

Renan Júlio Mourão Ramos

Estabelecimento de Modelo de Cocultura para Avaliação do
Papel de Macrófagos no Dano Muscular Induzido por
Alfavirus Artritogênicos



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e Imunologia**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO RIO DE
JANEIRO
DEZEMBRO de 2024**

**Trabalho realizado no Departamento de
Virologia, do Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação
da Professora Iranaia Assunção Miranda e
co-orientação de Rômulo Leão da Silva Neris**

CIP - Catalogação na Publicação

M393e Mourão Ramos, Renan Julio
Estabelecimento de Modelo de Co-cultura para
Avaliação do Papel de Macrófagos no Dano Muscular
Induzido por Alfavirus Artritogênicos / Renan Julio
Mourão Ramos. -- Rio de Janeiro, 2024.
65 f.

Orientadora: Iranaiá Assunção Miranda.
Coorientador: Rômulo Leão da Silva Neris.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Alfavirus. 2. Macrófagos. 3. Musculo. 4.
Miosite. 5. Mialgia. I. Assunção Miranda, Iranaiá,
orient. II. Leão da Silva Neris, Rômulo, coorient.
III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): Renan Julio Mourão Ramos

DRE: 119050380

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Fabianno Ferreira Dutra (Presidente)
Prof. Sharton Vinicius Antunes Coelho
Prof. Luiza Mendonça Higa
Prof. Alessandra D'almeida Filardy (Suplente)

**Título da Monografia: "Estabelecimento de Modelo de Co-cultura para Avaliação do Papel
de Macrófagos no Dano Muscular Induzido por Alfavirus
Artrítogênicos"**

Local: IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 05 de janeiro de 2024 às 10:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 8,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 05 de Janeiro de 2024.

NOTA:

8,0

Banca Examinadora:

Fabianno Ferreira Dutra

Prof. Fabianno Ferreira Dutra (Presidente)

8,0

Sharton Vinicius Antunes Coelho

Prof. Sharton Vinicius Antunes Coelho

8,0

Luiza Mendonça Higa

Prof. Luiza Mendonça Higa

Prof. Alessandra D'almeida Filardy (Suplente)

Renan Julio M. Ramos

Renan Julio Mourão Ramos

Aluno(a):

Orientador(a)

(e coorientador):

Iranaiá Assunção Miranda e Rômulo Leão da Silva Neris

Prof. Iranaiá Assunção Miranda e Rômulo Leão da Silva Neris

Coordenadora de

TCC:

Prof. Marinella Silva Laport

gov.br

Documento assinado digitalmente

MARINELLA SILVA LAPORT

Data: 05/01/2024 17:39:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico esse trabalho à minha avó
Adair da Conceição Martins (in memoriam),
que me resgatou e mudou minha vida.
Não sei o que seria de mim sem a senhora,
mas sei que só sou quem eu sou hoje porque olhou por mim
e acredito que ainda olha.

Agradecimentos

A minha mãe e minha irmã, pelo amor incondicional. Vocês são tudo para mim.

A meus amigos da turma de Microbiologia e Imunologia 2019.1: Athirson, Isabela, Matheus, Pedro, Vinicius, Stefanie, Raul, Eduardo e Ralice. Eu não teria sobrevivido à graduação sem vocês.

Às minhas melhores amigas Sarah e Ellen. Obrigado por serem minha rede de apoio.

Aos meus companheiros de laboratório: Camila, Carol, Daniel, Iris, Leo, Liana, Luiza, Mary Jane, Nathalia e Rômulo. Obrigado de coração por todo o apoio e todos os momentos bons. Fico muito feliz de fazer parte dessa equipe que é praticamente uma família.

À minha orientadora Professora Irania Assunção Miranda, toda a minha gratidão e admiração. Obrigado por acreditar em mim.

Obrigado Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela oportunidade de ingresso.

Obrigado Instituto de Microbiologia Paulo de Goes, por todo o auxílio técnico durante o curso.

Agradeço a todos os professores que me ensinaram ao longo da vida e me ajudaram a trilhar meus caminhos.

Obrigado a CNPQ e PIBIC por terem financiado essa pesquisa.

RESUMO

RENAN JULIO MOURÃO RAMOS

ESTABELECIMENTO DE MODELO DE COCULTURA PARA AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MACRÓFAGOS NO DANO MUSCULAR INDUZIDO POR ALFAVIRUS ARTRITOGÊNICOS

Orientador: Iranaia Assunção Miranda

Co Orientador: Rômulo Leão da Silva Neris

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O Chikungunya (CHIKV) e Mayaro (MAYV) são arbovírus da família *Togaviridae* e gênero *Alfavírus*, responsáveis por uma doença febril aguda associada a um quadro de artralgia e mialgia debilitantes e de longa duração. Estudos realizados em pacientes e em modelos experimentais de camundongos infectados pelo MAYV e CHIKV indicam que os sintomas de mialgia na fase aguda estão relacionados a replicação eficiente no músculo esquelético, intensa destruição de fibras musculares, associado a um infiltrado inflamatório formado principalmente de macrófagos, e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Apesar disso, o papel da interação macrófagos-células musculares infectadas na progressão da lesão tecidual e cronificação dos sintomas ainda não são bem compreendidos. O objetivo deste trabalho foi estabelecer um modelo de cocultura de células musculares esqueléticas e macrófagos primários de camundongos para investigar o impacto direto do infiltrado de macrófagos na progressão da infecção do músculo esquelético por MAYV e CHIKV. Para isso, macrófagos de camundongos selvagem da linhagem SV129 foram obtidos através do lavado peritoneal ou isolados da medula óssea do fêmur e da tíbia. Em seguida, nós caracterizamos os macrófagos isolados com relação a permissividade a infecção do MAYV e CHIKV. As células aderentes do lavado foram infectadas, mas não observamos aumento do número de partículas infecciosas no meio de cultura, indicando que as células do lavado não eram permissivas. Para o estabelecimento do modelo de cocultura, utilizamos fibras

musculares diferenciadas a partir de mioblastos murinos de linhagem C2C12 as quais além de apresentarem uma infecção produtiva, sofreram alterações da estrutura das fibras 30 h após infecção. Na cocultura direta, infectamos as fibras musculares e em seguida adicionamos as células isoladas do lavado peritoneal não infectado na proporção 1:5. Nós observamos uma proteção da estrutura das fibras, juntamente com a redução na carga viral. A redução na carga viral foi dependente do contato direto dos macrófagos com as fibras infectadas. Nossos dados preliminares indicam que também há proteção das fibras quando na presença dos macrófagos de medula. Nossos achados indicam que o contato direto dos macrófagos com células musculares infectadas restringe a replicação viral e protege a destruição da fibra muscular, corroborando com um possível papel protetor dos macrófagos no curso da infecção por *Alfavírus* artritogênicos.

Palavras-chave: *Alfavírus* artritogênico, fibras musculares, macrófagos e miosite

ABSTRACT**RENAN JULIO MOURÃO RAMOS****ESTABLISHMENT OF A CO-CULTURE CELL MODEL TO EVALUATE THE
ROLE OF THE MACROPHAGES ON *ALPHAVIRUS* ARTHRITOGENIC INDUCED
MUSCLE INJURY****Orientador: Iranaia Assunção Miranda****Co Orientador: Rômulo Leão da Silva Neris**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Chikungunya (CHIKV) and Mayaro (MAYV) are arboviruses of the *Togaviridae* family and the *Alphavirus* genus, responsible for an acute febrile illness associated with debilitating, long-term arthralgia and myalgia. Studies carried out on patients and experimental mouse models infected with MAYV and CHIKV indicate that the symptoms of myalgia in the acute phase are related to efficient replication in skeletal muscle, intense destruction of muscle fibers, associated with an inflammatory infiltrate formed mainly by macrophages, and the secretion of pro-inflammatory cytokines. Despite this, the role of the macrophage-infected muscle cell interaction in the progression of tissue damage and the chronification of symptoms is still not well understood. The aim of this study was to establish a co-culture model of skeletal muscle cells and primary mouse macrophages to investigate the direct impact of macrophage infiltration on the progression of skeletal muscle infection by MAYV and CHIKV. For this purpose, macrophages from wild-type SV129 mice were obtained through peritoneal lavage or isolated from the bone marrow of the femur and tibia. Next, we characterized the isolated macrophages in terms of their permissiveness to MAYV and CHIKV infection. For this, adherent cells from the lavage were infected with a MOI of 1 and the temporal release of infectious particles was quantified by lysis plate assay. We did not observe an increase in the number of particles in the culture medium, indicating that the

lavage cells were not permissive. To establish the co-culture model, we used muscle fibers differentiated from murine myoblasts of the C2C12 lineage, which proved to be permissive to infection. The myofibers infected with a MOI of 1 not only showed a productive infection, but also morphological changes and destruction of the fiber structure 30 hours after infection. We were therefore able to move on to establishing the co-culture model. In the direct co-culture, we infected the muscle fibers and then added the cells isolated from the uninfected peritoneal lavage in a 1:5 ratio. We observed a protection of the fiber structure, along with a reduction in viral load. The reduction in viral load was dependent on the direct contact of macrophages with the infected fibers. We also co-cultured the fibers with uninfected bone marrow macrophages. Our preliminary data indicate that the fibers are also protected in the presence of bone marrow macrophages. Our findings indicate that direct contact of macrophages with infected muscle cells restricts viral replication and protects muscle fiber destruction, corroborating a possible protective role of macrophages in the course of arthritogenic *alphavirus* infection.

Key words: arthritogenic *Alphavirus*, muscle fiber, myosite, macrophage

RESUMO PARA LEIGOS

RENAN JULIO MOURÃO RAMOS

ESTABELECIMENTO DE UM MODELO DE CULTURA CELULAR COMBINADA PARA AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MACRÓFAGOS NO DANO MUSCULAR INDUZIDO POR *ALFAVIRUS* CAUSADORES DE DOENÇAS QUE AFETAM O MÚSCULO E AS ARTICULAÇÕES

Orientador: Iranaia Assunção Miranda

Co Orientador: Rômulo Leão da Silva Neris

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus Chikungunya e o vírus Mayaro são vírus conhecidos por induzir fortes dores no músculo e nas articulações que podem persistir por meses, até mesmo anos. Outros estudos anteriores buscaram entender o que acontece nesses locais que leva ao surgimento e a cronificação dos sintomas de dores, utilizando modelos animais, biópsias de pacientes acometidos ou experimentos *in vitro* com células isoladas. O que ficou de comum entendimento entre eles foi que a infecção por CHIKV e MAYV leva à morte das células musculares e inflamação. Os macrófagos são as células do nosso sistema imunológico mais abundante no tecido infectado, entretanto não se sabe com clareza como essas células contribuem para a destruição do músculo e menos ainda para a persistência da dor. Visando isso, esse trabalho teve como objetivo estabelecer um modelo de cocultura celular onde células musculares infectadas seriam cultivadas junto com macrófagos para simular o ambiente inflamatório dotado do infiltrado celular e para que fosse possível observar a participação dessas células imunológicas no curso da infecção por MAYV e o CHIKV. Em nosso modelo de cocultura, o contato direto com os macrófagos preservou a estrutura das fibras musculares infectadas e

diminuiu a replicação viral, indicando um papel protetor. Porém, ainda existem outros pontos que podem ser explorados nesse modelo, como os produtos liberados por ambas as células na cocultura e a localização das partículas virais presentes, deixando uma gama de possibilidades para estudos posteriores.

Sumário

1- Introdução	1
1.1- Os <i>Alfavírus</i>	1
1.2- Ciclo de Replicação dos <i>Alfavírus</i>	3
1.3- O vírus Chikungunya (CHIKV)	6
1.4- O Vírus Mayaro (MAYV)	7
1.5- Manifestações Clínicas da Infecção por MAYV e CHIKV	8
1.6- Patogênese do CHIKV e MAYV	9
1.7- Papel dos macrófagos no processo de lesão e reparo tecidual	13
2- Justificativa	17
3- Objetivo	18
3.1- Objetivo geral	18
3.2- Objetivos específicos	19
4- Metodologia	19
4.1- Isolamento de macrófagos peritoneais	19
4.2- Diferenciação de macrófagos de medula óssea	19
4.3- Linhagem celulares	20
4.4- Infecção dos macrófagos	21
4.5- Modelo de cocultura fibras musculares e macrófagos	21
4.6- Ensaio de formação de placas de lise	22
4.7- Análise da estrutura das fibras	23
4.8- Análise estatística	23
5- Resultados	23
5.1- O MAYV e CHIKV não são capazes de replicar em macrófagos de peritônio	23
5.2- Macrófagos expostos ao MAYV e CHIKV sofrem alterações morfológicas e aumento da expressão de marcadores de ativação	25

5.3- O MAYV e CHIKV infectam e replicam em miofibras de camundongos da linhagem C2C12	28
5.4- O cocultivo com as células isoladas do peritônio protege as fibras musculares infectadas pelo MAYV e CHIKV	29
5.5- Os macrófagos de medula também conferem proteção às fibras musculares infectadas pelo MAYV e CHIKV	31
6- Discussão	35
7- Conclusões	37
8- Referências	38

1 Introdução

1.1 Os *Alfavírus*

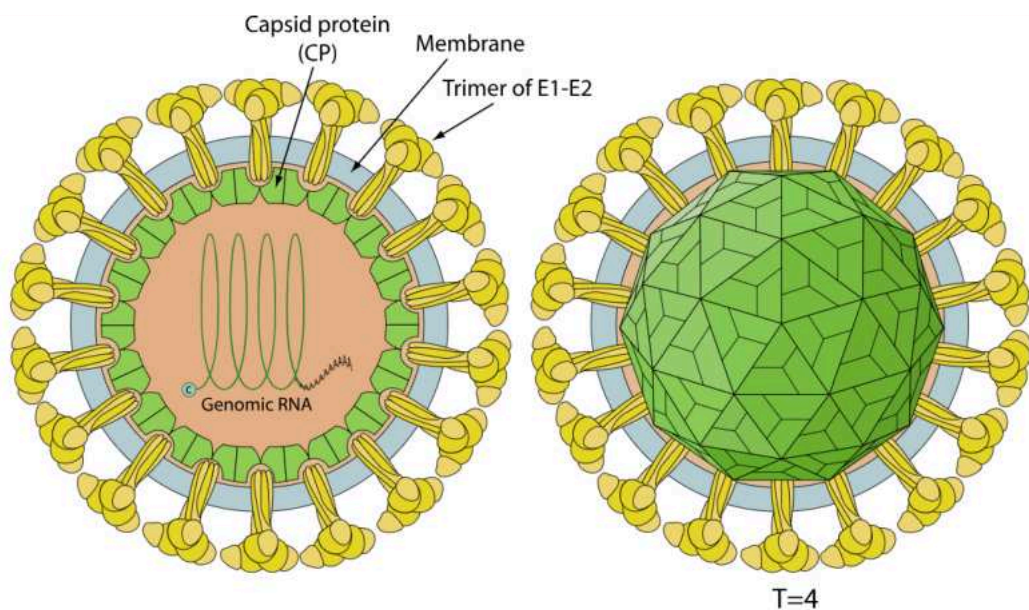
Alfavírus é um gênero que engloba uma variedade de espécies de vírus e se encontra dentro da família *Togaviridae* (Chen et al, 2018). Muitos dos vírus pertencentes ao gênero *Alfavírus* são arbovírus e sua transmissão alterna entre os vetores e os hospedeiros vertebrados que podem ser primatas não humanos, humanos e roedores (Chen et al, 2018; Gould et al, 2009). A palavra "arbovírus" vem da abreviação da frase em inglês "Arthropode-borne virus" que significa "vírus transmitido por artrópode" e é usada para agrupar uma gama de viroses. Dentro deste grupo estão os principais causadores de doenças infecciosas ao redor do mundo, sendo um considerável problema à saúde pública e à economia (Gubler et al., 2001; Lwande et al., 2015).

De acordo com o Comitê Internacional para Taxonomia das Viruses (ICTV) existem mais de 30 espécies pertencentes ao gênero *Alfavírus* (Chen., 2018). Os *Alfavírus* podem ser classificados de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos infectados, sendo divididos em dois grandes grupos: Os *Alfavírus* encefalíticos e os *Alfavírus* artritogênicos (Gould et al, 2009). Os *Alfavírus* encefalíticos estão associados a quadros neurológicos com sintomas como encefalite, mielite e meningite (Zacks e Paessler, 2010). Já os *Alfavírus* artritogênicos estão associados a quadros de poliartralgia e mialgia intensa de longa duração e dentre os mais relevantes, do ponto de vista do cenário mundial, podemos destacar o vírus Chikungunya (CHIKV) (Chen et al, 2018). Porém outros membros estão associados a surtos esporádicos restritos em regiões da Oceania como Ross River (RRV), ou Américas como o vírus Mayaro (MAYV) (Yu et al., 2014; Baxter e Heise, 2020).

