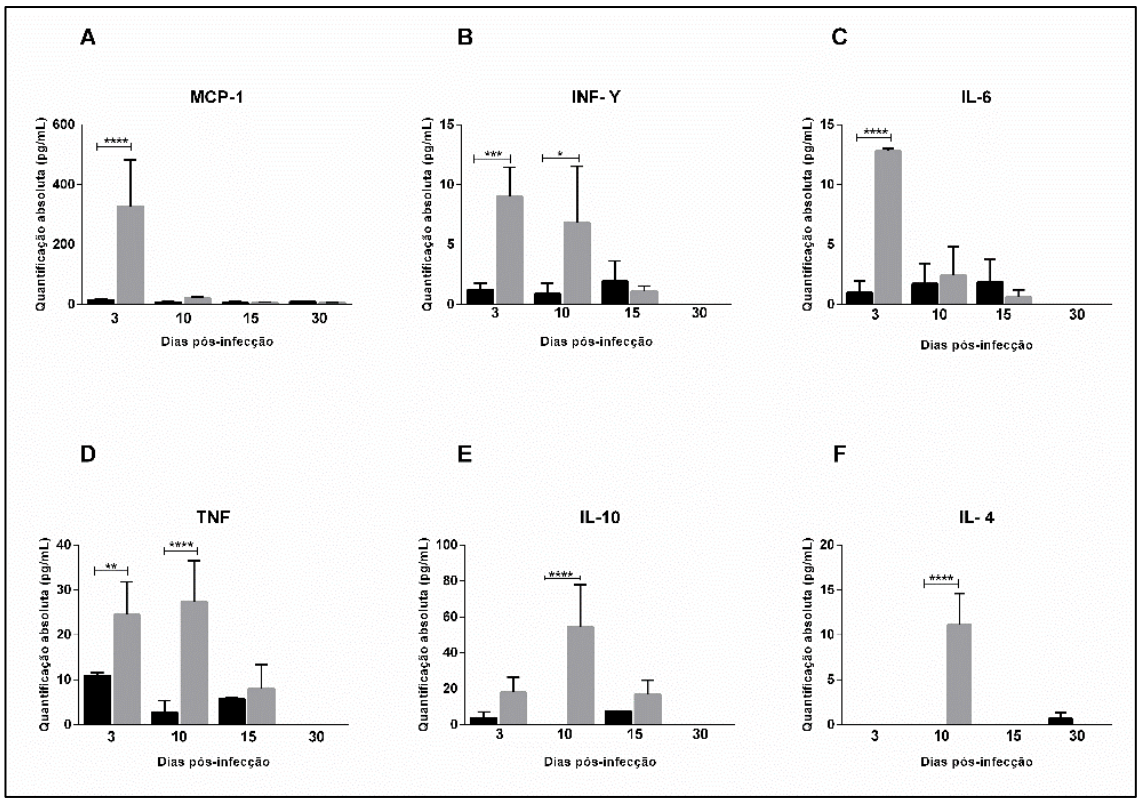


Figura 10. Perfil de citocinas de camundongos Balb/c com 15 dias de idade, infectados abaixo do membro torácico direito com 1,25x10^7 PFU. Nos dias 3, 10, 15 e 30 pós-infecção o soro foi coletado para análise dos níveis de citocinas. No dia 3 PI os níveis de MCP-1 (A), TNF (B), INF-γ (C) e IL-6 (D) estavam elevados, e TNF (B) e INF-γ (C) permaneceram com os níveis alto até o dia 10 PI. Os níveis de IL-10 (E) e IL-4 (F) aumentaram no dia 10PI. (* P value ≤ 0,05; ** P value ≤ 0,01; *** P value ≤ 0,001; **** P value ≤ 0,0001). N=3 animais/grupo.

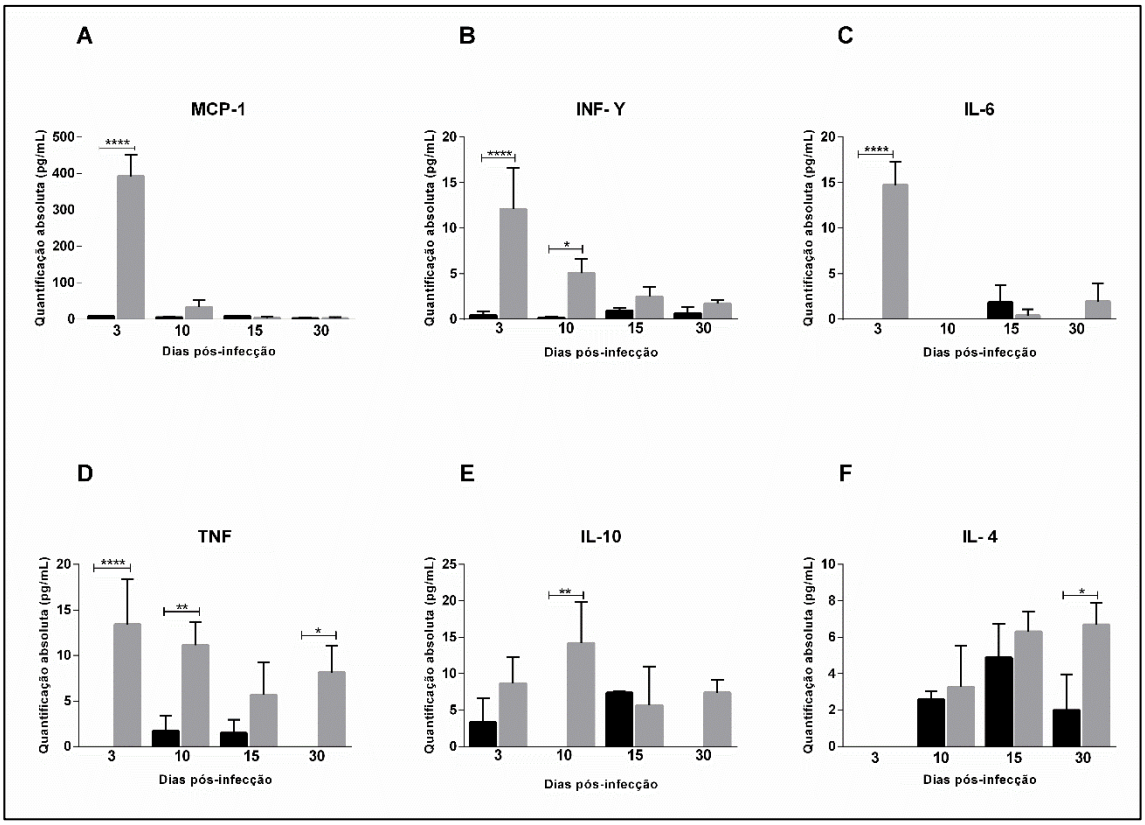


Figura 11. Perfil de citocinas de camundongos Balb/c com 15 dias de idade, infectados na almofada da pata pélvica direita com 2,57 x 10^6 PFU. Nos dias 3, 10, 15 e 30 pós-infecção o soro foi coletado para análise dos níveis dos fatores solúveis. Os níveis de MCP-1 (A), TNF (B), INF-γ (C) e IL-6 (D) estavam elevados no dia 3 PI. No dia 10 PI TNF (B) e INF-γ (C) permaneceram alto e o nível de IL-10 (E) se tornou elevado. No dia 30 PI TNF (B) e IL-4(F) estavam presentes. (* P value ≤ 0,05; ** P value ≤ 0,01; **** P value ≤ 0,0001). *N*=3 animais/grupo.