Estruturalmente, os vírus do gênero *Alfavírus* apresentam uma partícula envelopada, com aproximadamente 70 nanômetros de diâmetro e genoma de RNA fita simples polaridade positiva de aproximadamente 12kb. O RNA genômico apresenta uma janela de leitura (ORFs, do inglês "Open Reading Frames") na porção N-terminal e outra na porção C-terminal (Wang M et al., 2022; Yang et al, 2020) (**Figura 1 a**). Cada ORFs codifica para uma poliproteína distinta que, durante etapas diferentes do ciclo de replicação, é clivada e modificada em proteínas funcionais (Kendall et al., 2019). A primeira poliproteína a ser traduzida pode ser dividida em quatro proteínas não estruturais (NsP, do inglês "Non-structural protein"): NsP1,

NsP2, NsP3 e NsP4, as quais estão relacionadas à replicação viral e ao escape do sistema imunológico (Kendall *et al.*, 2019; Wang M *et al.*, 2022) (**Figura 1 b**). Após a tradução, essas NsPs formam um complexo de replicação, onde ocorre a síntese da fita complementar do RNA genômico. A fita de RNA polaridade negativa é chamada de intermediário de replicação e, por sua vez, servirá como molde para a síntese de novos RNA genômicos. Na porção anterior da região C-terminal do intermediário de replicação há uma região promotora. O reconhecimento desse promotor possibilita a transcrição da segunda ORF presente no genoma viral, chamado RNA subgenômico, que codifica para uma poliproteína que dará origem a quatro proteínas estruturais: a proteína do capsídeo e três proteínas de envelope (proteína E1, proteína E2 e proteína E3) (Kendall *et al.*, 2019; Wang M *et al.*, 2022) (**Figura 1 b**).

(a)



b)

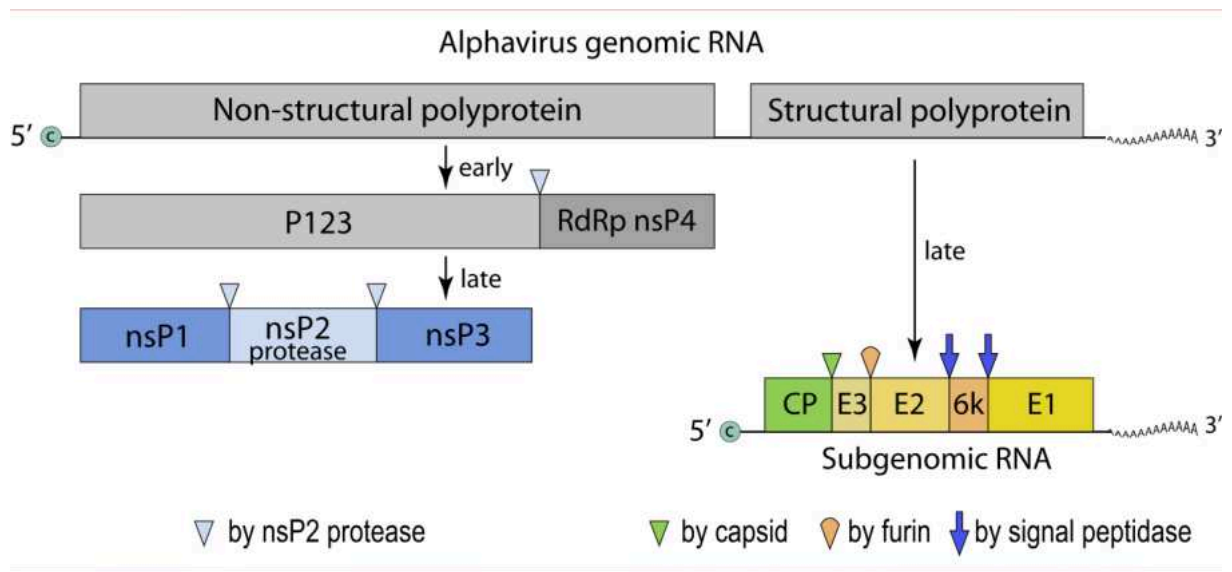


Figura 1: Estrutura da partícula e organização genômica dos *Alfavírus*. (a) A partícula viral de aproximadamente 70nm de diâmetro, esférica, envelopada, com capsídeo icosaédrico. O envelope contém 80 trímeros de espículas, cada espícula contém 3x heterodímeros de E1/E2. (b) O genoma de RNA fita simples polaridade positiva com aproximadamente 12kb de comprimento apresentando 2 ORFs. A primeira ORF codifica para uma poliproteína que será clivada para formar as proteínas não estruturais, a segunda ORF codifica para o RNA subgenômico que dará origem às proteínas estruturais. Fonte: <https://viralzone.expasy.org/togaviridae>

1.2 Ciclo de replicação dos *Alfavírus*

O ciclo de replicação dos *Alfavírus* começa a ligação do vírus à célula hospedeira (Mendonça *et al.*, 2023). Essa ligação pode ser iniciada por fatores de ligação presentes na superfície da célula hospedeira, que propiciam a interação inicial do vírus com a célula e facilitam o encontro entre a glicoproteína E2 da espícula do vírus e o receptor celular capaz de se ligar à E2 (Feng *et al.*, 2023). Quando E2 se liga ao receptor celular, começa o processo de internalização do vírus que ocorre através de endocitose mediada por clatrina (Varghese *et al.*, 2022). Uma vez dentro do endossomo celular, o baixo pH endossomal leva à desassociação das proteínas E1 e E2 da espícula viral que permite que a proteína de fusão E1 realize a fusão do envelope viral à membrana do endossoma, culminando na liberação do genoma viral no

citósol celular (Holmes *et al.*, 2020) (Figura 2).

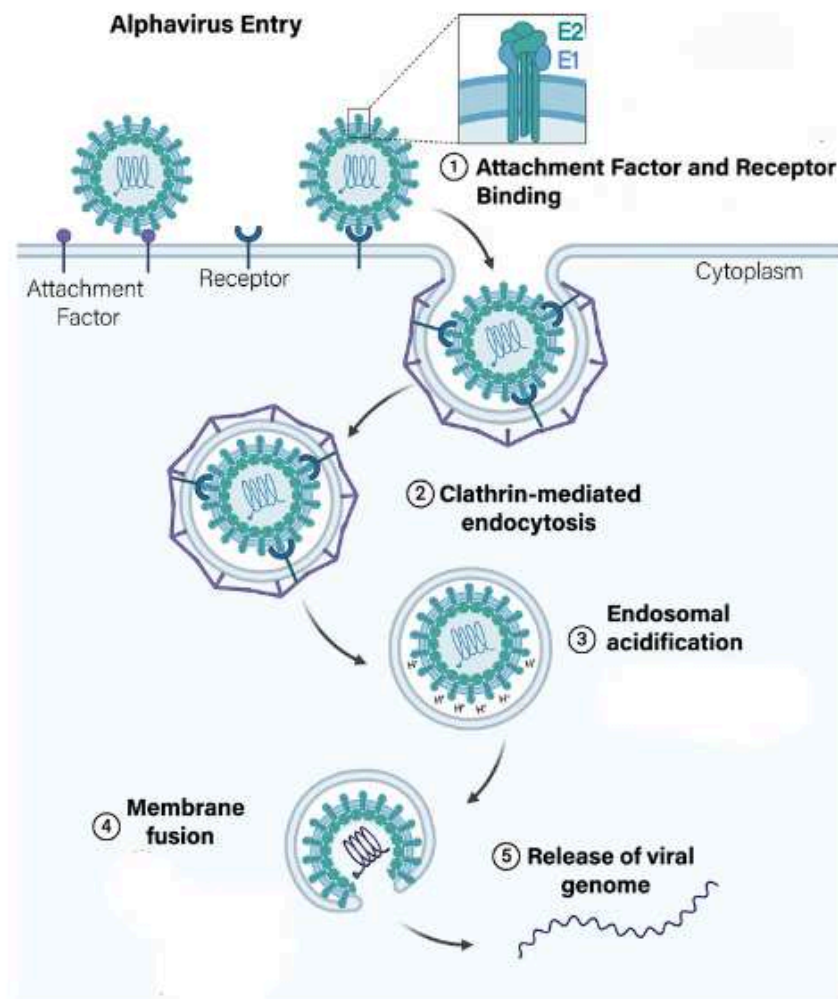


Figura 2: Início do ciclo de replicação dos *Alfavírus*. O reconhecimento da célula hospedeira pelos *Alfavírus* é mediado pela ligação da espícula viral ao receptor celular. Fatores de ligação presentes na superfície da célula hospedeira podem facilitar essa interação. O reconhecimento do receptor celular propicia uma ligação forte e inicia a internalização viral que ocorre através de endocitose mediada por clatrina. Dentro do endossoma celular, as alterações do pH endossomal acionam os mecanismos virais responsáveis pela fusão das membranas, liberando o genoma viral no citósol celular. Fonte: Holmes *et al.*, 2020 doi: 10.1371/journal.ppat.1008876.

No citósol da célula hospedeira, o genoma viral é traduzido pelos polirribossomos livres, gerando uma poliproteína que é composta pelas 4 NsPs do vírus, cujo a NsP2 possui capacidade proteolítica e é responsável pela autoclivagem da poliproteína, liberando as NsPs (Spuul *et al.*, 2010). As NsPs formam o complexo de replicação viral e promovem envaginações em membranas plasmáticas de estruturas celulares como o lisossomos, vacúolos citoplasmáticos ou vesículas formando uma estrutura chamada de esférulas que é o sítio onde

serão sintetizadas as fitas complementares de RNA polaridade negativa chamadas de intermediário de replicação (**Figura 3**) (Varghese *et al.*, 2022). Através da leitura do intermediário de replicação é possível realizar a síntese de novos RNAs genômicos e do RNA subgenômico do vírus (Kendall *et al.*, 2019). O RNA subgenômico é traduzido na poliproteína que, ao ser clivada, dará origem às proteínas do capsídeo viral e às glicoproteínas do envelope (Varghese *et al.*, 2022). Uma vez sintetizadas quantidades suficientes do genoma viral, este é encapsidado e transportado para a membrana plasmática, onde o nucleocapsídeo interage com as glicoproteínas do envelope e se inicia o processo de brotamento, onde a partícula viral montada recebe seu envelope oriundo da membrana da célula hospedeira (Spuul *et al.*, 2010)

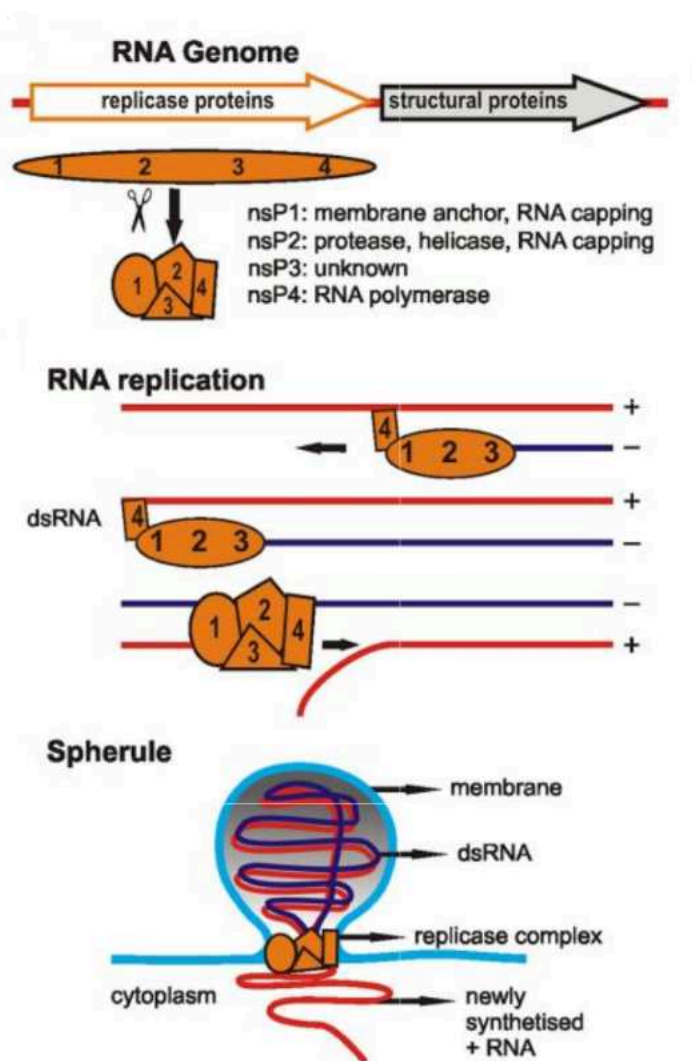


Figura 3: Tradução e replicação do genoma dos *Alfvirus* na célula hospedeira. Após a liberação do genoma viral no citosol da célula hospedeira, ocorre a tradução da poliproteína que é precursora das NsPs. As NsPs

formam o complexo de replicação e sintetizam o intermediário de replicação dentro de esférulas. Através do intermediário de replicação é possível sintetizar novas cópias do genoma viral além do RNA subgenômico. Fonte: Spuul *et al.*, 2010 doi: 10.1128/JVI.00477-10.

1.3 O vírus Chikungunya (CHIKV)

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi isolado pela primeira vez durante um surto de doença febril na Tanzânia em 1953 e, a partir disso, associado a doenças na África e Ásia por muitos anos (Azevedo *et al.*, 2015). Até o ano de 2004, reconstruções filogenéticas da evolução do vírus levaram a identificação de três genótipos existentes, que foram nomeadas de acordo com a região de ocorrência de seus respectivos surtos (Asian; ECSA - East/Central/South Africa -; West Africa) (Tanabe *et al.*, 2018). Entretanto, com surtos emergentes no ano de 2005 em La Reunion, o vírus se espalhou rapidamente nas ilhas do sudoeste do oceano Índico (Azevedo *et al.*, 2015). A ocorrência desses surtos foi associada a uma adaptação ao vetor *Aedes albopictus*, uma espécie de mosquito endêmico da região (Pialoux *et al.*, 2007). Em 2006 os surtos em curso alcançaram a Índia onde houveram 1.400.000 casos de Chikungunya reportados (Azevedo *et al.*, 2015). Desde então, muitos casos importados foram observados em países não ocidentais e foram associados à adaptação ao vetor *Aedes aegypti*, comum na Índia e na Europa (Pialoux *et al.*, 2007). Em 2013, o CHIKV foi introduzido nas Américas através da região do Caribe, se expandindo rapidamente no continente e tornando-se endêmico nesta região. (Azevedo *et al.*, 2015). Em julho de 2014, o primeiro caso autóctone de febre Chikungunya foi reportado no Brasil (Lima *et al.*, 2021). Curiosamente, análises genéticas mostraram uma circulação simultânea de dois genótipos distintos no território (Lima *et al.*, 2021). O genótipo Asiático foi detectado na região norte (Amapá) e o genótipo ECSA na região nordeste (Bahia) (Lima *et al.*, 2021). Atualmente, o CHIKV já foi notificado em todas as regiões do país (Lima *et al.*, 2021). Importante relatar que apesar da introdução muito próxima e cocirculação, atualmente o CHIKV que circula e é responsável pelos casos no Brasil são do genótipo ECSA (Oliveira *et al.*, 2021). Porém, novos casos de CHIKV são reportados mundialmente, sendo a faixa central dos trópicos mais afetada devido a abundância do vetor (**Figura 4**).

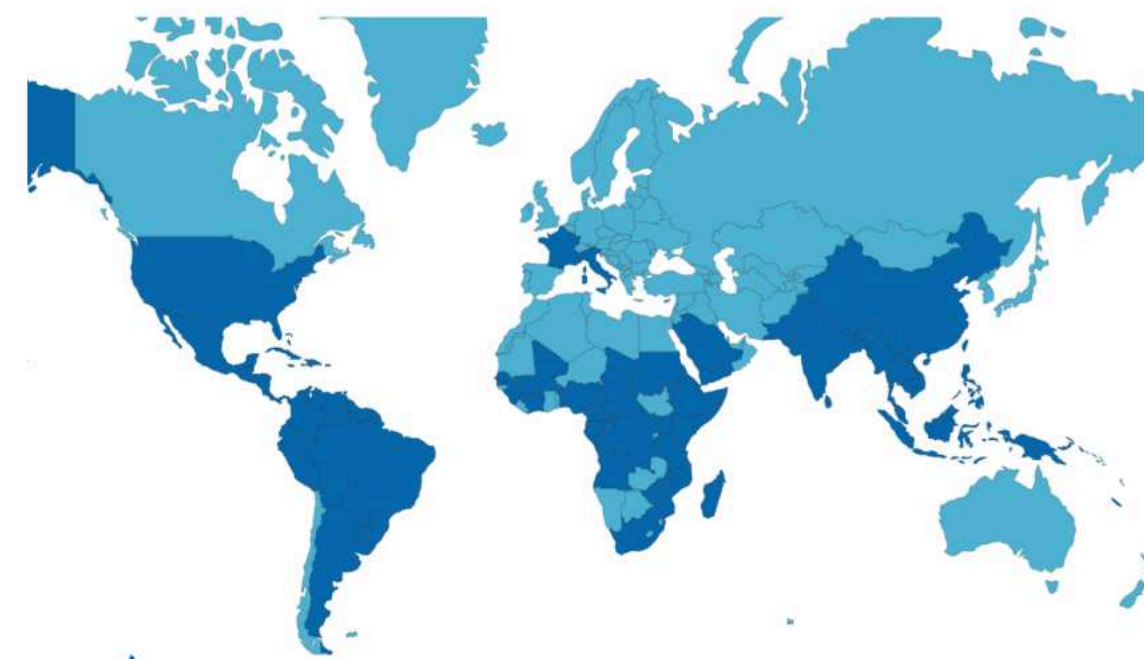


Figura 4: Mapa mundial de casos reportados de CHIKV. Não foram incluídos os países onde foram registrados somente casos importados. Levantamento feito em outubro de 2023. Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html> - acessado em 10 de janeiro de 2024

1.4 O vírus Mayaro (MAYV)

O MAYV é transmitido principalmente pelos mosquitos da espécie *Haemagogus janthinomys*, encontrados estritamente em regiões de floresta (Ganjian e Riviere; 2020). As fêmeas desses mosquitos apresentam hábitos primatófilicos, resultando na manutenção de primatas não humanos como reservatórios do MAYV (Abreu *et al.*, 2019). O vírus foi isolado pela primeira vez em trabalhadores rurais da região de Mayaro, na ilha de Trinidad, no ano de 1954 e, de fato, sua circulação se manteve restrita a zonas silvestres e rurais das Américas (Pereira *et al.*, 2020). Por isso, durante muito tempo a infecção pelo MAYV em humanos foi considerada acidental e associada a atividades próximas a áreas silvestres (Pereira *et al.*, 2020). Entretanto, nos últimos anos a ocorrência de casos de infecção pelo vírus Mayaro em áreas urbanas vem sendo frequentemente reportada (Gonzalez *et al.*, 2021). Estudos recentes mostraram que mosquitos adaptados ao ambiente urbano, como os do gênero *Aedes* e *Culex*, são vetores competentes do vírus Mayaro, o que explicaria a circulação do vírus nesse ambiente (Pereira *et al.*, 2020). Além disso, análises moleculares da circulação do vírus Mayaro no Brasil evidenciaram surtos do vírus em regiões urbanas dos estados de Goiás (GO), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP) (Paula *et al.*, 2021). Atualmente, mais de 900

casos de febre Mayaro foram reportados por toda a América Latina e Caribe, sendo o Brasil o país com o maior número de casos (**Figura 5**) (Ganjian e Riviere, 2020).

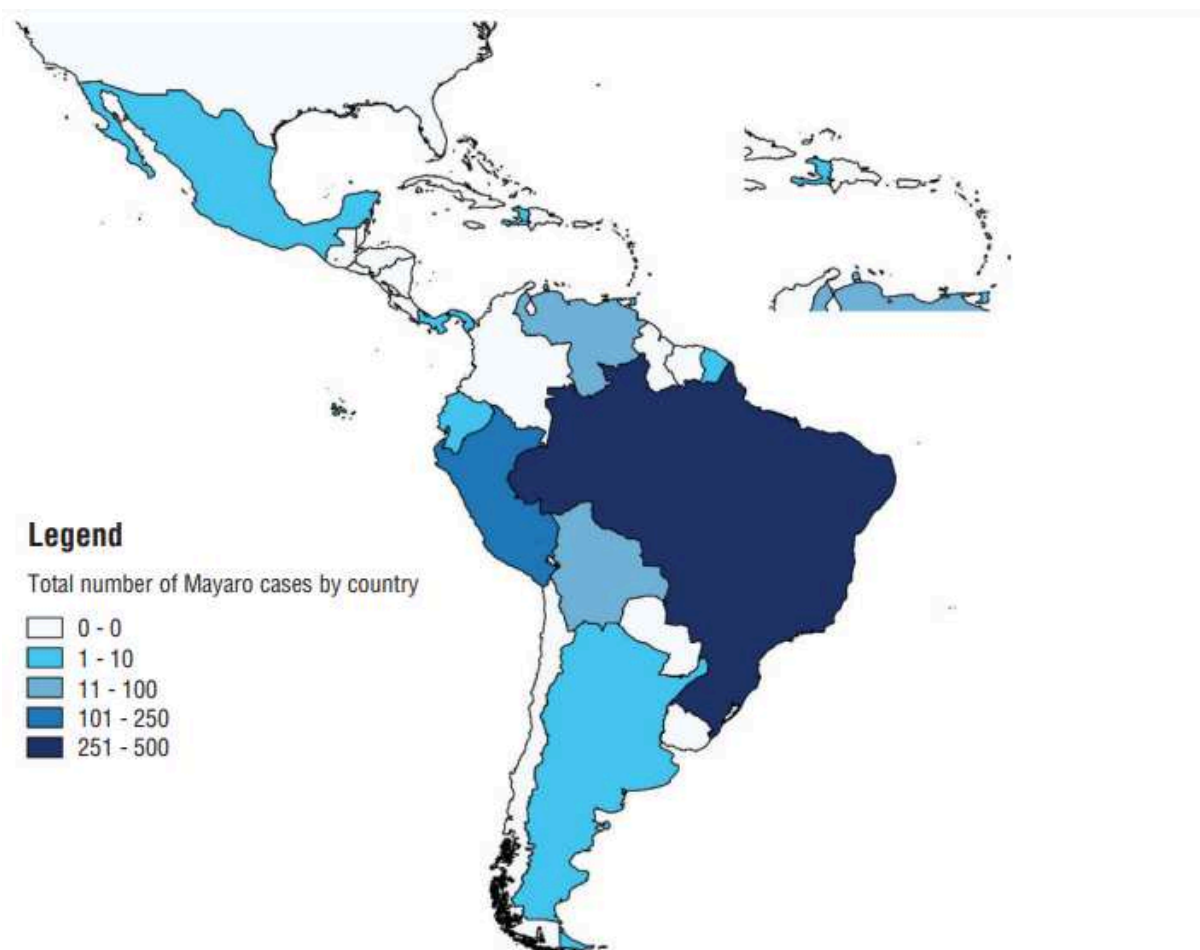


Figura 5: Mapa continental de casos reportados de MAYV. A densidade de casos está representada pela intensidade da cor azul. A legenda ao lado relaciona a intensidade da cor ao número de casos. Torna-se fácil a identificação do Brasil como preponderante nos casos confirmados de infecção por MAYV. Foram considerados os casos confirmados e prováveis. Não foram incluídos países onde foram registrados somente casos importados. A Região do Caribe é ampliada para facilitar a visualização. Fonte: Ganjian e Riviere, 2020 doi: 10.26633/RPSP.2020.14.

1.5 Manifestações Clínicas da Infecção por MAYV e CHIKV

O MAYV e CHIKV são causadores de doenças marcadas por uma febre aguda súbita seguida de intensas dores nos músculos e articulações que se iniciam após um período de incubação de aproximadamente 7 dias (Gonzalez *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Além disso, outros sintomas como dores de cabeça, dor retro-orbital, irritações na pele também comuns, sendo o desenvolvimento assintomático muito raro de ocorrer (Ganesan *et al.*, 2017). Destacam-se os sintomas de mialgia e poliartralgia, pois estão presentes em 97% dos

infectados, sendo a característica marcante dessas doenças e o que classifica essas duas espécies de *Alfavírus* como *Alfavírus* artritogênicos (Ganesan *et al.*, 2017). O nome “chikungunya”, por exemplo, é um termo em Makonde que significa “os que ficaram contorcidos” usado pelos povos da Tanzânia para se referir aos acometidos pela febre (Ganesan *et al.*, 2017). Os sintomas costumam durar em média duas semanas, terminando com a resolução da viremia, o que define a febre Chikungunya e a febre do Mayaro como doenças infecciosas autolimitantes (Gonzalez *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Entretanto, a maioria dos indivíduos acometidos não evoluem para uma cura de fato após a resolução dos sintomas agudos. Cerca de 80% dos casos de infecção por MAYV e CHIKV desenvolvem dores e inflamações persistentes nos músculos e articulações, levando a um quadro crônico de poliartralgia e reumatismo que pode perdurar por meses e até anos (Sathya *et al.*, 2010). Por isso, as doenças causadas pelo MAYV e pelo CHIKV podem ser divididas cronologicamente em: fase aguda, definida a partir do surgimento dos primeiros sintomas onde a maioria dos acometidos apresenta febre, além de dores e inflamações nos músculos e articulações; fase pré-crônica, no caso dos sintomas de dores debilitantes persistirem por meses; fase crônica, onde os sintomas de dores debilitantes persistem de meses a anos (Hoarau *et al.*, 2010).

1.6 Patogênese do CHIKV e MAYV

Como são arbovírus, a transmissão do CHIKV e do MAYV ocorre através da inoculação pelo aparelho bucal do mosquito vetor (Kafai *et al.*, 2022). A inoculação é subcutânea e é sucedida pela infecção e replicação viral em células da derme, como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e células epiteliais (Kafai *et al.*, 2022). Na derme também há células suscetíveis como os macrófagos residentes (Kafai *et al.*, 2022) (**Figura 6**). A capacidade de infectar diferentes tipos celulares se deve a abundância de moléculas que servem como receptores ou fatores de ligação para esses vírus (Holmes *et al.*, 2020). Recentemente, vários estudos têm apontado a proteína associada a remodelamento de matriz 8 (MXRA8) como possível receptor para *Alfavírus* (Hao *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2019). Além disso, diferentes *Alfavírus* seriam capazes de se ligar a diferentes ortólogos de MXRA8 presentes em células de seus respectivos hospedeiros vertebrados (Zimmerman *et al.*, 2023; Kim *et al.*, 2023). Todavia, o reconhecimento e a ligação dos *Alfavírus* na célula hospedeira não são mediados somente por receptores (Holmes *et al.*, 2020). Existem também moléculas expressas na superfície celular que permitem um contato

inicial do vírus com a célula, além de facilitarem o contato com o receptor de entrada (Holmes *et al.*, 2020). Estudos mostraram que a glicosaminoglicana Heparina, uma molécula sulfatada e negativamente carregada presente na superfície de diferentes células, seria utilizada como fator de ligação pelos *Alfavírus* (Li e Kusche, 2016; Holmes *et al.*, 2020). Já foi observado que a expressão dessa molécula aumenta a infecciosidade de alguns *Alfavírus* (Klimstra *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 2020). Além disso, estudos utilizando um pseudovírus de estomatite vesicular (VSV) contendo as E1 e E2 de um isolado clínico de CHIKV em seu envelope ilustraram a importância da heparina como facilitador da infecção do CHIKV (Tanaka *et al.*, 2017). Entretanto, as vias de entrada utilizadas pelos *Alfavírus* através da interação com as moléculas de superfície celular citadas ainda não são bem elucidadas. Além de diversas outras moléculas serem apontadas como possíveis receptores, receptores alternativos e fatores de ligação para *Alfavírus* (Feng *et al.*, 2023; Holmes *et al.*, 2020).

Após a fase de replicação inicial no local da picada ocorre a disseminação para outros tecidos, através de células infectadas ou partículas virais livres que caem na circulação linfática e microvasculatura (Miranda *et al.*, 2013) e é seguida da produção massiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que alcançam a circulação do hospedeiro, como IFN- α , IL-6 e GM-SCF, o que explica a febre aguda súbita marcando o início dos sintomas (Amaral *et al.*, 2019). Por sua vez, a viremia proporciona a chegada do vírus aos sítios alvo, como o fígado e os tecidos musculares e das articulações (Miranda *et al.*, 2013). Esses vírus têm tropismo por células dos músculos e articulações como fibroblastos musculares, fibroblastos sinoviais, células satélites, condrócitos e mioblastos (Kafai *et al.*, 2022) (**Figura 6**). Estudos mostraram que o ortólogo humano de MXRA8 é expresso em grandes quantidades na superfície dessas células (Zhang *et al.*, 2019). Além disso, a heparina sulfatada também é expressa em grandes quantidades na superfície celular dessas células e na matriz extracelular produzida por elas (Sarrazin *et al.*, 2011). A disponibilidade de receptores e fatores de ligação nestes tecidos explicaria o tropismo dos vírus (Holmes *et al.*, 2020). Após a ligação com as células hospedeiras via receptores celulares, ocorre a internalização por endocitose mediada por clatrina (Feng *et al.*, 2023; Holmes *et al.*, 2020). Em seguida se inicia a replicação viral no citoplasma celular (Kendall *et al.*, 2019). A replicação viral pode levar à morte dessas células musculares e conjuntivas, fator que influencia diretamente nos sintomas de mialgia e artralgia característicos da fase aguda (Valdés-López *et al.*, 2021). Em resposta à morte celular e da presença de PAMPs virais, ocorre a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias o local, como IFN- α e CXCL10, que recrutam células imunológicas, como

macrófagos, monócitos, células NK e linfócitos T (Baxter e Heise, 2020). Desta forma, é criado um ambiente altamente inflamatório repleto de infiltrados celulares, o que corrobora para os sintomas de artrite e miosite na fase aguda (Sukkaew *et al.*, 2020) (**Figura 6**).

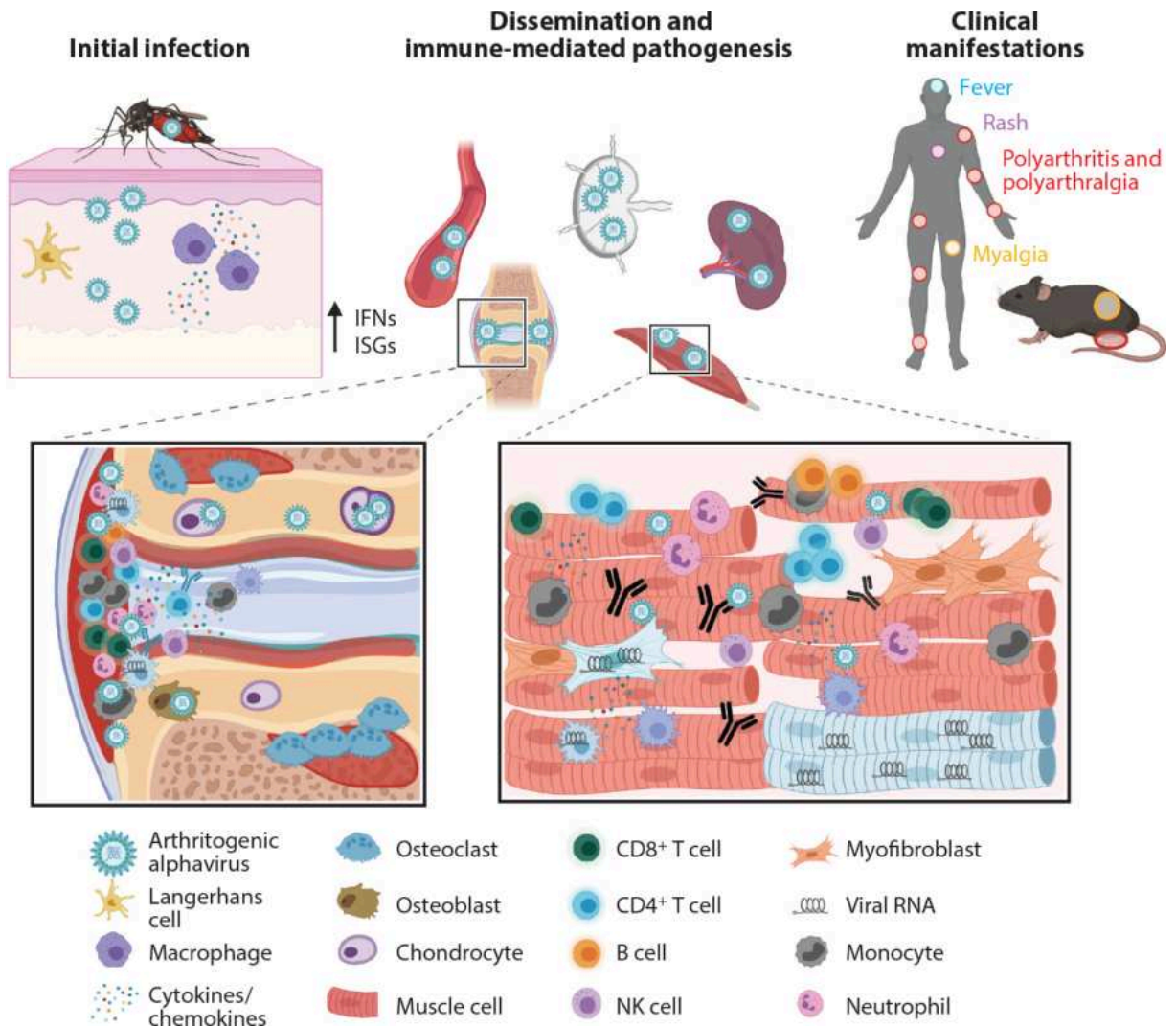


Figura 6: Representação da patogênese das infecções por Alfavírus artritogênicos como o MAYV e CHIKV. No primeiro quadro pode-se observar a inoculação do vírus na derme através da picada do mosquito. Células presentes na derme como fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais replicam inicialmente o vírus. Além disso, macrófagos da derme também podem ser infectados. A infecção dessas células é respondida com a produção de interferon que culmina na ativação de genes estimulados por Interferon (ISGs). Com a replicação inicial na derme, ocorre também o aumento da carga viral que propicia a entrada das partículas virais na corrente sanguínea através da microvasculatura ou linfonodos drenantes. Os macrófagos da derme infectados também podem carrear o vírus para outros tecidos. A viremia e a circulação de macrófagos infectados possibilita a chegada do vírus aos tecidos alvo, como o músculo esquelético e as articulações. Além disso, partículas virais também chegam nos órgãos linfóides e no baço através da corrente linfática. Nos tecidos de tropismo ocorre a replicação viral em altos títulos. A disseminação sistêmica e a deposição das partículas virais em órgãos