Imunofenotipagem

As populações de linfócitos CD4 e CD8 foram determinadas no músculo esquelético com 3 dias PI, por citometria de fluxo. No grupo 2 observou-se aumento de CD8, acompanhado por diminuição de CD4, enquanto no grupo 1 as populações de CD4 e CD8 permaneceram iguais ao controle negativo (FIG. 13).

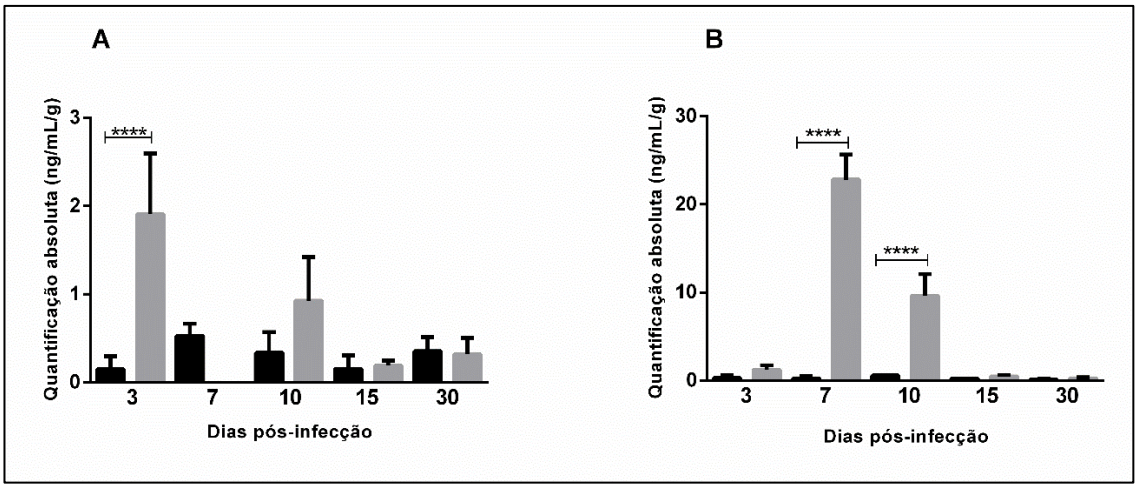


Figura 12. Detecção de MCP-1 no tecido muscular. No grupo infectado abaixo do membro torácico ($1{,}25x10^7$ PFU) MCP-1 estava elevada somente no dia 3PI (A). Enquanto no grupo infectado na almofada da pata pélvica ($2{,}57x10^6$ PFU), MCP-1 foi detectada nos dias 7 e 10PI (B). (**** P value ≤ 0,0001). N=3 animais/grupo.

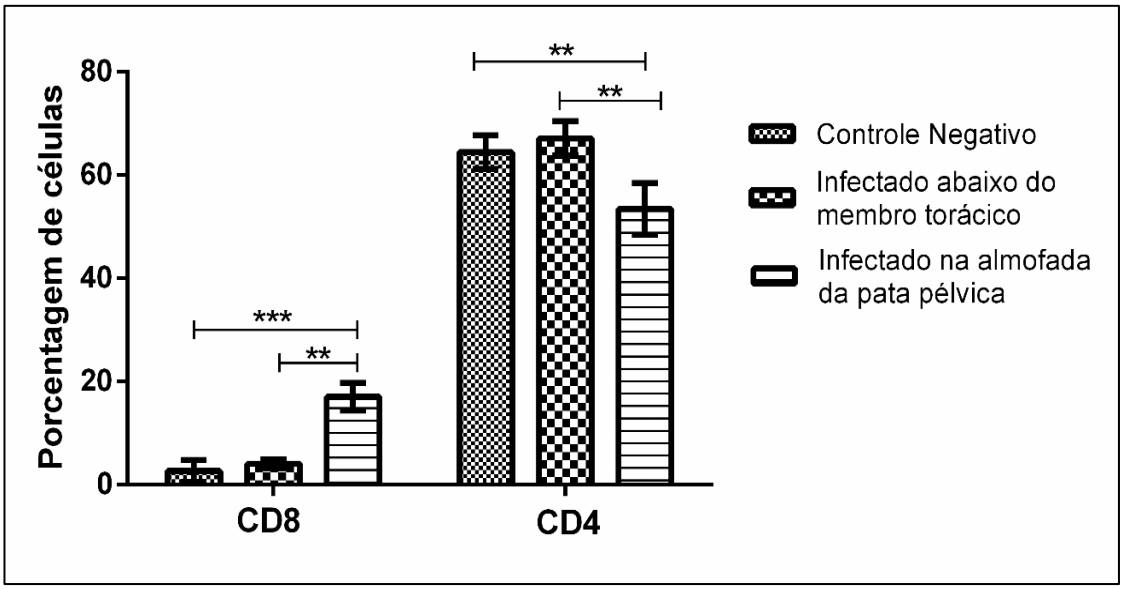


Figura 13. Determinação da população de linfócitos no tecido muscular dos camundongos Balb/c. O músculo foi removido com 3 dias PI a partir dos grupos infectados com o vírus Mayaro e dos grupos controle. As células foram isoladas e marcadas com os anticorpos anti-CD8a (PercPcy5) e anti-CD4 (APC-cyanina-7). (** P value ≤ 0,01; *** P value ≤ 0,001). *N*=3 animais/grupo.

Avaliação da dor

Até agora, mostramos que a infecção por MAYV induziu alterações clínicas, morfológicas e inflamatórias. Nossa próxima pergunta foi se esses índices inflamatórios foram associados à disfunção articular. Para isso, animais com 28 dias foram utilizados para avaliar a intensidade da hipernocicepção. Nossos resultados revelaram que no dia 3 da infecção por MAYV, ambos os grupos infectados, apresentaram uma diminuição nos

limiares nociceptivo em comparação aos grupos controles. Nos dias 7, 10, 15 e 21, os limiares nococeptivos eram semelhantes aos níveis basais. Além disso, não foram detectados quaisquer sinais clínicos adicionais de doença nesses camundongos após a inoculação de MAYV.