periféricos gera uma resposta pró-inflamatória robusta de citocinas e quimiocinas, que controlam a infecção mas também causam danos. A circulação sistêmica dessas citocinas é o que gera o sintoma de febre característico da fase aguda. Nos tecidos periféricos, a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias recruta células imunológicas, como neutrófilos e monócitos circulantes, além de causar danos como reabsorção óssea e sinovite. Nas articulações, a infecção de osteoblastos promove a osteoclastogênese que culmina em erosão óssea. No músculo esquelético, a infecção de células musculares leva à morte dessas células e destruição da fibra muscular. Em resposta a destruição da fibra muscular também ocorre a infecção de condrócitos que culmina na destruição da cartilagem. A infecção e a produção de citocinas também aciona mecanismos como citotoxicidade mediada por células NK e linfócitos TCD8+, além de ativar células TCD4+. Essa infecção aguda é caracterizada por febre, erupção cutânea, artrite, miosite, artralgia e poliartralgia. Macrófagos, mioblastos e miofibroblastos que sobrevivem à infecção podem ser sítios que mantêm trechos do RNA do vírus mesmo muitas semanas após o cessar da fase aguda da infecção, caracterizada pela presença de anticorpos específicos para o vírus. Fonte: Kafai *et al.*, 2022 doi: 10.1146/annurev-immunol-101220-01495

Aliás, estudos em camundongos realizados pelo nosso grupo já haviam demonstrado o caráter imunopatogênico da artrite e miosite causada pela infecção pelo CHIKV e pelo MAYV (Miranda *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2019). Desta forma, as lesões estão associadas principalmente a um infiltrado proliferativo de células linfocitárias mononucleares na membrana sinovial, concomitante à presença de citocinas pró-inflamatórias (Gardner *et al.*, 2010). Os anticorpos de alta afinidade contra a infecção atingem os níveis necessários para a neutralização em aproximadamente 14 dias após o surgimento dos primeiros sintomas, o que procede com o fim da viremia e da fase aguda (Diagne *et al.*, 2020).

Porém, mesmo com a resolução da viremia os sintomas de poliartralgia permanecem em mais de 81% dos casos dos indivíduos sintomáticos. Essas dores são muitas vezes incapacitantes e criam uma instabilidade física, emocional, mental e financeira nos indivíduos infectados. Estudos acompanhando pacientes acometidos por febre do Chikungunya e que desenvolveram artrite crônica 2 meses após o fim da infecção mostraram, através de radiografias e ultrassonografias, efusão das articulações, erosões ósseas, edemas na medula óssea e inflamação do tecido conectivo subcutâneo (celulite), das membranas sinoviais das articulações (sinovite), e dos tendões (tendinite) (Baxter e Heise, 2020). Contudo, os mecanismos por trás da resolução ou persistência dos sintomas ainda não são compreendidos (Figueiredo *et al.*, 2019). O que se sabe é que ambas as situações dependem da resposta imunológica do hospedeiro (Baxter e Heise, 2020).

Já foi evidenciado o envolvimento da resposta imune inata na progressão de lesões teciduais na infecção por CHIKV e MAYV (Teo *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2019). Biópsias do tecido sinovial de pacientes acometidos pela infecção crônica por CHIKV

mostraram a presença de trechos do RNA viral em macrófagos perivasculares através de RT-PCR dos genes que expressam as proteínas virais E1 e Nsp2 (Hoarau *et al.*, 2010). Em razão disso, levantou-se a possibilidade do envolvimento dos macrófagos no estabelecimento das lesões, bem como na persistência da inflamação. De fato, estudos realizando a depleção dos macrófagos em camundongos mostraram uma redução da miosite (Lidbury *et al.*, 2000). Entretanto, a diminuição da população de células mononucleadas, apesar de reduzir a inflamação inicial, também resultou no aumento tardio das lesões músculo articulares determinado por um infiltrado de neutrófilos (Poo *et al.*, 2014). Esses achados demonstram a complexidade do papel dessas células na patogênese dos *Alfavírus* artritogênicos.

Além das complicações nas articulações, há evidências de que os *Alfavírus* podem causar infecções persistentes no músculo (Miranda *et al.*, 2013). Experimentos *in vitro* confirmaram a infecção produtiva do SINV em células musculares humanas (Jussi *et al.*, 2012). Além disso, estudos utilizando camundongos com até 21 dias de idade demonstraram que a infecção por RRV induz inflamação e destruição do músculo esquelético no membro posterior (Morrison *et al.*, 2006). Em particular, o CHIKV se mostrou capaz de infectar e se replicar em fibroblastos, mioblastos e miofibras (Rohatgi *et al.*, 2014). A propósito, biópsias de pacientes em fase aguda e crônica da infecção por CHIKV apontaram a presença de antígenos virais nas células precursoras miogênicas, ou seja, possivelmente o vírus é capaz de infectar células que dariam origem a novos feixes musculares, podendo levar a atrofia da fibra (Ozden *et al.*, 2013). Dessa forma, a capacidade de se replicar em células do músculo esquelético é comum entre os *Alfavírus* artritogênicos, explicando os sintomas de mialgia, miosite e necrose desse tecido (Lentscher *et al.*, 2019). Com isso, pode-se concluir que a chave para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, tanto para a doença aguda quanto contra a cronificação dos sintomas, está no entendimento dos mecanismos de interação vírus-células envolvidas no dano e proteção tecidual na infecção por MAYV e CHIKV.

1.7 Papel dos macrófagos no processo de lesão e reparo tecidual

Macrófagos são leucócitos mononucleares (Stegelmeier *et al.*, 2019) que normalmente tem como célula precursora o monócito, que pode se diferenciar tanto em macrófago quanto em célula dendrítica (Stegelmeier *et al.*, 2019). Entretanto, existem macrófagos que não passam por diferenciação, estando previamente distribuídos nos tecidos (Kierdorf *et al.*, 2016). Essas células circundam os órgãos e cavidades do corpo como, por exemplo, a cavidade peritoneal, a derme, os músculos e os tecidos conjuntivos (Kierdorf *et al.*, 2016) e estão

presentes em seus respectivos tecidos desde o desenvolvimento embrionário, antes mesmo da detecção de monócitos circulantes (Kierdorf *et al.*, 2016). Quanto aos monócitos, são originários da medula óssea e se locomovem pela circulação escaneando o lúmen das células endoteliais podendo captar sinais bioquímicos de tração (Stegelmeier *et al.*, 2019). Ao passarem próximo a locais sinalizados, se aderem ao endotélio e posteriormente migram para o tecido, mediante a gradiente de concentração dos sinais, podendo se diferenciar em macrófagos ou não (McWhorter *et al.*, 2013). Durante a vida adulta, a população de células mononucleares em diversos tecidos é composta por uma mistura de macrófagos originados durante o desenvolvimento de monócitos precursores circulantes (Sawai *et al.*, 2016).

Funcionalmente, os macrófagos fazem parte da resposta imune inata e são conhecidos principalmente por sua capacidade fagocítica (Kierdorf *et al.*, 2016). Entretanto, existem inúmeros outros papéis importantes desempenhados por essas células, como na manutenção da homeostase, no desenvolvimento de tecidos, no reparo tecidual e na resposta a danos e infecções (Kierdorf *et al.*, 2016). Além disso, há uma considerável diversidade de populações de macrófagos especializados em seus respectivos tecidos, como células de Küpffer e microglia, por exemplo (Bassler *et al.*, 2019). Contudo, os macrófagos também estão envolvidos na progressão de uma série de doenças (McWhorter *et al.*, 2013).

A versatilidade dos macrófagos se deve a sua capacidade de expressar diferentes programações funcionais em resposta a estímulos do microambiente (Mantovani *et al.*, 2002). Sinais biomoleculares advindos de microrganismos, dano tecidual e de outras células do sistema imune, acionam mecanismos intracelulares nos macrófagos como fatores transcricionais, regulações de tradução de proteínas e remodelamento da cromatina (Ostuni e Natoli, 2011). Por sua vez, a reprogramação celular altera os receptores expressos na superfície celular, as citocinas e quimiocinas secretadas e promove uma regulação fina da funcionalidade dessas células. (Ostuni e Natoli, 2011). Por exemplo, macrófagos alveolares tem sua capacidade pró-inflamatória refreada devido a sinais repressores de inflamação liberados por células do epitélio pulmonar e dessa forma são menos reativos a constante presença de antígenos inofensivos vindos das vias aéreas (Ostuni e Natoli, 2011). Essa reprogramação costuma ser chamada de “ativação” ou “polarização” na literatura (Biswas e Mantovani, 2010). O nome “polarização” segue a nomenclatura da resposta imune polarizada (resposta imune do tipo 1 e resposta imune do tipo 2, TH1 e TH2 e etc.) (Biswas e Mantovani, 2010). Nesse caso, haveria dois possíveis perfis distintos para a ativação dos macrófagos: podem ser ativados pela via clássica, geralmente estimulada pelo sinal de citocinas

pró-inflamatórias do tipo 1 e a presença espécies reativas e assumir o perfil denominado M1 de macrófago pró-inflamatório; ou serem ativados pela via alternativa, geralmente estimulada pelo sinal de citocinas pró-inflamatórias do tipo 2 e a presença de um ambiente de cicatrização, assumindo o perfil M2 de macrófago anti-inflamatório (McWhorter *et al.*, 2013). Tanto macrófagos recrutados quanto macrófagos residentes podem ser ativados em qualquer um dos dois perfis de polarização (McWhorter *et al.*, 2013). Além disso, ambas as subpopulações de macrófagos (M1 e M2) são observadas em diferentes fases da resposta imune a infecções e danos (McWhorter *et al.*, 2013).

A polarização em M1 dos macrófagos aumenta significativamente a sua capacidade fagocítica e faz com que expressem altos níveis de MHC de classe II em sua superfície, proporcionando uma otimização na captação e apresentação de antígenos (Ross *et al.*, 2012). Ademais, sua capacidade citotóxica e pró-inflamatória também é ampliada, induzindo a produção de óxido nítrico sintases (iNOS) e citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-12, IL-1 β e TNF- α , além de quimiocinas como CCL2 e CCL5, promovendo a capacidade de recrutar outras células imunológicas (Ross *et al.*, 2012). Entretanto, o descontrole dessa aptidão dos macrófagos M1 pode ser o gatilho para o desenvolvimento de doenças. Já foi demonstrado que macrófagos inflamatórios sinoviais são fontes de citocinas fundamentais para o estabelecimento de um ambiente inflamatório nas articulações durante a evolução da artrite reumatoide (RA), além de recrutarem mais leucócitos para o infiltrado do tecido articulado, amplificando e impulsionando a progressão da doença (Ross *et al.*, 2012). Bem como um estudo em camundongos mostrou que o mesmo sistema de retroalimentação da inflamação nas articulações ocorre na infecção por *Alfavírus*, ao observar que os macrófagos são a população majoritária nas articulações pós-infecção e que o recrutamento de células do infiltrado, o nível de citocinas e a carga viral é mediado diretamente pela presença dessas células (Lin *et al.*, 2020). Com isso, pode-se elucidar o papel dessas células no dano tecidual.

Em contrapartida, macrófagos também atuam na cicatrização e na atenuação da inflamação (Minutti *et al.*, 2016). A cicatrização consiste no reparo e restauração de um tecido lesionado, por trauma mecânico ou infecção, até retornar ao seu estágio de homeostase (Kim e Nair, 2019). Após a lesão, ocorre coagulação e inflamação no tecido lesionado, como reação ao trauma ou infecção (Minutti *et al.*, 2016). Quando resolvido o estresse no tecido, os restos de células mortas são retirados e a inflamação é cessada (Kim e Nair, 2019). Por fim, ocorre a revascularização das áreas lesionadas e a regeneração do tecido (Gause *et al.*, 2013). A injúria epitélio faz com que as células dessa barreira disparem alarmes em resposta, como a liberação

de linfopoitina estromal tímica (TSLP) e citocinas como IL-25 e IL-33 (Zhu *et al.*, 2017). Essas moléculas estimulam a produção de IL-4 e IL-13, citocinas capazes de ativar macrófagos, polarizando-os em seu perfil M2 (Gause *et al.*, 2013). O mecanismo de reparo tecidual dos macrófagos M2 funciona através de inúmeras vias, incluindo fatores de crescimento e metaloproteinases de matriz (Zhu *et al.*, 2017). Além disso, essas células produzem arginases 1 (enzima que catalisa a hidrólise de arginina e compete com a iNOS pela L-arginina) que é uma molécula efetora do processo de cicatrização (Zhu *et al.*, 2017). Essa molécula atua atenuando a inflamação e promovendo a deposição de matriz através do metabolismo da L-arginina (Kim e Nair, 2019). Macrófagos M2 também são capazes de induzir a proliferação de fibroblastos e a expressão da síntese de colágeno e α -actina de músculo liso por essas células (Zhu *et al.*, 2017). A indução da expressão de α -actina de músculo liso por fibroblastos torna essas células capazes de se diferenciar em miofibroblastos (Zhu *et al.*, 2017). Por fim, macrófagos M2 também desempenham um papel crucial na limpeza de células apoptóticas resultantes de um ambiente inflamatório. A fagocitose de células apoptóticas não infectadas induz a produção de moléculas anti-inflamatórias (como IL-10) e fatores de crescimento remodeladores de tecido (como TGF- β), conferindo papel no reparo de tecidos lesionados (Minutti *et al.*, 2016). Contudo, macrófagos participam da manutenção da homeostase de diversos tecidos e atualmente sabe-se que a plasticidade dessas células vai além da dicotomia limitada dos perfis M1/M2 (Xue *et al.*, 2014)

A recuperação funcional do tecido muscular que tenha sofrido trauma agudo ou doença crônica, como no caso da infecção por Alfvírus artritogênicos, é determinada pela interação de respostas das células musculares e de células mielóides, principalmente macrófagos (Zhang *et al.*, 2019). Essa interação promove a ativação, proliferação e a diferenciação de células tronco musculares (as células satélite) (Tidball *et al.*, 2014). É um processo estritamente regulado onde, após o dano, o tecido muscular libera moléculas que recrutam células imunológicas, como a população de monocitos CX3CR1^{LOW} e de macrófagos Ly6C⁺ (Zhang *et al.*, 2019). Essas células então alteram seus fenótipos (CX3CR1^{HIGH} e Ly6C⁻ respectivamente) e assumem características pró-inflamatórias, sendo agora responsáveis por fagocitar *debris* celulares resultantes das células mortas nesse tecido (Zhang *et al.*, 2019). Posteriormente, é necessário cessar esse processo inflamatório para que não cause danos colaterais. A resolução da inflamação não é um processo passivo que ocorre com uma redução dos sinais pró-inflamatórios, mas sim é mediado por outras células (como a população de monócitos e macrófagos Ly6C^{LOW}) que são recrutados para o local e atuam expressando uma

gama de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL13 (Dort *et al.*, 2019). Por sua vez, essas citocinas são responsáveis por polarizar os macrófagos no local para o perfil M2. Os macrófagos, agora ativados em seu perfil anti-inflamatório, começam a secretar moléculas e citocinas a fim de promover o fim da inflamação (pois inativam linfócitos TH1 e competem pela L-argenina com os macrófagos M1) e a regeneração desse tecido (Zhang *et al.*, 2019). Estudos em camundongos apontam que o mesmo processo de alternância na subpopulação de macrófagos ocorre na fase aguda e na resolução da infecção por *Alfavírus* (Zaid *et al.*, 2020). Assim como estudos realizando ensaios de depleção de macrófagos evidenciaram que a ausência dessas células impede a capacidade regenerativa do tecido (Summan *et al.*, 2019). Ou seja, essas células desempenham um papel essencial na regeneração muscular, inclusive no dano tecidual induzido por MAYV e CHIKV.