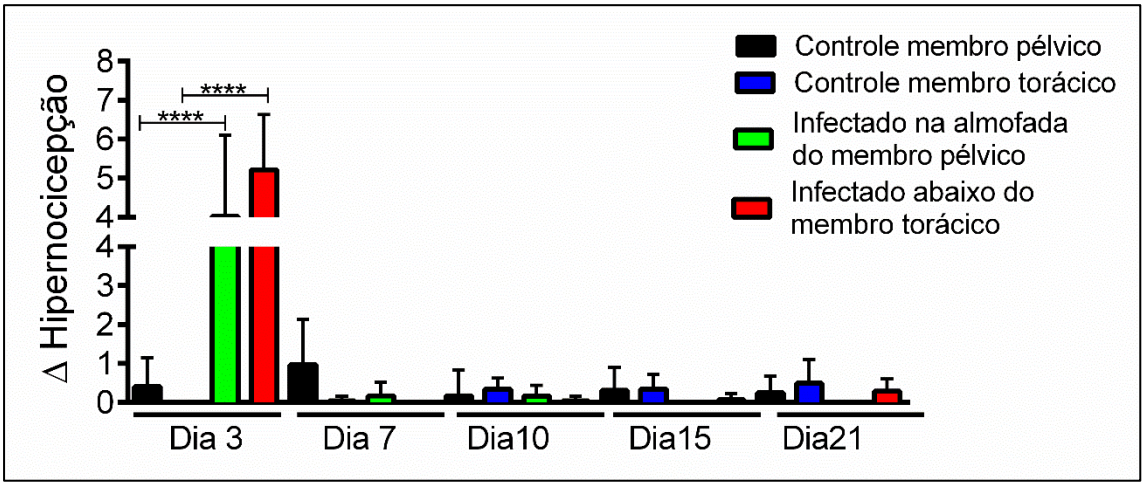


Figura 14. Avaliação do limiar de dor pelo método de von Frey nos animais infectados com o vírus Mayaro (**** P value ≤ 0,0001). N=8 animais/grupo.

DISCUSSÃO

Os alfavírus artritogênicos compreendem os vírus Chikungunya (CHIKV), Sindbis (SINV), Ross River (RRV), Mayaro (MAYV), Barmah Forest (BFV) e O'nyong'nyong (ONNV), os quais estão associados com artrite e/ou artralgia debilitante, e em alguns casos com patologias ósseas (18, 19). De acordo com Herrero et al. (2011) , esses vírus são considerados um importante problema socioeconômico, pois apresentam potencial para causarem grandes epidemias com significativo impacto na saúde humana e economia, devido ao poder debilitante (20, 21). A compreensão atual dos mecanismos envolvidos na patogênese alfaviral tem se baseado em estudos com modelos animais e observações clínicas, principalmente com RRV e CHIKV. Com o risco de emergência e urbanização do MAYV na América do Sul e outros continentes, torna-se necessário compreender a patologia e resposta imune desse vírus. Portanto, este trabalho apresenta o primeiro modelo animal de artrite e miosite induzidas pelo MAYV.

No estabelecimento de modelos animais murinos para alfavírus, a idade do animal tem sido considerada um fator determinante na suscetibilidade e severidade da doença. Como os camundongos neonatos e jovens são mais suscetíveis, eles têm sido os mais

usados para reproduzir a doença alfaviral (22-25). A resistência de camundongos adultos a infecção por alfavírus é devido aos Interferons tipo I, que rapidamente conferem um estado antiviral (23, 26). Isso tem sido mostrado em experimentos com camundongos adultos IFN-α/βR$^{+/-}$ e IFN-α/βR$^{-/-}$ que desenvolvem doença moderada ou severa, respectivamente (26). Neste trabalho foi mostrado que os camundongos Balb/c com 15 dias idade e, independente da via de infecção, foram suscetíveis à doença induzida pelo MAYV. No entanto, animais com quatro semanas de idade utilizados no teste de dor, foram resistentes a infecção. Saey et al (1981) também observou que camundongos Balb/c com 4 semanas não são suscetíveis ao RRV (27).

Os sinais clínicos como piloereção, postura encurvada e irritação nos olhos foram comuns e frequentes nas duas vias de infecção. A irritação no olho não tem sido descrita em nenhum modelo animal para alfavírus, embora seja um sintoma frequente em pacientes com Febre Mayaro, que relatam fotofobia e dor retro-ocular (9, 12, 28, 29). Além disso, há relatos que o CHIKV pode infectar a córnea de humanos e ser transmitido por via ocular (30). Assim, torna-se importante investigar o tropismo do MAYV por tecidos dos olhos, e o seu potencial de transmissão por essa via em humanos. Os sinais de doença como alteração na marcha, perda de peso e morte foram apresentados apenas pelos animais infectados abaixo do membro torácico e têm sido descritos para RRV independente da via (25). Quanto aos sinais de tremores, postura encurvada e animais caindo e circulando espontaneamente não foram encontrados relatos na literatura.

Nos animais que apresentaram doença severa e sucumbiram à infecção, o RNA viral detectado no fígado, baço, intestino, olho, língua, cérebro, medula espinhal, rim, músculo e articulação (*material suplementar-MS*). De acordo com Couderc et al (2008), o desenvolvimento de doença severa na infecção por CHIKV, em camundongos e humanos, está relacionado com alta carga viral no organismo e disseminação para outros órgãos, além do músculo e articulações (23). A presença do SINV em vários órgãos similares ao que encontramos para MAYV tem sido demonstrada em camundongos deficientes em IFN-α/β, mostrando que uma resposta ineficiente de IFN tipo I contribui para maior replicação e disseminação viral (26). Nos animais que morreram nos dias 6 e 10 PI, o RNA viral foi detectado apenas no coração (FIG. 1 e 2 *MS*). Ziegle mostrou que o CHIKV também infectou o coração de animais com 7 e 8 PI, e induziu calcificação distrófica no miocárdio em camundongos selvagens. No olho, o RNA viral foi detectado

no animal que morreu com 14 PI, mostrando que, como o CHIKV, o MAYV também tem tropismo por tecidos do olho em modelo animal (FIG. 4 *MS*) (30). Os sinais como tremores e caindo e circulando espontaneamente estão associados à presença do MAYV no sistema nervoso, que foi detectado nos dias 13 e 14 PI (FIG. 3 e 4 *MS*). Um trabalho recente relatou a presença do CHIKV na saliva de camundongos deficientes em IFN-α/β com lesões na cavidade oral, e em macacos e humanos com manifestações hemorrágicas nas cavidades oral e nasal (31). Isso pode explicar a detecção do MAYV na língua (FIG. 4), apesar dessas lesões não terem sido relatadas para animais selvagens. A investigação do MAYV na saliva de pacientes com febre Mayaro é importante, uma vez que pode representar uma possível via de transmissão