2 Justificativa

Diversos aspectos da patogênese dos *Alfavírus* artritogênicos ainda não são totalmente compreendidos. Como supracitado, estudos apontam forte contribuição da resposta imunológica na evolução das doenças causadas por esses vírus (Miranda *et al.*, 2013; Kierdorf *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2020; Figueiredo *et al.*, 2019).

Os principais quadros apresentados por indivíduos acometidos pela infecção por *Alfavírus* artritogênicos são de mialgia e poliartralgia (Ganesan *et al.*, 2017), que estão associados a lesões causadas no tecido muscular e articulações, determinada pela elevada replicação viral, morte celular e exposição prolongada ao ambiente altamente inflamatório (Baxter e Heise, 2020; Lin *et al.*, 2020). Por sua vez, a manutenção do ambiente inflamatório é mediada pelas células do infiltrado celular (Ross *et al.*, 2012). Desta forma, é possível afirmar que o tecido muscular infectado, juntamente às células imunes, se torna um complexo sistema que proporciona diversas interações entre células e os mediadores secretados, mantendo a ativação e o processo inflamatório continuamente ativo.

Dentre as células que invadem o músculo, os macrófagos pró-inflamatórios representam a população majoritária (Lin *et al.*, 2020; Mostafavi *et al.*, 2019). Essas células podem ser ativadas mediante estímulos, assumindo diferentes papéis efetores em diferentes fases da resposta associada a infecção, tendo um papel no controle do patógeno, mas também no reparo tecidual (Zhang *et al.*, 2019). Contudo, os macrófagos também participam no desenvolvimento de lesões musculares (Ross *et al.*, 2012; Lidbury *et al.*, 2008). Estudos

realizando a depleção dessas células em camundongos infectados por RRV, mostraram uma ausência nos quadros de miosite e artrite (Lidbury *et al.*, 2008). A participação dos macrófagos na lesão muscular causada por *Alfavírus* artritogênicos foi evidenciada e está relacionada a um desbalanço na resposta inflamatória (Lin *et al.*, 2020; Mostafavi *et al.*, 2019).

Ainda que o sistema imunológico desempenhe um papel na lesão muscular causada pela infecção por *Alfavírus*, células do sistema imune, como macrófagos, são essenciais para o processo de regeneração muscular (Dort *et al.*, 2019). Estudos utilizando camundongos *knockout* para CCR2 (receptor de quimiocina C-C tipo 2), um receptor quimiotático que medeia a saída de precursores mielóides de macrófagos de origem medular da medula óssea, mostraram uma deficiência nesses animais na regeneração do músculo esquelético (Martinez *et al.*, 2010). O processo de reparo do tecido muscular envolve o recrutamento coordenado e a proliferação controlada dos macrófagos, além da comunicação intercelular com as células musculares (Zhang *et al.*, 2019). Ademais, diferentes subpopulações de macrófagos participam desse processo (Zhang *et al.*, 2019). Sendo os macrófagos células de grande relevância na geração e controle das lesões, bem como capazes de manter trechos do RNA viral internalizados (Miranda *et al.*, 2013; Kierdorf *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2020; Figueiredo *et al.*, 2019), devido a sua plasticidade e comportamento dinâmico durante o curso da infecção por *Alfavírus* (Zaid *et al.*, 2020), observar de forma isolada, em modelo de cocultura, como os macrófagos em diferentes espectros de ativação podem contribuir no processo de lesão de células musculares, pode nos proporcionar um entendimento mais claro de como as infecções por *Alfavírus* evoluem para miopatias e quais mediadores são determinantes para esse processo.

3 Objetivo

3.1 Objetivo geral

Estabelecer um modelo de cocultura celular entre fibras musculares esqueléticas e macrófagos, que possibilite avaliar o papel dos macrófagos no dano muscular induzido pela infecção pelo MAYV e o CHIKV

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população de células isoladas de peritônio de camundongos SV129;
- Avaliar a capacidade do MAYV e CHIKV de replicar em macrófagos isolados de peritônio;
- Caracterizar a replicação e sobrevivência de fibras musculares de células C2C12 infectadas pelo MAYV e CHIKV;
- Avaliar a morfologia e sobrevivência das células musculares infectadas em cocultivo e na ausência dos macrófagos de peritônio e de medula;

4 Metodologia

4.1 Isolamento de macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram isolados através do lavado do peritônio de camundongos selvagens (Linhagem SV129) do sexo masculino com 8 semanas de idade. Para isso, os animais foram eutanasiados mediante a utilização de anestésico inalatório volátil isoflurano (Isoflurano 100%; Isoforine® da Cristália). Em seguida, foi realizada uma secção sobre o abdome do animal, de forma a remover o pêlo e a pele, expondo o peritônio. Por fim, foi realizada a lavagem do peritônio desses animais, introduzindo 5mL de meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, vitaminas e aminoácidos essenciais; ThermoFisher®), com o auxílio de uma seringa, na cavidade peritoneal. O meio foi aspirado logo em seguida, também com auxílio de uma seringa. Além disso, também foram realizados lavados com peritonite induzida. Para isso, antes do procedimento de lavagem, foi injetado 2.5mL de tioglicolato (3%) na cavidade peritoneal dos camundongos. A lavagem do peritônio foi realizada 4 dias após a inoculação de tioglicolato. As células dos lavados foram quantificadas com o auxílio da câmara de Neubauer.

4.2 Diferenciação de macrófagos de medula óssea

Para o experimento foram coletados fêmur e a tíbia dos camundongos. As epífises dos ossos foram cortadas para dar acesso ao conteúdo medular. Em seguida, foram injetados 1mL de meio RPMI em uma das extremidades do osso para a lavagem da medula. O conteúdo medular obtido foi homogeneizado e diluído em 1:4 para que pudéssemos quantificar as

células. O quarto de diluição é então quantificado com o auxílio da câmara de Neubauer. Em seguida, são plaqueadas 1×10^7 das células obtidas em placas de petri com 10ml de meio RPMI com 10% de soro fetal e 30% de meio sobrenadante de L929. A cultura é mantida por 8 dias, sendo adicionado mais 10mL de meio completo (RPMI com 30% sobrenadante de L929 e 10%SFB) no terceiro dia, para a aderência das células ao fundo da placa e a diferenciação das células mielóides precursoras em macrófagos. Após esse período, os macrófagos maduros são coletados e os utilizamos para outras análises.

4.3 Linhagem celulares

Para experimentos foram utilizados mioblastos murinos da linhagem C2C12 (CRL-1772™; linhagem celular obtida do American Type Culture Collection - ATCC), cultivados em monocamada em DMEM alta concentração de glicose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) mantidas em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. Foram mantidas em frascos de cultura médios (75 cm²) e a manutenção foi realizada utilizando 3×10^5 células para uma nova garrafa. Para a passagem, plaqueamento e contagem, as células foram soltas com solução de Tripsina 0,25% e EDTA 0,01% em PBS. A manutenção foi realizada antes da cultura apresentar confluência maior ou igual a 60%.

Células VERO (CCL-81™; linhagem celular obtida do American Type Culture Collection - ATCC) células de rim de macaco verde foram cultivados em monocamada em DMEM alta concentração de glicose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) mantidas em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. Foram mantidas em frascos de cultura médios (75 cm²) e a manutenção foi realizada utilizando 3×10^5 células para uma nova garrafa. Para a passagem, plaqueamento e contagem, as células foram soltas com solução de Tripsina 0,25% e EDTA 0,01% em PBS. A manutenção foi realizada antes da cultura apresentar confluência maior ou igual a 60%.

Células L929 (NCTC clone 929; linhagem celular obtida do American Type Culture Collection - ATCC) fibroblastos murinos de tecidos conjuntivos foram cultivados em monocamada em DMEM alta concentração de glicose (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) mantidas em estufa a 37° C com atmosfera de 5% de CO₂. Foram mantidas em frascos de cultura médios (75 cm²) até atingir a confluência. Nos experimentos utilizamos o sobrenadante da cultura celular para diferenciar os monócitos de

medula óssea em macrófagos. Por isso, após atingir a confluência, as células foram soltas com solução de Tripsina 0,25% e EDTA 0,01% em PBS e passadas para um frasco de cultura grande (175 cm²). Foram mantidas em cultura por 8 dias para que secretassem as moléculas necessárias para o processo de diferenciação das células precursoras mieloides em macrófagos. Após esse período o sobrenadante foi coletado em tubos Falcon (15 mL) e congelado para usos posteriores.

4.4 Infecção dos macrófagos

Após a quantificação dos macrófagos do lavado, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (2x10⁵ células por poço em 500uL de meio RPMI com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB) e as placas postas na atmosfera de 37°C com 5% CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, o meio de cultura dos poços foi substituído por 200uL de meio de infecção (RPMI sem SFB) contendo CHIKV (estoque em 4x10⁸ PFU/ml) ou MAYV (estoque em 2x10⁷ PFU/ml) com MOI de 1. As células foram submetidas ao meio de infecção por um período de 1 hora, que confere o tempo de adsorção das partículas virais na superfície celular. Após esse período, o meio de infecção foi substituído por meio RPMI com soro. Na sequência, as placas retornaram à atmosfera de 37°C por um período de 72 horas. Durante esse período foram realizadas coletas nos pontos de 1 hora pós infecção, 24hpi, 48hpi e 72 hpi. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e adicionado formol 4% (pH 7,4) por 10 minutos e lavados com PBS. Por fim, as placas com poços contendo as células fixadas foram observadas em microscópio de campo claro no aumento de 10x para averiguar a morfologia.

4.5 Modelo de cocultura fibras musculares e macrófagos

Para o estabelecimento do modelo de cocultura macrófagos e fibras musculares, foi necessário diferenciar os mioblastos C2C12 em fibras maduras. Para isso, primeiro as células foram plaqueadas em placas de 48 poços (2,5x10⁴ células por poço), em 200uL de meio DMEM^{HIGH} com 10% de SFB. No dia seguinte ao plaqueamento, o meio foi trocado para um meio de diferenciação (DMEM^{HIGH} e 2% de soro de cavalo). Levando aproximadamente 5 dias para a formação de fibras nos poços, onde trocamos o meio de diferenciação velho por um novo a cada 2 dias para não haver morte celular por depleção de nutrientes. As fibras diferenciadas foram então infectadas, removendo o meio de diferenciação e adicionando meio de infecção (CHIKV ou MAYV MOI 1.0). Durante o período de adsorção, foi feito o lavado

de peritônio e quantificação dos macrófagos isolados. Em seguida, foi realizada a cocultura direta ou a cocultura indireta. Na cultura direta, foram adicionados ao meio contendo fibras maduras de C2C12 os macrófagos dos lavados. Nos experimentos de cocultura indireta, insertos de tamanho correspondente foram adicionados sobre a placa de *transwell* de 24 poços e receberam macrófagos peritoneais sobre os poços com poros de 0.015 μm . A densidade celular foi calculada de forma a ficar 1 célula muscular originalmente plaqueada para cada 5 macrófagos (1:5). Com isso, tivemos 6 grupos de poços: grupo C2C12 infectadas por CHIKV; grupo C2C12 infectadas por MAYV; grupo C2C12 não infectado (MOCK); grupo C2C12 infectado com CHIKV na presença do macrófago (CHIKV-Mo); grupo C2C12 infectado com MAYV na presença do macrófago (MAYV-Mo); grupo C2C12 não infectado na presença do macrófago (MOCK-Mo). As células foram mantidas nessas condições por um período de 30 horas, onde foram coletados 20uL nos pontos 1hpi, 16hpi, 24hpi e 30hpi para titulação (curva de replicação).

4.6 Ensaio de formação de placas de lise

Para o experimento, foram coletados 50uL por poço em cada ponto (1 hpi, 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi para os macrófagos; 1 hpi, 24hpi e 30hpi para os miotubos em cocultura). Em seguida, foi realizada a diluição seriada das amostras em placas de titulação (96 poços) contendo 225 μL de meio em cada poço, onde cada um dos primeiros poços recebeu 25 μL (1:10), o poço seguinte recebeu 25 μL da amostra diluída do primeiro poço (1:10) e assim sucessivamente. Entre cada diluição foi realizada a homogeneização para que se mantenha a fidelidade das passagens. Em sequência, foram preparadas placas de 24 poços contendo células Vero. As placas foram infectadas com as amostras diluídas de forma retilínea e respectiva (cada série de diluições de uma amostra corresponde a uma reta de poços de VERO). Dessa forma foi feita a infecção de forma seriada do maior título de vírus para o menor nos poços. A placa infectada foi posta na estufa por 1 hora a temperatura de 37°C para a etapa de adsorção viral. Após esse período, foram adicionados 1ml de uma solução contendo 1,5% CMC (m/v, carboximetilcelulose), 1% SFB, penicilina, streptomina e DMEM-High em cada poço. A seguir, a placa retornou à atmosfera da estufa por um período de 48 horas. Por fim, os poços foram fixados adicionando formaldeído (10%) e mantido por 1 hora. A placa então foi lavada (água), para a remoção do formol, e depois adicionado cristal violeta para a coloração. A placa então foi lavada com água novamente e contadas as unidades formadoras de plaque (PFU) para saber o título viral (número de plaques por placa x

fator de diluição x fator de compensação).

4.7 Análise da estrutura das fibras

A estrutura das fibras foi analisada por imunofluorescência. Para isso, os poços da cocultura foram lavados com PBS e em seguida fixados utilizando solução de formol 4% em PBS (pH 7.6) por 10 minutos. Após esse período, os poços foram lavados com PBS e então permeabilizados com saponina 0,1% diluída em PBS com albumina 0,1% (BSA) por 15 minutos. Em seguida, lavadas novamente com BSA 0,1% em PBS. Então, as células permeabilizadas foram bloqueadas com BSA 1% e SFB 2% em PBS por 20 minutos, para em seguida serem lavadas com BSA 0,1% em PBS. Posteriormente, os poços foram incubados com anticorpo primário de marcação para a proteína da cadeia pesada da miosina (concentração 1:1000, murino, MF20 de hibridoma) em BSA 0,1% em PBS por 1h. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo (concentração 1:500, cabra, Alexa Fluor 488 da Invitrogen) em BSA 0,1% em PBS por 30 minutos. As células foram lavadas novamente e incubadas com DAPI (concentração 1:10000, da Thermofisher) em BSA 0,1% em PBS por 10 minutos e em seguida lavadas. Foram mantidas em PBS para a captura das imagens que serão obtidas em microscópio de fluorescência invertido em aumentos de 10x.

4.8- Análise estatística

Todos os gráficos e análises estatísticas deste trabalho foram realizadas em software GraphPadPrism® 6. As análises foram feitas calculando as médias (mean test).

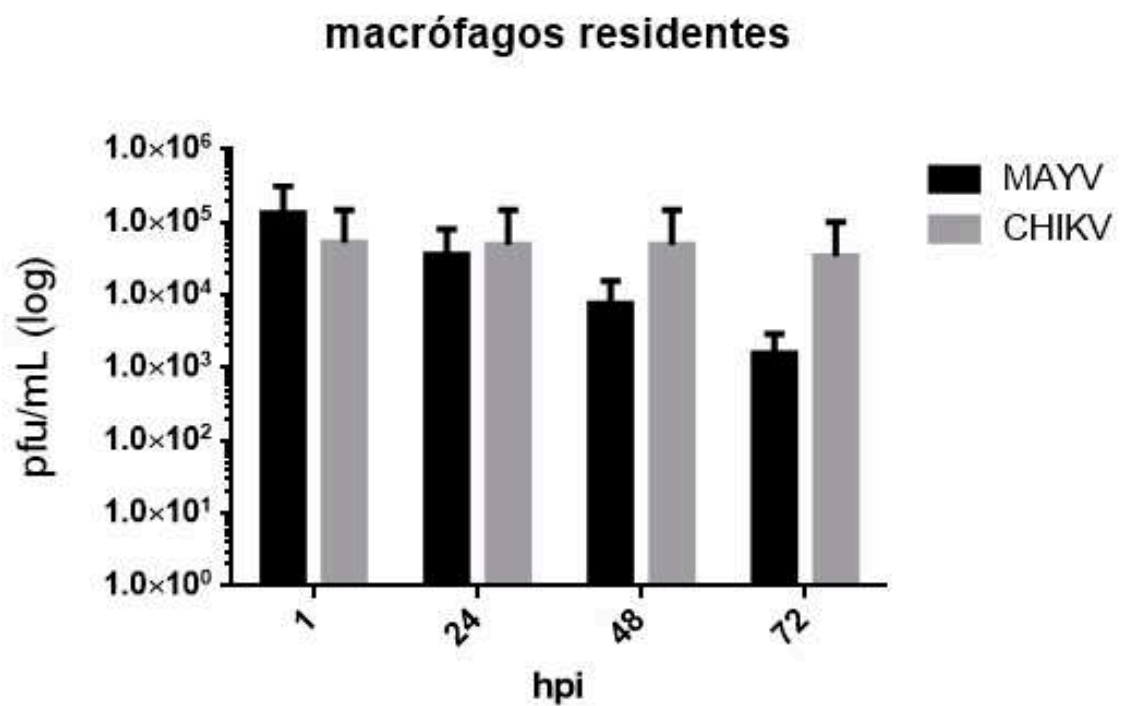
5 Resultados

5.1 O MAYV e CHIKV não são capazes de replicar em macrófagos de peritônio

Uma vez que seriam colocados em cocultivo com as fibras musculares, nós inicialmente avaliamos se os macrófagos do lavado eram permissivos a infecção por MAYV e CHIKV. Para isso, realizamos quatro lavados peritoneais e plaqueamos 2×10^5 células, as que não aderiram foram removidas e os macrófagos expostos a uma MOI de 1 CHIKV ou MAYV de forma a ter três poços iguais para cada condição. A partir quantificação das partículas infecciosas no meio do cultivo foi possível observar que a exposição dos macrófagos

residentes no peritônio ao MAYV e CHIKV não gera uma infecção produtiva significativa, com a tendência de quantidades decrescentes de partículas virais detectáveis entre 1 e 72 horas pós-infecção para o MAYV e manutenção da carga viral inicial do CHIKV (**Figura 7 a**). Nós também avaliamos a replicação em macrófagos isolados de peritônio após indução de peritonite com o tioglicolato em um animal e o mesmo perfil foi observado (**Figura 7 b**).

a)



b)

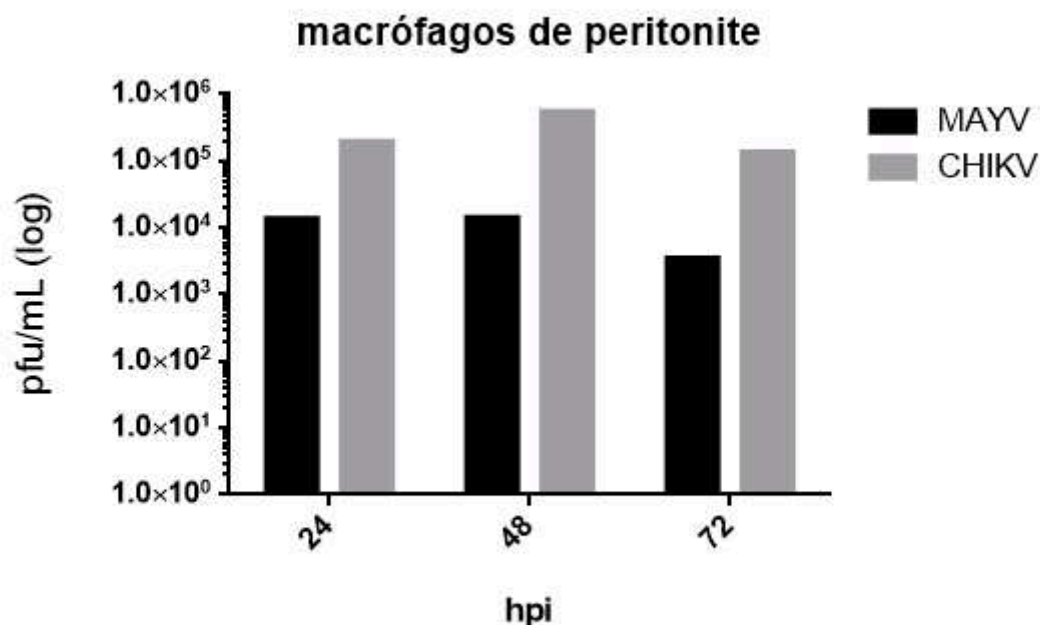


Figura 7: Análise da permissividade de macrófagos residentes e recrutados (tioglicolato) isolados de peritônio a infecção pelo MAYV e CHIKV. Macrófagos foram coletados do peritônio de camundongos SV129 sem peritonite induzida (n=4) (a) ou com peritonite induzida por injeção de tioglicolato (n=1) (b) e infectados com MOI de 1 dos vírus MAYV e CHIKV. Ao longo de 3 dias, foram realizadas coletas nos pontos 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi para os macrófagos de peritonite, e 1 hpi, 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi para os macrófagos residentes. Cada condição do experimento foi feita em triplicata. A quantificação do título viral foi determinada por ensaio de placa de lise e os valores apresentados em PFU/mL.

5.2 Macrófagos expostos ao MAYV e CHIKV sofrem alterações morfológicas

As células do lavado infectadas com CHIKV e MAYV com MOI de 1 por 24 horas foram fixadas e sua morfologia foi avaliada por microscopia ótica com um aumento de 10x. Pode-se observar alterações na morfologia dos macrófagos de cada poço, onde os poços infectados apresentam células com projeções e tamanho variado, principalmente quando expostos aos MAYV (**Figura 8 a**). Além disso, no grupo de macrófagos expostos ao MAYV foi observado um maior número de

células com projeções inclusive comparadas aos expostos ao CHIKV (**Figura 8 b**). Esses resultados indicam uma possível ativação dos macrófagos que entraram em contato com MAYV.

a)



b)

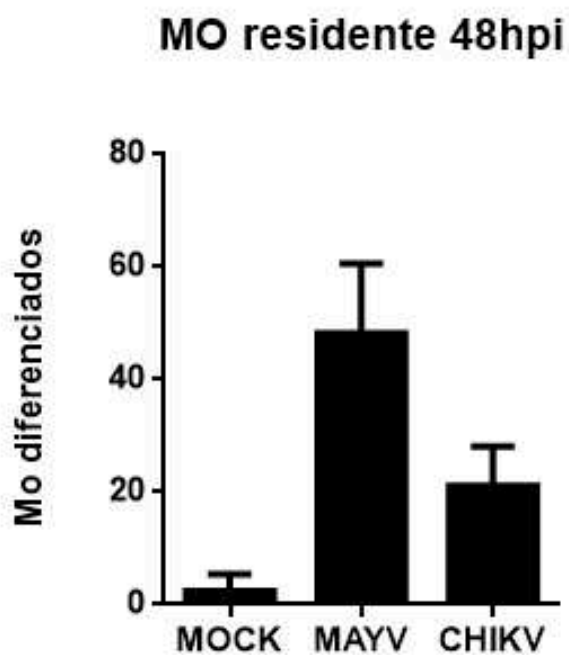


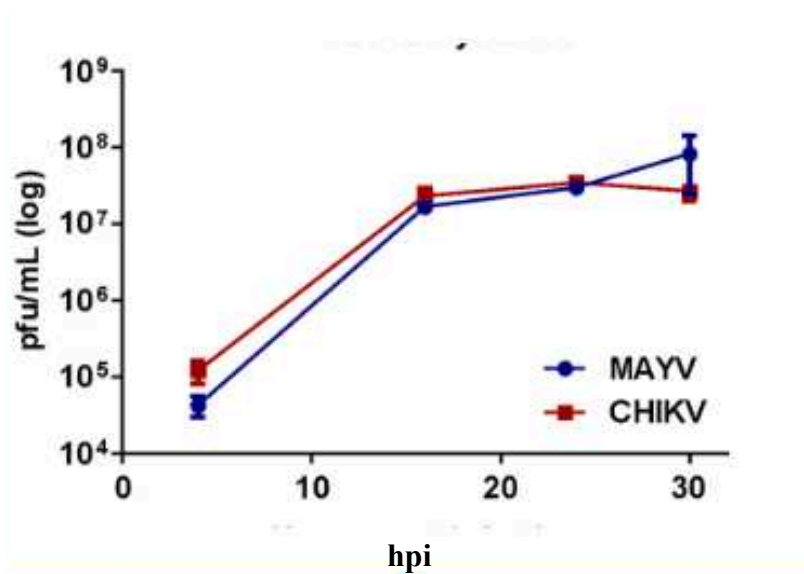
Figura 8: Análise fenotípica dos macrófagos infectados por MAYV e CHIKV. (a) Imagem de campo claro representativa da morfologia das células controle, infectado por MAYV e infectado por CHIKV. As setas servem para indicar as projeções celulares. (b) Quantificação de células que apresentaram projeções nos poços em % do total de células presentes no campo. Foram plotados os valores em % da análise de ao menos 15 campos de um único experimento. Cada condição foi feita em triplicata de forma a observar 5 campos de cada poço (15 para cada condição).

5.3 O MAYV e CHIKV infectam e replicam em miofibras de camundongos da linhagem C2C12

Para avaliar se o MAYV e CHIKV são capazes de replicar nas fibras maduras de C2C12 em nossas condições experimentais, os mioblastos foram plaqueados em duas placas de placas de 48 poços e submetidos a diferenciação em miotubos por um período de 5 dias. Em seguida, foram infectados por CHIKV e MAYV (MOI de 1) e a liberação de partículas infecciosas foi analisada em 1 hpi, 16 hpi, 24 hpi e 30 hpi. Esse ensaio foi realizado pelo coorientador Rômulo Neris e eu pude acompanhá-lo durante a experimentação. Os resultados demonstram que tanto MAYV quanto CHIKV são capazes de replicar nas fibras maduras de C2C12 com um perfil de liberação temporal das partículas muito semelhante (**Figura 9 a**). Além disso, em 24 horas após a infecção por CHIKV e MAYV, quase todas as células são positivas para detecção da proteína E1 (**Figura 9 b**).

Mioblastos maduros C2C12

a)



b)

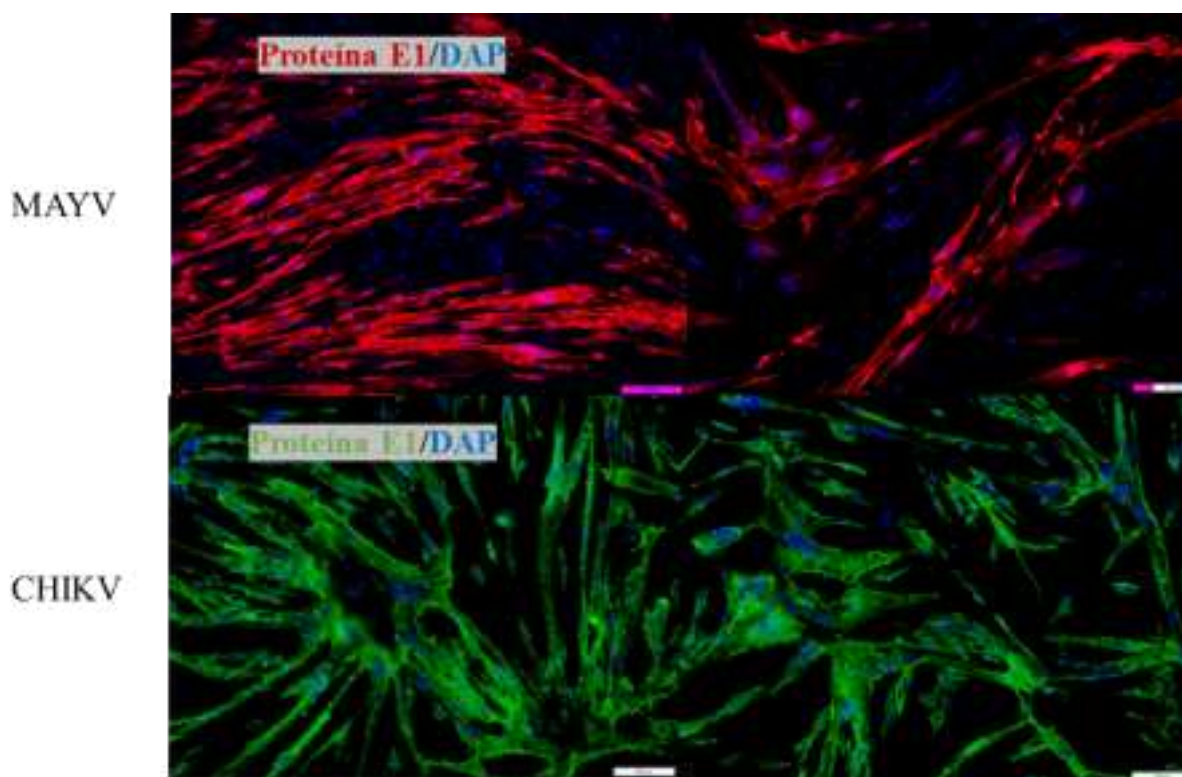


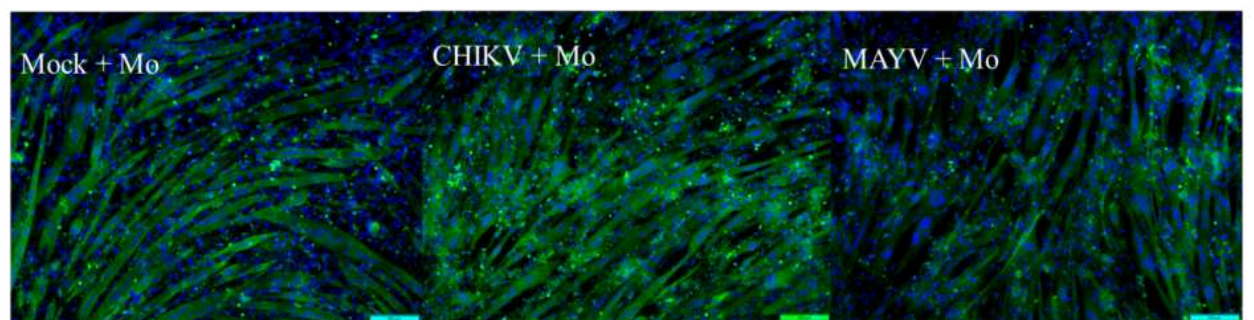
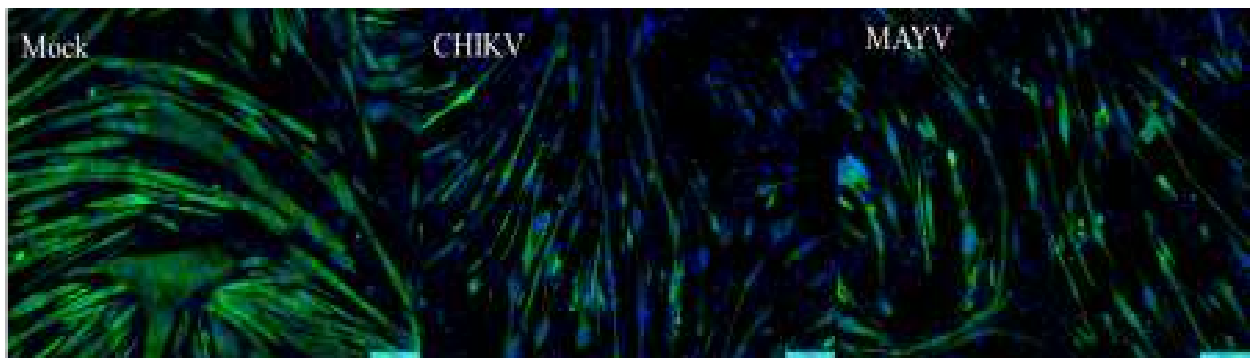
Figura 9: Análise da replicação do MAYV e CHIKV em miotubos da linhagem C2C12. Foram realizados dois experimentos de infecção de células musculares. (a) curva de replicação do MAYV e CHIKV em miotubos C2C12. Aliquotas seriadas do sobrenadante foram coletadas ao longo do tempo e as partículas virais presentes foram quantificadas por ensaio de placa de lise (b) Os poços foram fixados em 30 hpi, as células foram marcadas para a proteína E1 do vírus (vermelho = E1 do MAYV; verde = E1 do CHIKV) e para o núcleo celular com DAPI (azul) e analisadas em microscópio de fluorescência. Cada experimento independente foi feito com uma réplica correspondente (duplicata).