A infecção também resultou em várias mudanças histopatológicas, como miosite, tenossinovite, sinovite e periostite. Essas alterações teciduais foram responsáveis pela menor força dos animais infectados no teste físico. Essa perda de resistência foi mais intensa no dia 10 PI e persistiu até o 15º dia PI, correspondendo ao pico do dano tecidual e início do processo de regeneração, respectivamente. As duas vias de infecção foram capazes de causar miosite, mas na via abaixo do membro torácico a inflamação foi mais severa, com maior presença de infiltrados e destruição de fibras musculares. Os danos teciduais descritos para o MAYV são semelhantes aos encontrados em modelos animais para CHIKV e RRV, para os quais são relatados extensa degeneração e necrose do músculo esquelético, inflamação do periósteo e tecidos associados a articulação (24, 25, 32). Ziegle também observou que a infecção de camundongos da linhagem ICR com 14 dias de idade pelo MAYV resulta em danos ao músculo esquelético e tecidos conjuntivos (24).

Novas lesões potencialmente agressivas têm sido identificas em infecções por CHIKV em animais, como necrose da cartilagem e proliferação óssea no periósteo. Em paciente com CHIKV, exames por imagem têm revelado a presença de tenossinovite, engrossamento sinovial, periostite, proliferação do periósteo e erosão óssea. Esses achados clínicos mostram que a doença aguda inicial pode progredir para uma artrite erosiva crônica (19, 32, 33). Neste trabalho, a identificação de tenossinovite e periostite nos animais infectados pelo MAYV, ressalta a importância dos exames por imagens nos estudos clínicos de pacientes com poliartralgia prolongada.

A febre Mayaro, assim como infecção por outros alfavírus, causa dores articulares persistentes e muitas vezes incapacitantes (34). A dor articular é decorrente da ação de citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF-α e IL-1β, e também do dano tecidual, que sensibilizam os nociceptores (35). Na avaliação do limiar nociceptivo, verificamos que os animais sentiram dor apenas no 3º dia, o que deve está associado com a idade dos animais, pois neste experimento foram utilizados animais com quatro semanas. Ao longo do experimento esses animais não desenvolveram qualquer sinal clínico, mostrando que foram resistentes à doença e que a idade também é um fator importante na infecção pelo MAYV. Portanto, o único pico de dor no dia 3 PI está associado com a resposta inflamatória para controle da infecção e ausência de dano tecidual.

A avaliação do perfil de citocinas mostrou que MAYV induz uma forte resposta inflamatória nos dias iniciais à infecção, mediada pelas citocinas TNF-α, IL-6 e INF-γ e quimiocina MCP-1. Esses mediadores também têm sido expressos em modelos animais para RRV e CHIKV, e mais recentemente foi demonstrado em pacientes com Febre Mayaro (36, 37, 38). Os altos níveis de IL-6 e TNF-α nos dias iniciais provavelmente são responsáveis por induzir a dor observada nos animais no dia 3 PI. Em pacientes com artralgia crônica na infecção pelo MAYV esses fatores também se encontram elevados (38). A reposta inflamatória inicial nos animais foi rapidamente controlada pela ação anti-inflamatória de IL-10. Além do controle da resposta imune, IL-10 também tem um papel importante na regeneração muscular, por induzir a troca de macrófagos do fenótipo M1 para o M2 no músculo injuriado (39). Essa ação de IL-10 na recuperão tecidual é indicado pela presença de fibras com núcleos centralizados, o qual é uma característica do processo de regeneração muscular. A presença de INF-γ e IL-4 sugere a participação da imunidade adaptativa, o que foi confirmada pela presença dos linfócitos CD8+ e CD4+ no grupo 2. Um segundo aumento nos níveis de TNF-α com 30 PI no grupo 2 pode indicar a persistência do RNA viral no tecido, como tem sido demonstrado para CHIKV (40).

Nos pacientes com artralgia prolongada na infecção pelo MAYV os níveis de IL-1Ra, IL-6, IL-7, IL-8, IL-13, IL-17, G-CSF, IFN-γ, PDGF-BB, TNF-α, VEGF e IL-12p70 se mantiveram elevados durante 12 meses após a infecção. A fase aguda foi marcada pela alta expressão de MCP-1, enquanto na fase convalescente IL-9 e IL-2 foram predominantes. Esses dados mostram que uma robusta resposta inflamatória na fase inicial está associada com o desenvolvimento da artralgia crônica (38). As citocinas IL-

13, IL-9, IL-12p70 e IL-17 também foram avaliadas nos animais, mas não apresentaram diferenças em relação ao controle. Os principais mediadores anti-inflamatórios induzidos em humanos foram IL-1Ra e PDGF-BB (38), diferente dos resultados encontrado neste trabalho utilizando animais, em que IL-10 foi a responsável pelo controle da inflamação

A caracterização do papel das células imunes na doença alfaviral tem considerado os macrófagos e seus produtos pró-inflamatórios MCP-1, TNF e INF-γ, os principais fatores críticos no desenvolvimento da miosite e artrite de RRV e CHIKV (41-43). Na imunidade adaptativa os linfócitos têm apresentado respostas variáveis aos diferentes alfavírus. Na infecção por RRV os linfócitos B e T não estão envolvidos no dano tecidual e as células T são importantes no controle da replicação viral, enquanto para CHIKV, Sindbis e Barmah Forest elas contribuem para patogênese, especialmente as células TCD4+ (44,45).

O infiltrado inflamatório do MAYV não foi completamente caracterizado, sendo analisado somente a população de linfócitos. No grupo 2 verificou-se um aumento de CD8+ e diminuição de CD4+ no dia 3 PI. Esse padrão foi semelhante ao encontrado em pacientes infectados com CHIKV, que mostraram uma resposta de linfócitos CD8+ nos estágios iniciais da doença, seguida pela resposta de CD4+ nos estágios tardios. Esse atraso na resposta de CD4+ foi explicado por aumento dos marcadores de apoptose nessas células nos dois primeiros dias da doença (46), o que demonstra a necessidade de investigar se a infecção por MAYV também pode induzir a morte dessas células. A observação do menor dano tecidual nesse grupo pode estar associada a essa rápida resposta inicial e predominantemente com padrão CD8+, indicando o papel importante dessas células no controle da infecção, como tem sido observado para RRV (44). No grupo 1 não foram observadas diferenças em relação ao controle no dia 3 PI, sendo necessário avaliar outros tempos pós-infecção para determinarmos a cinética e o papel dessas células nas duas vias de infecção. Além disso também é importante uma imonofenotipagem completa do infiltrado para definir todos os tipos celulares.