5.4 O cocultivo com as células isoladas do peritônio protege as fibras musculares infectadas pelo MAYV e CHIKV

Para avaliar a interação entre células musculares infectadas por MAYV e CHIKV e as células da suspensão mista do peritônio, fibras musculares maduras de C2C12, cultivadas em placas de 48 poços, foram infectadas por MAYV ou CHIKV. Após 1 hora de infecção, estas fibras foram ou não cocultivadas com as células de peritônio de forma direta na proporção de 1:5. Após 24 hpi, foi realizada a microscopia de fluorescência (aumento de 10x) da placa com marcação da fibra muscular utilizando anticorpo anti-MF20 que marca a cadeia pesada da

miosina (verde) e núcleos celulares marcados com DAPI (azul). Os resultados mostraram uma preservação na estrutura das fibras na presença dos macrófagos (**Figura 10 a**). O mesmo não foi observado nas fibras que não foram submetidas à cocultura. Além disso, nós coletamos o sobrenadante nos pontos 4hpi, 16hpi e 24 hpi para avaliar a liberação de partículas infecciosas nas fibras infectadas pelo CHIKV em cocultivo com as células do lavado. Nós observamos uma diminuição das partículas infecciosas quando na presença dos macrófagos (**Figura 10 b**). Neste ensaio também avaliamos a carga viral liberada nas fibras em cocultivo indireto com as células do lavado, através do uso de placas com sistema de transwell. Os dados indicam que a redução da carga viral é dependente do contato direto fibra-macrófcagos (**Figura 10 b**)

a)



b)

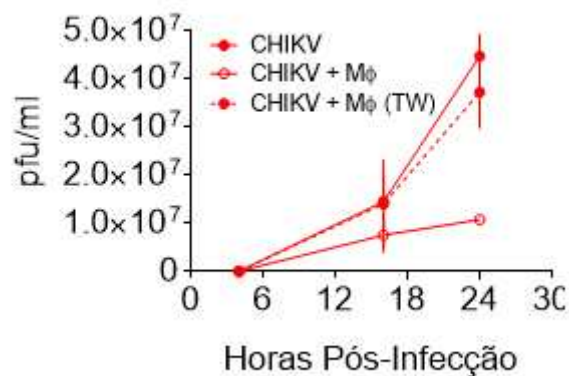
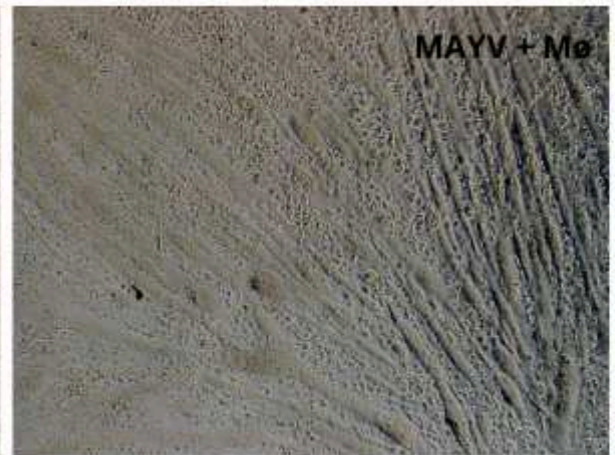
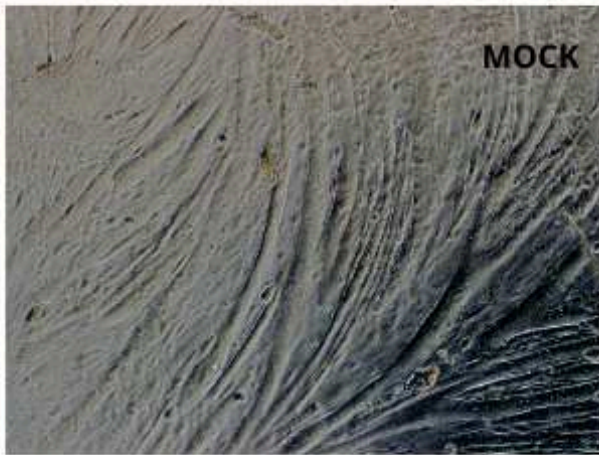
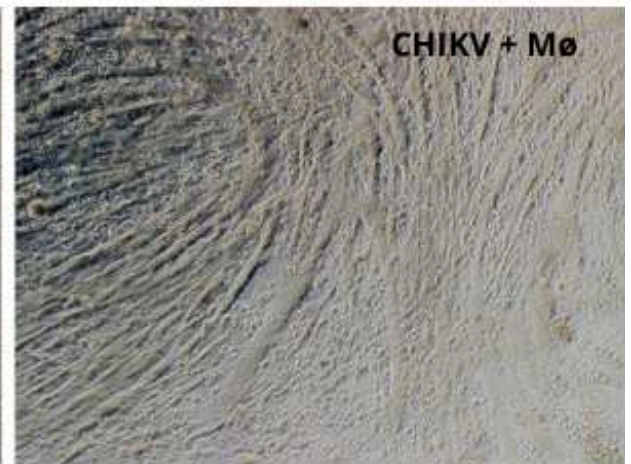


Figura 10: Avaliação da integridade da fibra muscular e replicação viral na cocultura. Foram realizados dois experimentos independentes de infecção. (a) microscopia de fluorescência das fibras musculares infectadas e controle na presença e ausência dos macrófagos. (b) Avaliação da replicação viral do CHIKV ao longo de 24 horas nas condições sem macrófagos, cocultura direta e indireta. As coletas do sobrenadante foram feitas nos pontos 4hpi, 16hpi e 24hpi por titulação nos pontos da cocultura direta e indireta. Cada experimento independente foi feito com uma réplica correspondente (duplicata).

5.5 Os macrófagos de medula também conferem proteção às fibras musculares infectadas pelo MAYV e CHIKV

Para confirmarmos se de fato são os macrófagos que conferem proteção às fibras infectadas e não toda a suspensão mista do peritônio ou alguma outra população celular presente nessa suspensão, nós realizamos o mesmo ensaio com macrófagos diferenciados de células isoladas da medula óssea em cocultura com fibras musculares infectadas por MAYV e CHIKV ou expostas MAYV inativado, CHIKV inativado e Poli:IC. Após 24 horas, observamos a estrutura das fibras nos poços em campo claro. Esses dados ainda preliminares indicam que a proteção conferida às fibras infectadas pelo cocultivo com a cultura mista também ocorre quando cocultivamos somente com macrófagos (**Figura 11**).





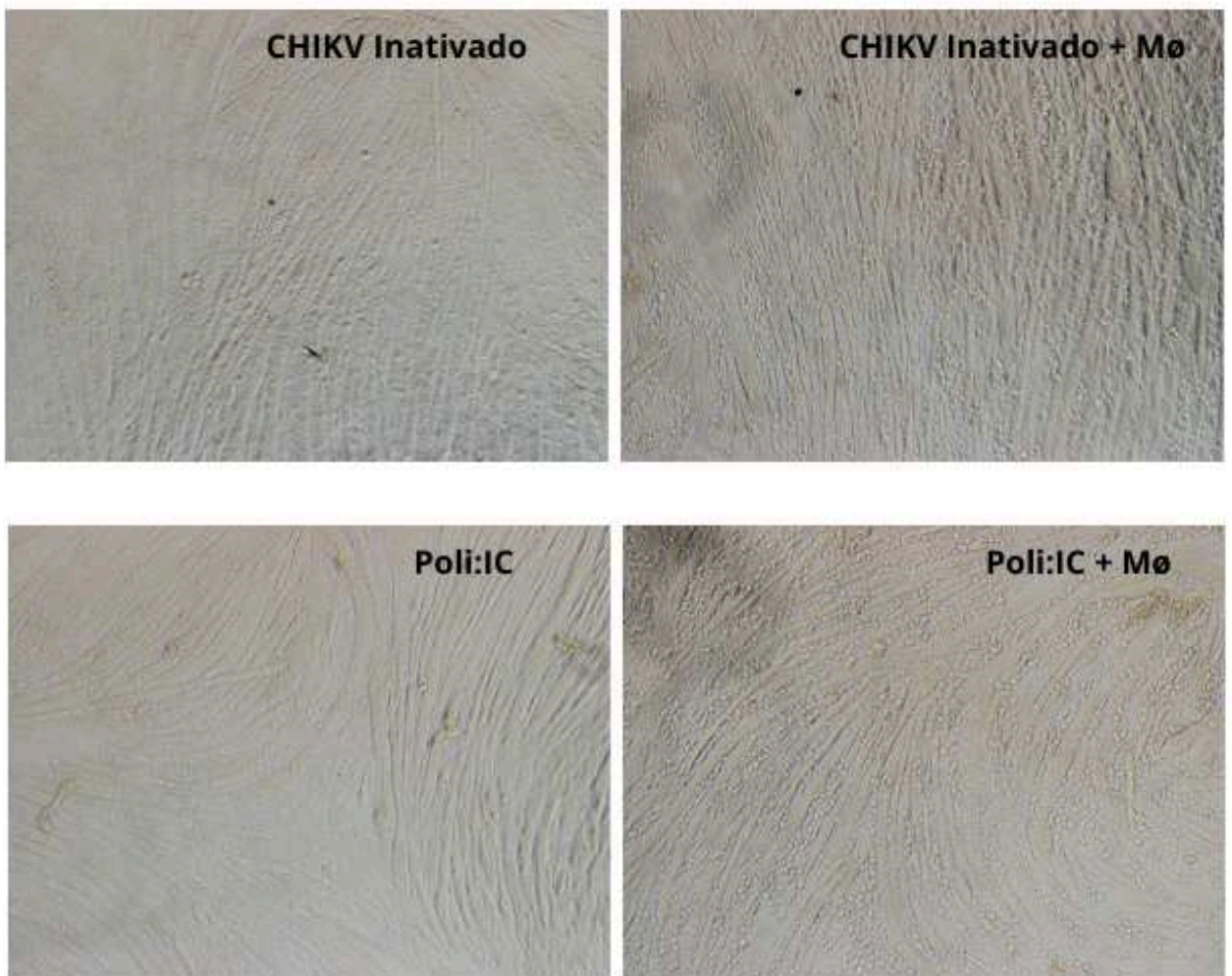


Figura 11: Análise da estrutura das miofibras em cocultivo com macrófagos de medula. Microscopia em campo claro em aumento de 10x da cocultura de um experimento. As fibras musculares foram submetidas a 5 condições: Infecção por MAYV, Infecção por CHIKV, exposição ao MAYV inativado, exposição ao CHIKV inativado, exposição ao Poli:IC, na presença e ausência de macrófagos de medula na proporção 1:5. Cada condição, com ou sem macrófago, teve quatro réplicas (quaduplicata).

6 Discussão

Os macrófagos são células do sistema imune inato que agem reconhecendo moléculas exógenas, patógenos invasores e dano tecidual e respondem a esses estímulos de forma direcionada (Stegelmeier *et al.*, 2019). Essas células constituem uma população heterogênea e apresentam alto grau de plasticidade (Mantovani *et al.*, 2002). Por isso, atuam em diversos processos regulatórios como manutenção da homeostase e o reparo de danos em tecidos (Ostuni e Natoli, 2011). Durante uma infecção, participam da resposta inflamatória, humoral e celular ao patógeno (Stegelmeier *et al.*, 2019). Contudo, os macrófagos também estão envolvidos na progressão de uma série de doenças (McWhorter *et al.*, 2013). No caso das infecções por Alfavírus artritogênicos, aparentemente há uma dualidade na participação dos macrófagos. Essas células são cruciais no controle da carga viral e regeneração do tecido muscular lesionado, pois secretam moléculas antivirais como IFN e fagocitam células infectadas, mas também secretam citocinas e quimiocinas em resposta a infecção e o desbalanço da produção dessas moléculas pode levar a manutenção do ambiente inflamatório característico dos sintomas da doença. Estudos mostraram que reduzir a população de macrófagos presentes no infiltrado celular causado pela infecção, atenua os sintomas inflamatórios na fase aguda. (Lin *et al.*, 2020; Lidbury *et al.*, 2008). Por outro lado, foi mostrado que alterar a população de macrófagos, a longo prazo, leva a um quadro crônico de artrite erosiva exacerbado (Poo *et al.*, 2014). Ou seja, destrinchar o comportamento dos macrófagos no microambiente e a interação com células infectadas no curso da infecção por *Alfavírus* pode ser a chave para novas estratégias terapêuticas eficientes. Com isso em mente, estabelecemos nosso modelo de cocultivo celular de células musculares infectadas e macrófagos. Através dos nossos experimentos, observamos a capacidade dos macrófagos de controlar a replicação viral, além de protegerem a estrutura da fibra muscular. Estudos anteriores já haviam demonstrado a capacidade de proteção do dano tecidual e o controle da carga viral que foi conferido pelos macrófagos (Poo *et al.*, 2014; Valdés-López *et al.*, 2021).

A participação das células da imunidade inata na progressão da doença já havia sido apontada (Teo *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2019). Por exemplo, foi demonstrado a presença de um infiltrado de macrófagos na articulação de pacientes crônicos (Gardner *et al.*, 2010). Essas células do infiltrado são capazes de manter um ambiente pró-inflamatório e de recrutar células imunes constantemente, desbalanceando a resposta inflamatória e lesionando o tecido (Lin *et al.*, 2020; Mostafavi *et al.*, 2019). Estudos também já demonstraram a presença de trechos do RNA viral em macrófagos sinoviais (Singh e Unni, 2011). Ou seja, a participação dos macrófagos na evolução da doença é indubitável. Com isso em mente, nós realizamos

experimentos acerca da capacidade dos macrófagos de serem infectados por MAYV e CHIKV. Ao submetemos essas células à infecção por MAYV e CHIKV e observamos no microscópio, os macrófagos infectados apresentaram mudanças na morfologia caracterizada pela presença de projeções e formato estriado. Além disso, os poços infectados com MAYV mostraram ter mais células de morfologia alterada. Esses dados corroboram com estudos anteriores que mostraram que os macrófagos sinoviais de pacientes infectados por *Alfavírus* apresentam mudanças na sua morfologia (Suhrbier, 2019). Além disso, nossos experimentos mostraram que os macrófagos que utilizamos podem ser permissivos ao MAYV e ao CHIKV, mas não levam a uma infecção produtiva. Isso corrobora com dados de outro estudo que apontou o mesmo comportamento utilizando macrófagos oriundos da diferenciação de monócitos da circulação (Valdés-López *et al.*, 2021). Todavia, ambos esbarramos em um estudo recente que mostrou o contrário, macrófagos oriundos da diferenciação de monócitos circulantes são capazes de replicar o CHIKV de forma produtiva (Lau *et al.*, 2023). É necessário compreender a susceptibilidade dos macrófagos à infecção pois isso influencia diretamente no papel dessas células no curso da doença.

A replicação dos *Alfavírus* artríticos no músculo esquelético é um ponto chave para o desenvolvimento das artralgias causadas pela infecção (Lentscher *et al.*, 2020; Jussi *et al.*, 2012). Nas células musculares podem ser encontrados trechos do RNA viral mesmo após a resolução da fase aguda da infecção (Miranda *et al.*, 2013). Além disso, células mesenquimais e fibroblastos também são bastante afetadas pela infecção (Payet *et al.*, 2023). Ao estabelecermos um modelo de cocultura, viabilizamos estudar a interação dos macrófagos com as células musculares no contexto da infecção. Isso proporciona uma visão mais ampla de como o ambiente pró-inflamatório evolui, quais moléculas estão presentes nele e qual o papel dos macrófagos no dano e reparo desse tecido. Entretanto, sabemos que nosso modelo utilizando lavado peritonial se trata de uma cultura mista de células e não um lavado puro de macrófagos, podendo ter a participação de outros tipos celulares e de mediadores presentes interferindo nos nossos resultados. Por isso, pensamos realizar lavados de medula óssea a fim de obter apenas macrófagos para que pudessemos de fato ter esse tipo celular isolado. Os dados preliminares utilizando macrófagos de medula se mostraram promissores, pois reproduziram a proteção conferida pela cultura mista à destruição das miofibras pela infecção.