Esses resultados mostram que o modelo animal para o vírus Mayaro conseguiu reproduzir a doença aguda que ocorre em humanos, independente da via de infecção, e que é adequado para a compreensão de grande parte dos eventos decorrentes da infecção por MAYV. As diferenças encontradas entre as vias podem estar relacionadas com a imunidade adaptativa, e os sítios primários e secundários de infecção, o que deve ser

investigado em próximos estudos. Apesar de não termos caracterizado o infiltrado inflamatório, a presença das citocinas MCP-1, TNF e INF-γ soro, e também de MCP-1 no músculo, indicam a ação dos macrófagos nos tecidos alvo da infecção, o que torna essa célula e o MCP-1 importantes elementos comuns na terapia da artrite causada por RRV, CHIKV e MAYV. É importante também que mais estudos sejam realizados em pacientes, uma vez que apresentamos aqui evidências para transmissão ocular ou por saliva, e também danos teciduais severos.

MATERIAL E MÉTODOS

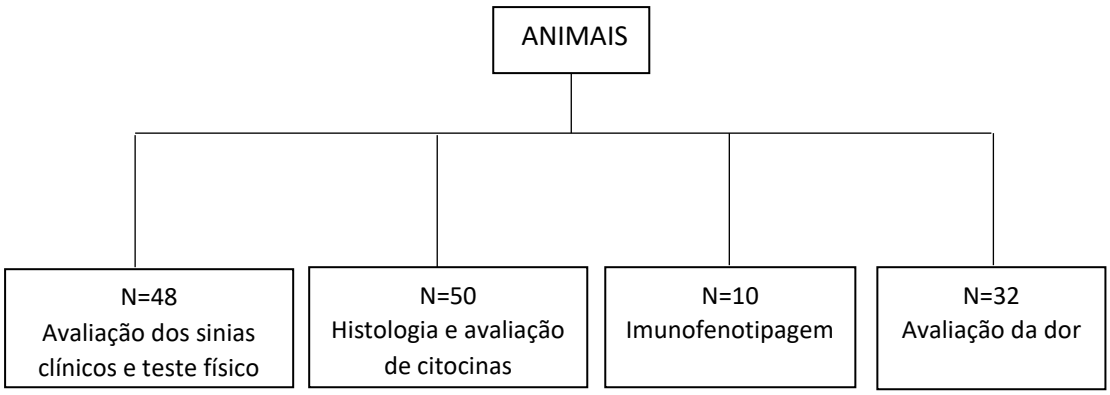
Titulação Viral

O vírus Mayaro (ATCC VR-66, cepa TR 4675) foi gentilmente fornecido pelo Dr. Davis Ferreira, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. As células Vero foram propagadas a 37°C em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e repicadas e plaqueadas em placas de 24 poços (3×10^5 células por poço) para titulação viral. As placas foram incubadas a 37°C e ao atingir uma confluência de aproximadamente 80%, o meio foi removido e foram adicionados 100 µl de cada diluição do vírus, utilizando diluições seriadas de ordem 10. Os poços controle receberam somente tampão fosfato (PBS). Após 1 hora no agitador, adicionou-se 1,5 mL de CMC a 3% (carboximetilcelulose 3%, suplementado com 2% de SFB). As placas foram incubadas novamente a 37°C durante 48 horas, e ao longo deste período observaram-se os efeitos citopáticos. Após a incubação, foram removidos 500 µL de CMC 3% de cada poço e adicionado 1 mL de formaldeído a 20%, mantido durante 1 hora nestas condições de incubação. Em seguida as placas foram lavadas e adicionados 500 µL de cristal violeta (CV) na concentração de 5%, incubadas durante 30 minutos. Em seguida elas foram lavadas para contagem das placas de lise e obtenção do título viral em UFP/mL (Unidades Formadoras de Placas/mL).

Animais

Camundongos Balb/c foram obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, e todos os procedimentos foram realizados com o consentimento do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal de Viçosa, número de protocolo 63- 2013. Animais com 15 dias, de ambos os sexos, foram inoculados por via subcutânea usando duas rotas diferentes: na almofada da pata pélvica direita e no tórax, abaixo do membro torácico direito. Os animais infectados no tórax (grupo 1), abaixo do membro, recebeu 50 µL ($1{,}25 \times 10^7$ PFU) de suspensão de vírus em tampão (solução salina tamponada com fosfato [PBS]), enquanto os animais infectados na almofada da pata pélvica (grupo 2) recebeu 10 µL ($2{,}57 \times 10^6$ PFU) de suspensão de vírus. Os grupos controles de cada via receberam somente PBS.

Delineamento experimental



Avaliação dos sinais clínicos e teste físico

Os animais foram observados durante um período de 21 dias, durante este período foram monitorados a cada 24 horas, quanto aos sinais clínicos da doença, como perda de peso e fraqueza muscular. O teste físico utilizado para avaliar a fraqueza muscular foi o Wire-hang, modificado a partir do método descrito por Sango *et al*. 1996 (47). Este método é baseado no uso de uma grade metálica e uma caixa forrada com serragem. Em primeiro lugar, os camundongos foram colocados na grade e agitados para permitir que o animal a agarrasse. A grade foi invertida, colocada na caixa e mantida a uma altura de 23 cm. A latência de queda foi medida usando um cronômetro, com um tempo máximo estipulado de 2 minutos.

Avaliação da hipernocicepção mecânica pelo método de von Frey

O método eletrônico de von Frey baseia se no uso de um aparelho (anestesiômetro eletrônico) que tem um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O transdutor de pressão é adaptado a uma ponta de polipropileno, que é colocada em contato a pata do animal (48). A medida dos limiares nociceptivos são avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até provocar um reflexo de flexão, seguido por uma resposta de flinch após a retirada da pata. O medidor de pressão registra automaticamente o valor de pressão quando a pata é retirada. Para a realização do teste os animais foram colocados em caixas de acrílico com assoalho de arame não maleável por 15 minutos para ambientação. Um espelho inclinado abaixo da grade fornece uma visão clara da pata do animal durante as medidas. Primeiramente foi realizada a medida basal de todos os grupos antes da infecção, e as demais medidas foram feitas com 3, 7, 10, 15 e 21 dias pós-infecção. Sempre eram

realizadas duas medidas por animal em cada tempo. A intensidade da hipernocicepção é quantificada pela diferença entre medida basal e os demais tempos avaliados (delta= basal – outros tempos). Neste experimento foram utilizados animais com 28 dias de idade, pois é a idade mínima exigida para a realização do teste.