Contudo, existem outras limitações acerca do nosso modelo de cocultura que precisam ser contornadas. O fato de ser um estudo *in vitro*, por exemplo, não nos dá uma noção adequada da dinâmica complexa que é o curso da infecção por *Alfavírus* no músculo esquelético. Também não compreendemos a fundo os mecanismos por trás da interação dos

macrófagos e das células musculares infectadas. Além disso, nosso modelo de cocultura utiliza a cultura mista do lavado peritoneal ou macrófagos oriundos de monocitos de medula, poderíamos testar futuramente o uso de macrófagos de tecidos musculares para ter uma representatividade mais precisa no contexto do tecido muscular.

7 Conclusões

O MAYV e o CHIKV não replicam nos macrófagos de peritônio, mas o contato dos vírus com essas células é capaz de fazer com que elas alterem a sua morfologia e acionem mecanismos de ativação;

O MAYV e o CHIKV são capazes de replicar em miofibras de C2C12, destruindo a estrutura das fibras;

O contato direto das miofibras infectadas com MAYV e CHIKV com macrófagos do peritônio protege a estrutura da fibra da destruição e controla a replicação viral;

O perfil de proteção conferido pelos macrófagos de peritônio na cocultura é reproduzido quando feito com macrófagos de medula óssea.

8 Referências

- ABREU, F. V. S. DE et al. Haemagogus leucocelaenus and Haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016-2018. **Emerging Microbes & Infections**, v. 8, n. 1, p. 218–231, 2019.
- AMARAL, J. K. et al. The Clinical Features, Pathogenesis and Methotrexate Therapy of Chronic Chikungunya Arthritis. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 289, 22 mar. 2019.
- AMDEKAR, S.; PARASHAR, D.; ALAGARASU, K. Chikungunya Virus-Induced Arthritis: Role of Host and Viral Factors in the Pathogenesis. **Viral Immunology**, v. 30, n. 10, p. 691–702, dez. 2017.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 973516, 2013.
- AZEVEDO, R. DO S. DA S.; OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. DA C. Chikungunya risk for Brazil. **Revista De Saude Publica**, v. 49, p. 58, 2015.
- BASSLER, K. et al. The Myeloid Cell Compartment-Cell by Cell. **Annual Review of Immunology**, v. 37, p. 269–293, 26 abr. 2019.
- BAXTER, V. K.; GRIFFIN, D. E. Interferon-Gamma Modulation of the Local T Cell Response to Alphavirus Encephalomyelitis. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 113, 16 jan. 2020.
- BAXTER, V. K.; HEISE, M. T. Immunopathogenesis of alphaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 107, p. 315–382, 2020.
- BISWAS, S. K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**, v. 11, n. 10, p. 889–896, out. 2010.
- CHEN, R. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 6, p. 761–762, 2018.
- CHENG, M. et al. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 294, n. 5, p. C1183-1191, maio 2008.

COOK, L. E. et al. Distinct Roles of Interferon Alpha and Beta in Controlling Chikungunya Virus Replication and Modulating Neutrophil-Mediated Inflammation. **Journal of Virology**, v. 94, n. 1, p. e00841-19, 12 dez. 2019.

DE LIMA, S. T. S. et al. Fatal Outcome of Chikungunya Virus Infection in Brazil. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 73, n. 7, p. e2436–e2443, 5 out. 2021.

DE OLIVEIRA, E. C. et al. Short report: Introduction of chikungunya virus ECSA genotype into the Brazilian Midwest and its dispersion through the Americas. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 4, p. e0009290, abr. 2021.

DE PAULA SILVEIRA-LACERDA, E. et al. Molecular epidemiological investigation of Mayaro virus in febrile patients from Goiania City, 2017-2018. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 95, p. 104981, nov. 2021.

DIAGNE, C. T. et al. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 738, set. 2020.

DORT, J. et al. Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 4761427, 2019.

FENG, F. et al. Colocalization of Chikungunya Virus with Its Receptor MXRA8 during Cell Attachment, Internalization, and Membrane Fusion. **Journal of Virology**, v. 97, n. 5, p. e0155722, 31 maio 2023.

FIGUEIREDO, C. M. et al. Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2246, 2019.

FROLOV, I. et al. Early events in alphavirus replication determine the outcome of infection. **Journal of Virology**, v. 86, n. 9, p. 5055–5066, maio 2012.

GANESAN, V. K.; DUAN, B.; REID, S. P. Chikungunya Virus: Pathophysiology, Mechanism, and Modeling. **Viruses**, v. 9, n. 12, p. 368, 1 dez. 2017.

GANJIAN, N.; RIVIERE-CINNAMOND, A. Mayaro virus in Latin America and the Caribbean. **Revista Panamericana De Salud Publica = Pan American Journal of Public Health**, v. 44, p. e14, 2020.

GARDNER, J. et al. Chikungunya virus arthritis in adult wild-type mice. **Journal of Virology**, v. 84, n. 16, p. 8021–8032, ago. 2010.

GAUSE, W. C.; WYNN, T. A.; ALLEN, J. E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 8, p. 607–614, ago. 2013.

GO, Y. Y.; BALASURIYA, U. B. R.; LEE, C.-K. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, v. 3, n. 1, p. 58–77, jan. 2014.

GONZALEZ-ESCOBAR, G. et al. Mayaro virus detection in patients from rural and urban areas in Trinidad and Tobago during the Chikungunya and Zika virus outbreaks. **Pathogens and Global Health**, v. 115, n. 3, p. 188–195, maio 2021.

GOULD, E. A. et al. Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. **Antiviral Research**, v. 87, n. 2, p. 111–124, ago. 2010.

GOUPIL, B. A.; MORES, C. N. A Review of Chikungunya Virus-induced Arthralgia: Clinical Manifestations, Therapeutics, and Pathogenesis. **The Open Rheumatology Journal**, v. 10, p. 129–140, 2016.

GUBLER, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13–24, 2001.

HOARAU, J.-J. et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 15 maio 2010.

HOLMES, A. C. et al. A molecular understanding of alphavirus entry. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008876, out. 2020.

HUANG, J. et al. Fibroblast growth factor 9 (FGF9) inhibits myogenic differentiation of C2C12 and human muscle cells. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 18, n. 24, p. 3562–3580, dez. 2019.

JACOB-NASCIMENTO, L. C. et al. Acute-Phase Levels of CXCL8 as Risk Factor for Chronic Arthralgia Following Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

KAFAI, N. M.; DIAMOND, M. S.; FOX, J. M. Distinct Cellular Tropism and Immune Responses to Alphavirus Infection. **Annual Review of Immunology**, v. 40, p. 615–649, 26 abr. 2022.

KENDALL, C. et al. Structural and phenotypic analysis of Chikungunya virus RNA replication elements. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 17, p. 9296–9312, 26 set. 2019.

KIERDORF, K. et al. Development and function of tissue resident macrophages in mice. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 6, p. 369–378, dez. 2015.

KIM, A. S. et al. An Evolutionary Insertion in the Mxra8 Receptor-Binding Site Confers Resistance to Alphavirus Infection and Pathogenesis. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 3, p. 428- 440.e9, 11 mar. 2020.

KIM, S. Y.; NAIR, M. G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. **Immunology and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 258–267, mar. 2019.

KLIMSTRA, W. B.; RYMAN, K. D.; JOHNSTON, R. E. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. **Journal of Virology**, v. 72, n. 9, p. 7357–7366, set. 1998.

KUMAR, S. et al. Mouse macrophage innate immune response to Chikungunya virus infection. **Virology Journal**, v. 9, p. 313, 19 dez. 2012.

LAU, J. Z. H. et al. Replication and innate immune responses of two chikungunya virus genotypes in human monocyte-derived macrophages. **The Journal of General Virology**, v. 104, n. 4, abr. 2023.

LENTSCHER, A. J. et al. Chikungunya virus replication in skeletal muscle cells is required for disease development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1466–1478, 2 mar. 2020a.

LENTSCHER, A. J. et al. Chikungunya virus replication in skeletal muscle cells is required for disease development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1466–1478, 2 mar. 2020b.

LI, J.-P.; KUSCHE-GULLBERG, M. Heparan Sulfate: Biosynthesis, Structure, and Function. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 325, p. 215–273, 2016.

LIDBURY, B. A. et al. Macrophage-induced muscle pathology results in morbidity and mortality for Ross River virus-infected mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 27–34, jan. 2000.

LIN, T. et al. CXCL10 Signaling Contributes to the Pathogenesis of Arthritogenic Alphaviruses. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1252, 2 nov. 2020.

LIU, L.-B. et al. Epidemiological and clinical characteristics of the chikungunya outbreak in Ruili City, Yunnan Province, China. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 2, p. 499–506, fev. 2022.

LOMBARDI PEREIRA, A. P. et al. An overview of the immune response and Arginase I on CHIKV immunopathogenesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, p. 103581, out. 2019.

LONDHE, P.; DAVIE, J. K. Interferon- γ resets muscle cell fate by stimulating the sequential recruitment of JARID2 and PRC2 to promoters to repress myogenesis. **Science Signaling**, v. 6, n. 305, p. ra107, 10 dez. 2013.

LWANDE, O. W. et al. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, p. 29853, 2015.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and Infection**, v. 18, n. 12, p. 724–734, 1 dez. 2016.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, nov. 2002.

- MARTINEZ, C. O. et al. Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 3, p. R832-842, set. 2010.
- MCWHORTER, F. Y. et al. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 43, p. 17253–17258, 22 out. 2013.
- MENDONÇA, D. C. et al. A study of the MAYV replication cycle: Correlation between the kinetics of viral multiplication and viral morphogenesis. **Virus Research**, v. 323, p. 199002, 2 jan. 2023.
- MINUTTI, C. M. et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 61, p. 3–11, jan. 2017.
- MORRISON, T. E. 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, jan. 2006.
- MOSTAFAVI, H. et al. Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as A Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 290, 22 mar. 2019.
- MURRAY, P. J. et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 14–20, 17 jul. 2014.
- OSTROVIDOV, S. et al. Skeletal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications. **Tissue Engineering. Part B, Reviews**, v. 20, n. 5, p. 403–436, out. 2014.
- OSTUNI, R.; NATOLI, G. Transcriptional control of macrophage diversity and specialization. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2486–2490, set. 2011.
- OZDEN, S. et al. Human muscle satellite cells as targets of Chikungunya virus infection. **PloS One**, v. 2, n. 6, p. e527, 13 jun. 2007.

PAYET, M. et al. Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Expressed Immunoregulatory Factors IDO and TSG6 in a Context of Arthritis Mediated by Alphaviruses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15932, 3 nov. 2023.

PEREIRA, T. N. et al. Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes for Mayaro virus. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. e0007518, 14 abr. 2020.

PIALOUX, G. et al. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 7, n. 5, p. 319–327, maio 2007.

POO, Y. S. et al. CCR2 deficiency promotes exacerbated chronic erosive neutrophil-dominated chikungunya virus arthritis. **Journal of Virology**, v. 88, n. 12, p. 6862–6872, jun. 2014.

ROHATGI, A. et al. Infection of myofibers contributes to increased pathogenicity during infection with an epidemic strain of chikungunya virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2414–2425, mar. 2014.

ROSS, E. A.; DEVITT, A.; JOHNSON, J. R. Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 708186, 2021.

SANE, J. et al. Prolonged Myalgia in Sindbis Virus Infection: Case Description and In Vitro Infection of Myotubes and Myoblasts. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 3, p. 407–414, 1 ago. 2012.

SARRAZIN, S.; LAMANNA, W. C.; ESKO, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 7, p. a004952, 1 jul. 2011a.

SARRAZIN, S.; LAMANNA, W. C.; ESKO, J. D. Heparan sulfate proteoglycans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 7, p. a004952, 1 jul. 2011b.

SAWAI, C. M. et al. Hematopoietic Stem Cells Are the Major Source of Multilineage Hematopoiesis in Adult Animals. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 597–609, 20 set. 2016.

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

SHANG, M. et al. Macrophage-derived glutamine boosts satellite cells and muscle regeneration. **Nature**, v. 587, n. 7835, p. 626–631, nov. 2020.

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n. 2, p. 78–88, mar. 2011.

Skeletal muscle tissue engineering: methods to form skeletal myotubes and their applications - PubMed. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24320971/>>.

Acesso em: 23 jan. 2024.

SONG, H. et al. Molecular Basis of Arthritogenic Alphavirus Receptor MXRA8 Binding to Chikungunya Virus Envelope Protein. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1714- 1724.e12, 13 jun. 2019.

SPUUL, P. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. **Journal of Virology**, v. 84, n. 15, p. 7543–7557, ago. 2010.

STEGELMEIER, A. A. et al. Myeloid Cells during Viral Infections and Inflammation. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 168, 19 fev. 2019.

SUHRBIER, A. Rheumatic manifestations of chikungunya: emerging concepts and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 15, n. 10, p. 597–611, out. 2019.

SUKKAEW, A. et al. Proteomic analysis of CHIKV-infected human fibroblast-like synoviocytes: Identification of host factors potentially associated with CHIKV replication and cellular pathogenesis. **Microbiology and Immunology**, v. 64, n. 6, p. 445–457, jun. 2020.

SUMMAN, M. et al. Macrophages and skeletal muscle regeneration: a clodronate-containing liposome depletion study. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 6, p. R1488-1495, jun. 2006.

TANABE, I. S. B. et al. Cellular and Molecular Immune Response to Chikungunya Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 345, 2018.

TANAKA, A. et al. Genome-Wide Screening Uncovers the Significance of N-Sulfation of Heparan Sulfate as a Host Cell Factor for Chikungunya Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 91, n. 13, p. e00432-17, 1 jul. 2017.

- TEO, T.-H. et al. A pathogenic role for CD4⁺ T cells during Chikungunya virus infection in mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 190, n. 1, p. 259–269, 1 jan. 2013.
- TIDBALL, J. G.; DORSHKIND, K.; WEHLING-HENRICKS, M. Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 6, p. 1184–1196, mar. 2014.
- VAIRO, F. et al. Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases. v. 33, n. 4, p. 1003–1025, 1 dez. 2019.
- VALDÉS-LÓPEZ, J. F.; FERNANDEZ, G. J.; URCUQUI-INCHIMA, S. Interleukin 27 as an inducer of antiviral response against chikungunya virus infection in human macrophages. **Cellular Immunology**, v. 367, p. 104411, set. 2021.
- VARGHESE, F. S. et al. Posaconazole inhibits multiple steps of the alphavirus replication cycle. **Antiviral Research**, v. 197, p. 105223, jan. 2022.
- WANG, M. et al. Structural Insights into Alphavirus Assembly Revealed by the Cryo-EM Structure of Getah Virus. **Viruses**, v. 14, n. 2, p. 327, 5 fev. 2022.
- XUE, J. et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. **Immunity**, v. 40, n. 2, p. 274–288, 20 fev. 2014.
- YOUNG, A. R. et al. Dermal and muscle fibroblasts and skeletal myofibers survive chikungunya virus infection and harbor persistent RNA. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 8, p. e1007993, ago. 2019.
- YU, W. et al. Epidemiologic patterns of Ross River virus disease in Queensland, Australia, 2001-2011. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 1, p. 109–118, jul. 2014.
- ZACKS, M. A.; PAESSLER, S. Encephalitic alphaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3–4, p. 281–286, 27 jan. 2010.
- ZAID, A. et al. Modulation of Monocyte-Driven Myositis in Alphavirus Infection Reveals a Role for CX3CR1⁺ Macrophages in Tissue Repair. **mBio**, v. 11, n. 2, p. e03353-19, 3 mar. 2020.

ZHANG, J. et al. Phagocytosis mediated by scavenger receptor class BI promotes macrophage transition during skeletal muscle regeneration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 43, p. 15672–15685, 25 out. 2019a.

ZHANG, R. et al. Expression of the Mxra8 Receptor Promotes Alphavirus Infection and Pathogenesis in Mice and Drosophila. **Cell Reports**, v. 28, n. 10, p. 2647- 2658.e5, 3 set. 2019b.

ZHU, Z. et al. Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 25, n. 3, p. 377–388, maio 2017.

ZIMMERMAN, O. et al. Vertebrate-class-specific binding modes of the alphavirus receptor MXRA8. **Cell**, v. 186, n. 22, p. 4818- 4833.e25, 26 out. 2023.