Quantificação de citocinas por citometria

Nos dias 3, 10, 15 e 30 após a infecção, o sangue foi coletado, centrifugado a 514xg durante 10 minutos e armazenado a -20°C. Os níveis de citocinas séricas foram determinados usando o kit Mouse CBA Th1 / Th2 / Th17 (BD Biosciences, Nova Jersey, Estados Unidos), que quantifica simultaneamente IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN-γ e TNF, e os CBA flex IL-9, IL-13, MCP-1 e IL12-p70, seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de IL-9, IL-13, MCP-1 e IL12-p70 também foram avaliados no tecido muscular nos dias 3, 7, 10, 15 e 30 após a infecção. Para isso, o músculo foi macerado em PBS, centrifugado a 2000 rpm e armazenado a -80°C. Os dados foram adquiridos pelo Citômetro de Fluxo BD FACS Verse (BD Biosciences, Nova Jersey, Estados Unidos), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV.

Detecção de células imunes no tecido muscular

O músculo removido foi fragmentado e depois incubado em 5mL de RPMI 1640 durante 1,5 h a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e passado para um tubo novo. As células foram centrifugadas a 500 xg durante 10 minutos e tratadas com tampão de hemólise (NH_4Cl e Tris-HCl, pH 7,3) durante 5 minutos e depois centrifugadas novamente nas mesmas condições anteriormente mencionadas. As células foram suspensas em 1 mL de soro fetal bovino com 10% de dimetilsulfóxido e armazenadas a -80°C. Para a marcação 1 x 10^6 células foram contadas e incubadas com os anticorpos anti-CD8a (PercPcy5) e anti-CD4 (APC-cy7), por 15 minutos.

Análise histológica

Para a realização das análises histológicas, os camundongos foram eutanasiados e os tecidos de interesse removidos e fixados em Karnovsky (Paraformaldeído 4% e Glutaraldeído 4%, pH 7,3). Os tecidos associados ao osso foram descalcificados com EDTA 10%, pH 7,0. Em seguida, os tecidos foram incluídos em parafina e seções de 5 μm foram obtidas por microtomia, coradas com hematoxilina e eosina (H & E), e

observadas em microscopia de luz. A aquisição das imagens foi feita em microscópio Olympus DP73.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neumayr A, et al. (2012) Mayaro Virus infection in traveler returning from Amazon Basin, Northern Peru. Emerging Infectious Diseases 18: 695-696.
2. Lednicky J, et al. (2016) Mayaro Virus in child with acute febrile illness, Haiti, 2015. Emerging Infectious Diseases 22: 2000-2002.
3. August AJ, et al. (2015) Evolutionary and ecological caracterization of Mayaro Virus strains isolated during an outbreak, Venezuela, 2010. Emerging Infectious Diseases 21: 1742-1750.
4. Hoch AL, et al. (1981) An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. III. Entomological and ecological studies. Am J Trop Med Hyg 30:689–698.
5. De Thoisy B, Gardon J, Salas RA, Morvan J, Kazanji M (2003) Mayaro Virus in Wild Mammals, French Guiana. Emerging Infectious Diseases 9 (10): 1326–1329.
6. Calisher CH, Gutiérrez E, Maness KS, Lord RD (1974) Isolation of Mayaro virus from a migrating bird captured in Louisiana in 1967. Bulletin of the Pan American Health Organization 8 (3): 243–248.
7. Mota MTO, Ribeiro MR, Vedovello D, Nogueira ML (2015) Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. Future Virology. Review 10 (9): 1109-1122.
8. Figueiredo MLG, Figueiredo LTM (2014) Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Review 47: 677-683.
9. Mourão MPG, et al. Mayaro (2012) Fever in the City of Manaus, Brazil, 2007–2008. Vector-borne and Zoonotic Diseases 12: 42-46.
10. Zuchi N, et al. (2014) Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 109: 820-823.
11. Serra OP, et al. (2016) Mayaro virus and dengue virus 1 and 4 natural infection in culicids from Cuiabá, state of Mato Grosso, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz *111*(1): 20-29.
12. Brunini S, et al. (2017) High frequency of Mayaro Virus IgM among febrile patients, Central Brazil. Emerging Infectious Diseases 23: 1025-1026.

13. Theilacker C, et al. (2013) Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. BMC Infectious Diseases 13: 1-4.
14. Slegers CAD, et al. (2014) Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: Is there a risk for attendants to the 2014 FIFA World Cup? Journal of Clinical Virology 60:317–319.
15. Llagonne-Barets M, et al. (2016) A case of Mayaro virus infection imported from French Guiana. Journal of Clinical Virology 77: 68-69.
16. Azevedo RSS, et al. (2009) Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. Emerging Infectious Diseases 15: 1830-1832.
17. Halsey ES, et al. (2013) Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. Emerging Infectious Diseases 19: 1839-1842.
18. Suhrbier A, et al. (2012) Arthritogenic alphaviruses—an overview. Nature Review Rheumatology 8: 420-429.
19. Manimunda SP, et al. (2010) Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. Trans R Soc Trop Med Hyg 104(6):392–399.
20. Chen W, et al. (2014) Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. Trends in Microbiology. Review 23: 35-43.
21. Herrero LJ, et al. (2011) Critical role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Ross River virus-induced arthritis and myositis. Proceedings of the National Academy of Sciences 108: 12048-12053.
22. Taylor A, et al. (2015) Mouse models of alphavirus-induced inflammatory disease. Journal of General Virology 96: 221–238.
23. Couderc T, et al. (2008) A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. Plos Pathogens 4: 1-12.
24. Ziegler SA, (2008) An animal model for studying the pathogenesis of Chikungunya Virus infection. Am. J. Trop. Med. Hyg 79(1): 133–139.
25. Morrison TE, et al. (2006) Characterization of Ross River Virus tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis. Journal of Virology 80: 737–749.

26. Ryman KD, et al. (2000) Alpha/Beta interferon protects adult mice from fatal Sindbis Virus infection and is an important determinant of cell and tissue tropism. Journal of Virology 74: 3366–3378.
27. Seay AR, et al. (1981) Experimental viralpolymyositis: age dependency and immune responses to Ross River virus infection in mice. Neurology 31:656–660.
28. Azevedo RSS, et al. (2009) Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. Emerging Infectious Diseases 15: 1830-1832.
29. Vieira CJ, et al. (2015) Detection of Mayaro Virus infections during a dengue outbreak in Mato Grosso, Brazil. Acta Tropica 147: 12-16.
30. Couderc T, et al. (2012) Chikungunya virus infection of corneal grafts. J. Infect. Dis 206:851–59.
31. Gardner J, et al (2015) Infectious Chikungunya Virus in the saliva of mice, monkeys and humans. Plos One 10 (10): 1-15.
32. Goupil BA, et al. (2016) Novel lesions of bones and joints associated with Chikungunya Virus infection in two mouse models of disease: New insights into disease pathogenesis. Plos One 11 (5): 1-21.
33. Jaffar-Bandjee MC, et al (2009) Chikungunya virus takes centre stage in virally induced arthritis: Possible cellular and molecular mechanisms to pathogenesis. Microbes Infect 11: 1206–1218.
34. Tappe D, et al. (2016) Sustained elevated cytokine levels during recovery phase of Mayaro Virus infection. Emerging Infectious Diseases 22: 750-752.
35. Ng LFP, (2017) Immunopathology of Chikungunya Virus infection: Lessons learned from patients and animal models. Annual Review of Virology 4: 5.1-5.15.
36. Gardner J, et al. (2010) Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. J. Virol. 84: 8021–8032.
37. Lidbury BA, et al. (2008) Macrophage-derived proinflammatory factors contribute to the development of arthritis and myositis after infection with an arthrogenic alphavirus. J. Infect. Dis. 197: 1585–1593.
38. Santiago FW, et al. (2015) Long-term arthralgia after Mayaro Virus infection correlates with sustained pro-inflammatory cytokine response. PLoS Neglected Tropical Diseases 9(10): 1–14.

39. Deng B, et al. (2012) Interleukin-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. J Immunol 189(7): 3669–3680.
40. Morisson TE, et al. (2011) A mouse model of Chikungunya Virus–induced musculoskeletal inflammatory disease: Evidence of Arthritis, Tenosynovitis, Myositis, and Persistence. The American Journal of Pathology 178(1):32-40.
41. Lidbury BA, et al. (2000) Macrophage-induced muscle pathology results in morbidity and mortality for Ross River virus–infected mice. The Journal of Infectious Diseases 181:27–34.
42. Rulli NE, et al. (2009) Amelioration of alphavirus-induced arthritis and myositis in a mouse model by treatment with bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic proteins. Arthritis & Rheumatism 60: 2513–2523.
43. Rulli NE, et al. (2011) Protection from arthritis and myositis in a mouse model of acute Chikungunya Virus disease by bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein-1 synthesis. The Journal of Infectious Diseases 204:1026-1030.
44. Teo TH, et al. (2013) A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya Virus infection in mice. the journal of immunology 190:259-269.
45. Hawman DW, et al. (2013) Chronic joint disease caused by persistent Chikungunya Virus infection is controlled by the adaptive immune response. Journal Virology 87(24):13878-88.
46. Wauquier N, et al. (2011) The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. The Journal of infectious Disease 204: 115-123.
47. Sango K, et al. (1966) Mice lacking both subunits of lysosomal β −hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. Nature Genetics 14: 348-352
48. Verri Jr WA, et al. (2004) Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ET_B receptors in a morphine-sensitive manner. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 310:710–717.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material e Métodos

1.Dissecação dos animais que sucumbiram à infecção

Após ser removido cada órgão e tecido foi colocado individualmente em microtubos de 1,5ml contendo 500 µl de TRIZOL (Tri-reagent Sigma), onde foram macerados. As amostras maceradas foram mantidas no – 70 até a extração do RNA. Os órgãos dos quatro animais foram identificados como amostras 1, 2, 3 e 4, de acordo com a ordem que eles morreram. Os órgãos e tecidos removidos dos quatro animais foram: fígado, baço, rim, coração, pulmão, intestino, articulação do joelho, músculo esquelético dos membros posteriores, medula espinhal, cérebro, olho e língua. Para o animal 1 não foi retirado o rim e para os animais 1 e 2 não foi retirado o cérebro.

2.Extração de RNA viral

As amostras foram centrifugadas a 12.000xg por 10 minutos a 4ºC para retirar os restos celulares. O sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo microtubo e depois se adicionou 200µl de clorofórmio e incubou por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo as amostras homogeneizadas manualmente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000Xg por 15 minutos a 4ºC. Após a centrifugação transferiu-se a fase aquosa para outro microtubo, adicionou-se 500µl de isopropanol e homogeneizou por inversão. Incubaram-se as amostra por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida elas foram centrifugadas a 12.000xg por 10 minutos a 4ºC. Descartou-se o sobrenadante e se adicionou 1mL de etanol 70%. As amostras foram levadas ao Vortex e deixadas por 12h a -70ºC. No dia seguinte as amostra foram levadas ao Vortex e centrifugadas a 7.500 G por 5 minutos a 4ºC, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi deixado secando na estufa a 37ºC. Em seguida suspendia o precipitado em 22µl de água ultrapura e incubava a 56ºC em banho-maria por 15 minutos. As amostras foram estocadas a -70ºC.

3. Confecção de cDNA

Primeiramente foi preparada uma mistura com 5µg de RNA, 1µL de primer randômico e 0,5µL de água. Em seguida essa mistura foi incubada a 65ºC por 10 minutos e depois no gelo por 2 minutos. Realizou-se uma centrifugação a 13000rpm por 1 minuto e adicionaram-se em ordem os seguintes reagentes: 2µL de tampão 10X (Promega), 2µL

de dNTPmix, 1µL da enzima Transcriptase Reversa (Promega) e água para completar para um volume final de 20 µL. Em seguida a mistura foi incubada a 25ºC por 10 minutos, 42ºC por 60 minutos e em seguida a reação foi parada a 70ºC por 10 minutos. O cDNA foi estocado a -20ºC.

4.Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Para determinação do RNA viral utilizou-se o protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores. Para detecção do vírus Mayaro foi utilizado os primers M2W e o cM3W. Para uma reação de 50µL foi adicionado 250 ng/µL de cDNA, 2,5µl de tampão 5X (Promega), 3µL de MgCl2 (25mM), 0,5µL de cada primer, 1µL de dNTP mix, 0,5µL de Taq Polimerase (Promega) e adicionou água para se obter um volume final de 50µL. A reação foi submetida ao seguinte programa: 30 ciclos de 94ºC por 1minuto, 53ºC por 1 minuto e 72ºC por 2 minutos com uma extensão final de 72ºC por 10 minutos.

5. Nested Polymerase Chain Reaction – Nested-PCR

Utilizou-se o protocolo descrito por Bronzoni e colaboradores. O DNA da primeira amplificação foi diluído de 1:50. As concentrações do MgCl2 e da Taq Polimerase utilizadas na reação foram de 2nM e 2,5 unidades, respectivamente. Foi utilizado os primers nMAY e o cM3W. Para cada reação adicionou-se 1µL do DNA diluído, 4µl de tampão 5X (Promega), 1,6µL de MgCl2 (25mM), 0,5µL de cada primer, 0,4µL de dNTP mix, 0,5µL de Taq Polimerase (Promega) e para alcançar o volume final de 20µL foi adicionado água. A reação foi submetida ao seguinte programa: 25 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 53ºC por 1 minuto e 72ºC por 2 minutos com uma extensão final de 72ºC por 10 minutos

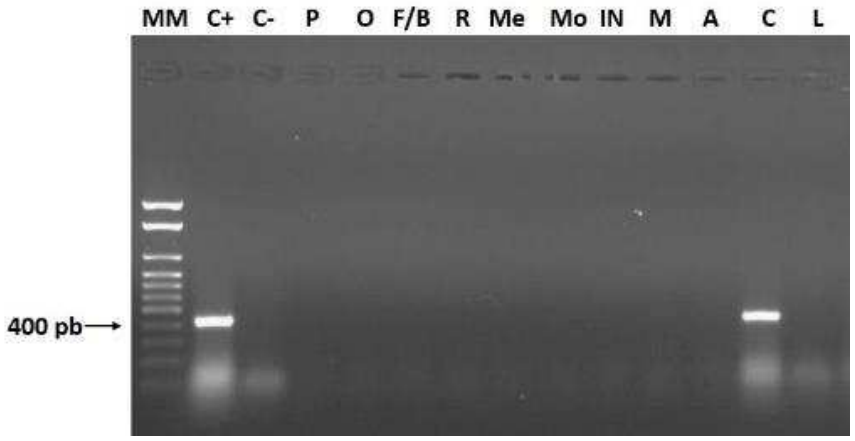


Figure 1. PCR de órgãos e tecidos do animal 1, que morreu com 6 dias pós-infecção. Identificação de uma banda de 434pb na amostra do coração. MM: marcador molecular (100pb); C+: controle positivo; C-: controle negativo; P: pulmão; Me: medula espinhal; F/B: fígado e baço; L: língua; A: articulação; M: músculo; Mo: medula óssea; C: coração; O: olho; IN: intestino; R: rim.

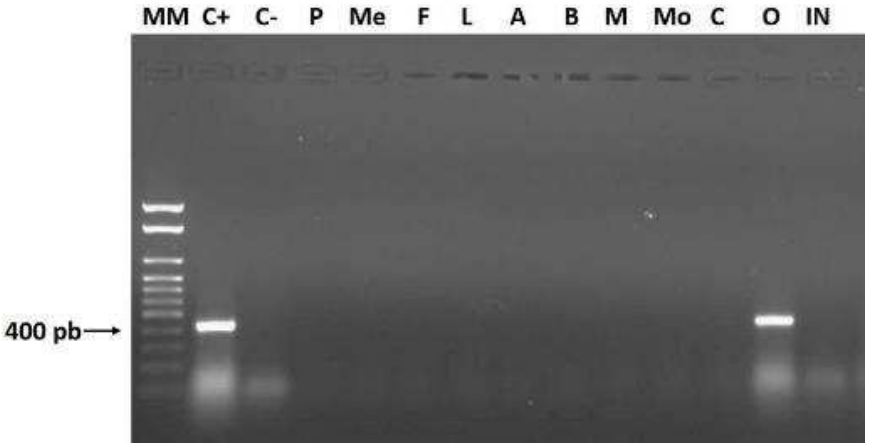


Figura 2. PCR de órgãos e tecidos do animal 2, que morreu com 10 dias pós-infecção. Identificação de uma banda de 434pb na amostra do coração. MM: marcador molecular (100pb); C+: controle positivo; C-: controle negativo; P: pulmão; Me: medula espinhal; F: fígado; L: língua; A: articulação; B: baço; M: músculo; Mo: medula óssea; C: coração; O: olho; IN: intestino

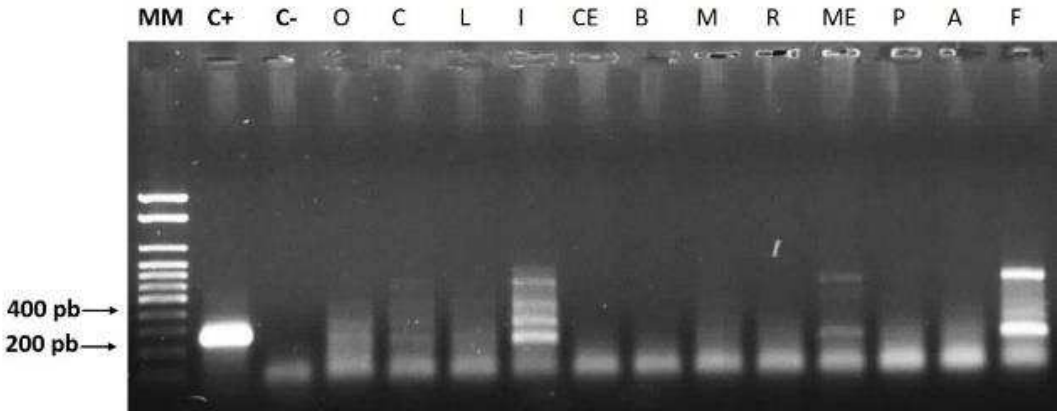


Figura 3. Nested-PCR de órgãos e tecidos do animal 3 que morreu com 13 dias pós-infecção. Identificação de uma banda de 270pb e 434pb nas amostras do intestino, fígado e medula espinhal. MM: marcador molecular (100pb); C+: controle positivo; C-: controle negativo; P: pulmão; Me: medula espinhal; F: fígado; B: baço; L: língua; A: articulação; M: músculo; C: coração; O: olho; I: intestino; CE: cérebro; R: rim

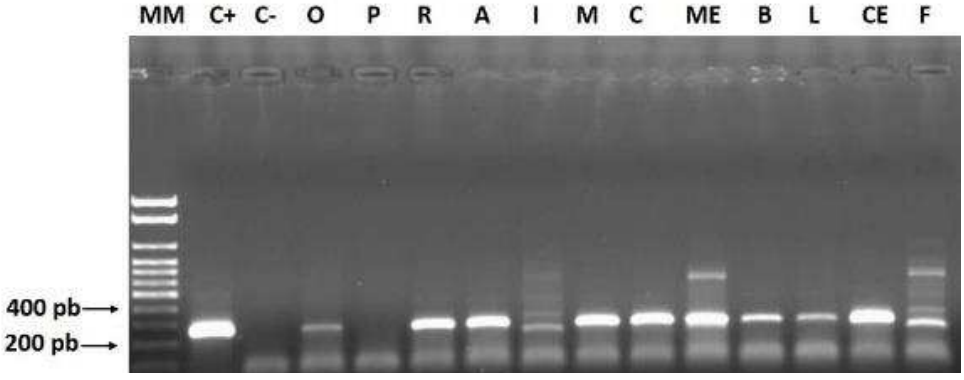


Figura 4. Nested PCR de órgãos e tecidos do animal 4, que morreu com 14 dias pós-infecção. Identificação de uma banda de 270pb nas amostras do olho, rim, articulação, intestino, músculo, coração, medula, baço, língua, cérebro e fígado. Identificação de banda de 433pb no intestino, medula e fígado. MM: marcador molecular (100pb); C+: controle positivo; C-: controle negativo; P: pulmão; Me: medula espinhal; F: fígado; B: baço; L: língua; A: articulação; M: músculo; C: coração; O: olho; I: intestino; CE: cérebro; R: rim